



*Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco*

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud

Departamento de Biología General

**Efecto del estrés físico y el calentamiento global  
sobre gasterópodos marinos de costas rocosas  
patagónicas**

**Lic. Nieto Vilela Rocío Aimé**

Directores: Dr. Federico Márquez

Dr. Sebastián Giulianelli

2019

## Índice

– Guía para la lectura de la tesis.....	5
– Resumen.....	8
– Abstract.....	12
– Introducción General.....	16
Introducción.....	17
Objetivo general:.....	23
Objetivos específicos:.....	23
Hipótesis y Predicciones:.....	23
Materiales y métodos.....	26
.....	29
– Capítulo 1.....	29
1.1 Introducción.....	30
1.2 Objetivo:.....	32
1.3 Hipótesis:.....	32
1.4 Predicción:.....	32
1.5 Materiales y métodos:.....	33
<i>1.5.1 Descripción de los sitios de estudio.....</i>	<i>33</i>
<i>1.5.2 Recolección de datos.....</i>	<i>34</i>
1.5.2.1 Datos puntuales:.....	34
1.5.2.2 Datos continuos:.....	34
1.5.2.3 Eventos extremos:.....	35
1.5.2.4 Centrales meteorológicas:.....	36
1.5.2.5 Modelos:.....	36
1.5.2.6 Datos satelitales oceánicos:.....	37

1.5.2.7 Ensamble de la comunidad:.....	37
1.5.3 <i>Análisis estadístico</i> .....	38
1.6 Resultados.....	40
1.6.1 <i>Datos Puntuales: Condiciones físicas encontradas en los sitios de cada localidad</i> .....	40
1.6.2 <i>Datos Continuos: Condiciones físicas encontradas en cada localidad</i> .....	43
1.6.3 <i>Centrales Meteorológicas: Condiciones físicas encontradas en cada localidad</i> .....	54
1.6.4 <i>Modelos: Condiciones físicas encontradas en cada localidad</i> .....	56
1.6.5 <i>Modelos: Condiciones físicas encontradas en los sitios de cada localidad</i> .....	58
1.6.6 <i>Datos Satelitales oceánicos</i> .....	64
1.6.7 <i>Diversidad y riqueza</i> .....	65
1.7 Discusión .....	72
– Capítulo 2 .....	76
2.1 Introducción: .....	77
2.2 Objetivo: .....	79
2.3 Hipótesis:.....	79
2.4 Predicción:.....	80
2.5 Materiales y métodos: .....	80
2.5.1 <i>Procesamiento de muestras y morfometría clásica</i> :.....	80
2.5.2 <i>Morfometría geométrica</i> :.....	80
2.6 Resultados:.....	86
2.6.1 <i>Morfometría Clásica: T. geversianus</i> .....	86
2.6.2 <i>Morfometría Geométrica: T. geversianus</i> .....	88
2.6.3 <i>Morfometría Clásica: T. patagonica</i> .....	94

2.6.4	<i>Morfometría Geométrica: T. patagonica</i> .....	95
2.7	Discusión:.....	99
–	Capítulo 3.....	104
3.1	Introducción:.....	105
3.2	Objetivo:.....	107
3.3	Hipótesis:.....	107
3.4	Predicción:.....	107
3.5	Materiales y métodos:.....	107
3.5.1	<i>Preparación de las muestras:</i> .....	108
3.5.2	<i>Cuantificación de proteínas totales:</i> .....	108
3.5.3	<i>Ensayos de Western Blot:</i> .....	109
3.5.4	<i>Análisis estadísticos:</i> .....	110
3.6	Resultados:.....	110
3.7	Discusión:.....	114
–	Capítulo 4.....	118
4.1	Introducción:.....	119
4.2	Objetivo:.....	121
4.3	Hipótesis:.....	121
4.4	Predicción:.....	121
4.5	Materiales y métodos:.....	121
4.5.1	<i>Respuestas fisiológicas:</i> .....	121
4.5.1.1	Diseño experimental:.....	122
4.5.1.2	Análisis estadísticos .....	122
4.5.2	<i>Cambios morfométricos:</i> .....	123
4.5.2.1	Diseño experimental:.....	124
4.5.2.2	Análisis estadísticos:.....	128

4.6 Resultados:.....	129
4.6.1 <i>Respuestas fisiológicas:</i> .....	129
4.6.2 <i>Cambios morfométricos:</i> .....	131
4.7 Discusión:.....	138
Anexo .....	142
– Discusión general .....	144
Discusión general:.....	145
– Agradecimientos .....	149
– Bibliografía.....	153

---

**–Guía para la lectura de la tesis**

---

Esta tesis doctoral está formada por un resumen, una introducción general, una metodología general, cuatro capítulos (compuestos por una introducción, materiales y métodos, resultados y discusión), una discusión general y la bibliografía general. En esta sección se resumirá lo que el lector encontrará en cada sección.

La *introducción general* contiene el marco teórico con las descripciones e hipótesis sobre los ambientes costeros y el calentamiento climático global, necesarias para la discusión de los resultados y la extracción de conclusiones. Además, se presentan las especies de estudio y su rango de distribución; finalmente se enumeran los objetivos, hipótesis y predicciones postuladas para el desarrollo de los capítulos de la tesis.

La *metodología general* presenta los métodos de recolección de muestras, la dinámica de cada campaña y la posición de cada área de muestreo. La nomenclatura utilizada en esta sección se mantendrá a lo largo del manuscrito, las **localidades** harán referencia a Golfo Nuevo (GN), Rawson (RW) y Bahía Camarones (BC). Los **sitios** serán las playas dentro de cada localidad, GN: Punta Este, Punta Loma, Ambrossetti; RW: Playa el Faro, Cangrejales, Santa Isabel; BC: Elola, Algueros, Caleta Carolina. Los **niveles** referirán al intermareal (IN) y submareal (SUB) dentro de cada sitio. Finalmente, el **sector** del intermareal serán las partes protegidas o expuestas del mismo y las **zonas** serán los sectores ubicados en la parte alta, media y baja del intermareal.

El orden en que se describen los capítulos representa la secuencia lógica en la que se realizaron las preguntas que motivaron esta tesis doctoral: 1- ¿Cómo son las condiciones de estrés físico en inter y submareales emplazados a lo largo de un gradiente latitudinal?, 2- ¿Cómo es la forma de las poblaciones que habitan cada una de estas zonas del inter y submareal?, 3- ¿Cuál es el nivel de estrés físico basal que presentan las poblaciones de cada zona?, 4- ¿Cómo es la respuesta fisiológica de ejemplares bajo condiciones de estrés térmico que simulen un escenario de calentamiento climático global?, ¿cómo será la forma de embriones que se desarrollen bajo estas condiciones de estrés térmico?. Así, se encuentra en el *Capítulo 1* una caracterización ambiental de cada zona de estudio y la

determinación del sitio y localidad de mayor estrés físico. A partir de esta información, en el *Capítulo 2* se relaciona la forma de las especies de estudio con las condiciones ambientales de cada sitio. A su vez, en el *Capítulo 3*, la caracterización ambiental permite explicar la defensa térmica encontrada en cada sitio de muestreo. Teniendo la información de base obtenida en los capítulos 2 y 3, en el *Capítulo 4* se evalúa experimentalmente la respuesta fisiológica de las especies de estudio a condiciones de calentamiento climático y se obtiene la forma media de los embriones expuestas a dichas condiciones. Finalmente, se encuentra una discusión general donde se ensamblan las principales conclusiones obtenidas a lo largo del trabajo y se presentan las nuevas líneas de trabajo que se abren a partir de los resultados obtenidos.

Los nombres de las especies mencionadas a lo largo de este trabajo fueron revisados de acuerdo a la base de datos Worms ([www.marinespecies.org](http://www.marinespecies.org)) para los taxa animales, y de acuerdo a Algaebase ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)) para las algas.

---

– Resumen

---

Todos los sistemas marinos costeros son vitales, tanto ecológicamente como por su aporte socioeconómico. En la Argentina, el sistema costero Patagónico alberga una gran biodiversidad, que sostiene una alta productividad y es el sustento trófico de muchos vertebrados marinos. Dentro de los sistemas intermareales, se encuentran ensambles de invertebrados que se exponen a un gradiente de condiciones físicas durante cada ciclo de marea. Las poblaciones de gasterópodos que tienen una distribución tanto inter como submareal, se encuentran expuestos a diferentes tipos de estrés ambiental modelando distintas respuestas adaptativas. Sin embargo, el calentamiento climático global a través de las modificaciones predichas en las condiciones físicas, tales como la acidificación y el aumento de la temperatura del mar, pueden afectar a las comunidades de invertebrados marinos. Una adaptación que tienen muchos organismos marinos, es presentar variaciones de forma y tamaño del cuerpo para hacer frente a estas presiones ambientales. Fisiológicamente también se desarrollaron defensas contra perturbaciones físicas, un ejemplo está dado por las proteínas de choque térmico (Hsp). Un grupo conservado de proteínas, que actúan como chaperonas manteniendo la estabilidad molecular de las proteínas celulares. Cada organismo expuesto a estrés sintetiza rápidamente proteínas de choque térmico, las cuales determinan la distribución que podrá tener dicho organismo en el intermareal. Para poder evidenciar y predecir el grado de estrés físico y la tolerancia a escenarios futuros que tendrían los moluscos, uno de los grupos más diversos de los ensambles intermareales, se plantea como objetivo de esta tesis: estudiar las respuestas morfológicas y fisiológicas de dos especies de gasterópodos marinos que habitan sitios con distintos niveles de estrés físico ambiental en las costas de Norpatagonia y evaluar los posibles efectos bajo un escenario de cambio climático global. Se trabajó con una especie herbívora de desarrollo indirecto *Tegula patagonica* y otra carnívora de desarrollo directo *Trophon geversianus*. Inicialmente, se analizó el estrés ambiental a lo largo de diferentes inter y submareales habitados por dichas especies, dentro de un gradiente latitudinal. Posteriormente, se estudió el patrón de variación morfológica de las especies, mediante el uso de morfometría geométrica y clásica. Se comparó la variación en la micro escala (inter y submareal) y macroescala (entre los sitios en un gradiente latitudinal) geográfica.

Complementariamente, se determinó el grado de estrés fisiológico basal presente en los ejemplares de cada sitio, determinando la expresión de proteínas Hsp70 mediante la técnica de Western blot. Finalmente, se seleccionó la especie de desarrollo directo que se encuentra en abundancia tanto en el inter como en el submareal (*T. geversianus*), para evaluar experimentalmente los efectos fisiológicos y morfológicos en un escenario de calentamiento climático. Se trabajó con adultos del inter y submareal, determinando la tasa de síntesis de Hsp70 frente al incremento de temperatura esperado para el 2100. Por otro lado, se recolectaron ovicápsulas del submareal y se las expuso a distintas temperaturas para evaluar su cambio de forma al eclosionar. Se encontraron diferencias significativas en el nivel de estrés físico entre las localidades relacionadas principalmente con la latitud y la geomorfología de cada costa. La localidad de mayor estrés físico fue la costa expuesta a mar abierto, ubicada en una latitud media. La localidad con un nivel medio de estrés, presentó el mayor número de especies en su ensamble intermareal. Analizando la forma de la concha, se encontró que *T. geversianus* presentó menor variación que *T. patagonica*, pero estructurada en función al sitio y los niveles de donde provenían. En cada caso la influencia de las escalas fue diferente, *T. geversianus* mostró una gran separación en forma en una micro escala, corroborando la presencia de dos ecomorfotipos para esta especie en el Golfo Nuevo y ampliando su ocurrencia a las otras localidades muestreadas. A macroescala se encontró un patrón de variación latitudinal, evidenciándose una menor variación en forma entre los submareales. En cambio, *T. patagonica* no presentó diferencias a microescala y sí a macroescala aunque sin un patrón latitudinal. En el análisis fisiológico, se encontró un perfil de expresión distinto de Hsp70 entre las dos especies. Para *T. geversianus*, el factor de estrés diferencial entre niveles fue determinante para la expresión de Hsp70, registrándose los valores más elevados en el intermareal. Al comparar la expresión entre distintos intermareales en diferentes épocas del año, se observó que en dicha especie se mantuvo un elevado nivel de expresión durante el verano y el invierno en los lugares de mayor viento y oleaje. Por el contrario, en *T. patagonica* no se observaron diferencias de expresión entre niveles. Solo respondió de manera distinta entre los intermareales en una macro escala, aunque sin un patrón

latitudinal. Finalmente, en las experiencias que simularon un escenario de calentamiento climático, los resultados sugieren que frente al incremento de 4 °C en la temperatura previsto para el año 2100, los ejemplares de *T. geversianus* que habitan el intermareal tendrían menos daño celular que los que habitan en el submareal. Por otro lado, se encontró que *T. geversianus* presenta plasticidad fenotípica en la etapa de juveniles frente a variaciones en la temperatura. Discutiendo los resultados obtenidos, se encontró que los gasterópodos estudiados presentaron diferentes adaptaciones al estrés ambiental, relacionadas con las condiciones físicas a las que se encuentran expuestos habitualmente y al sitio de donde provienen. El gasterópodo *T. geversianus*, presentó adaptaciones fisiológicas y morfológicas diferenciales entre los niveles inter y submareal. Dichas adaptaciones, podrían ser la base de su abundancia en ambientes estresantes como los intermareales en diferentes latitudes. Incluso, frente a un escenario de calentamiento climático global, presenta una plasticidad que le permitiría adaptarse a los cambios esperados. En cambio, *T. patagonica*, mostró una defensa antiestrés deficiente en términos fisiológicos y morfológicos estudiados. Demostrando que su distribución en la zona baja del intermareal y su mayor abundancia en el submareal, serían los indicadores de una adaptación menos satisfactoria a ambientes estresantes como los intermareales.

---

– Abstract

---

All coastal marine systems are vital, both for their ecological and socio-economic contributions. In Argentina, the Patagonian coastal system is home to a great biodiversity, which sustains a high productivity and is the trophic source of many marine vertebrates. Within intertidal systems, diverse groups of invertebrates are exposed to a gradient of physical conditions during each tidal cycle. Inter and subtidal gastropod populations are exposed to different types of environmental stress which are managed by modeling different adaptive responses. However, climate change through predicted changes in physical conditions, such as acidification and sea temperature rise, can specially affect marine invertebrate communities. Variations in body shape and size is one adaptation that marine organisms have against environmental pressures. Physiologically, they also developed defenses against physical disturbances, for example the heat shock proteins (Hsp). These are a conserved group of proteins which act as chaperones while maintaining the molecular stability of cellular proteins. Each organism exposed to stress quickly synthesizes heat shock proteins, which in turn determines the distribution that it may have in the intertidal area. In order to demonstrate and predict the degree of tolerance to physical stress and within a future climate change scenario that mollusks would have, one of the most diverse groups of intertidal assemblages, the objective of this thesis is: to study the morphological and physiological responses of two species of marine gastropods that inhabit intertidal sites with different levels of environmental physical stress on the coast of northern Patagonia, and assess the possible effects under a scenario of climate change.

The thesis included an herbivorous species of indirect development, *Tegula patagonica*, and a carnivorous species of direct development, *Trophon geversianus*. Initially, environmental stress was analyzed along different inter and subtidal areas inhabited by these species in a latitudinal gradient. Subsequently, we used geometric morphometric analyses to study the pattern of morphological variation of the species included. The variations were compared in the micro scale (inter vs. subtidal) and macroscale (between sites in a geographical latitudinal gradient). In addition, the degree of basal physiological stress of the specimens in each site was

analyzed by determining the expression of Hsp70 proteins using Western blot techniques. Finally, we selected the most abundant species in the inter and subtidal areas (*T. geversianus*) to experimentally assess the physiological and morphological effects in a climate change scenario. We worked with adult specimens and determined the rate of synthesis of Hsp70 against the expected temperature increase for 2100. On the other hand, subtidal eggs were collected and exposed to different temperatures to evaluate their shape change when hatching.

Significant differences in the level of physical stress between localities were found and mainly related to latitude and geomorphology of each site. The greatest physical stress was found at the medium-latitude coastal area exposed to the open sea. The medium level stress locality presented the highest number of species in its intertidal assembly. Shell shape variation was reduced in *T. geversianus* in comparison with *T. patagonica*, but structured according to the site and the levels where they came from. Shape variation in *T. geversianus* was clearly related to a micro scale, thus corroborating the presence of two ecomorphotypes in Golfo Nuevo, and extending its occurrence to the other sampled locations. Then, a latitudinal pattern at a macroscale showed lesser variation in form among the subtides levels. On the other hand, *T. patagonica* showed shape differences only on a macroscale, although without a latitudinal pattern. In the physiological analyses, different expression profiles of Hsp70 were found between the two species. For *T. geversianus*, the differential stress factor between levels was correlated to the expression of Hsp70, with the highest values registered at the intertidal levels. When comparing intertidal levels at different times of the year, this species maintained a high level of expression during the summer and winter in those localities with greatest wind and swell. In contrast, *T. patagonica* showed no differences in Hsp70 expression between levels. The species only responded differently between intertidal levels on a macroscale, although without a latitudinal pattern. Finally, in the experiences that simulated a climate change scenario, the results suggested that the specimens of *T. geversianus* that inhabit the intertidal would have less cellular damage than those that inhabit the subtidal levels. On the

other hand, we found that juvenile *T. geversianus* presented phenotypic plasticity against variations in temperature.

Therefore, gastropods studied in this thesis presented different adaptations to environmental stress, related to the physical conditions of their habitat. The gastropod *T. geversianus* presented differential physiological and morphological adaptations between inter and subtidal levels. Such adaptations could explain their abundance in stressful environments, such as intertidal areas at different latitudes. Even in the face of a global climate change scenario, *T. geversianus* presented a phenotypic plasticity that would allow it to adapt better to such expected changes. On the other hand, *T. patagonica* showed a poor anti-stress defense in the physiological and morphological terms studied in this thesis. Thus, its distribution in the lower zone of the intertidal and its greater abundance in the subtidal area would indicate less satisfactory adaptations to stressful environments.

---

## – Introducción General

---

## Introducción

En la Argentina el sistema costero Patagónico alberga una gran biodiversidad de invertebrados marinos, que sostiene una alta productividad y es el sustento trófico de aves y vertebrados (Yorio *et al.* 1998; Rechimont 2011). Todos los sistemas marinos costeros son vitales desde una perspectiva ecológica como por su aporte socioeconómico (Harley *et al.* 2006). Sin embargo, los cambios atmosféricos producidos por el calentamiento global modifican el régimen de precipitaciones alterando en dichos sistemas la salinidad, turbidez y el ingreso de material continental entre los que se encuentran muchos contaminantes (IPCC 2001; Harley *et al.* 2006). Una consecuencia esperada bajo este escenario, es el incremento en el estrés fisiológico de los organismos, el cual es mayor en el intermareal que en el submareal (Pöhlmann *et al.* 2011).

Los intermareales rocosos, son ambientes muy fluctuantes desde el punto de vista ambiental, caracterizados por un amplio rango de condiciones físicas que varían en función de la altura de la marea (Denny y Wethey 2001). Durante los ciclos de marea baja, los organismos que habitan el intermareal se encuentran expuestos a diferentes condiciones de radiación UV, elevadas o bajas temperaturas, desecación por calor y viento (Raffaelli y Hawkins 2012). En Norpatagonia, la desecación es un orden de magnitud más elevada que en otros intermareales estudiados en diferentes partes del mundo, debido a las bajas precipitaciones locales y el constante y elevado viento (Bertness *et al.* 2006). Esta heterogeneidad ambiental demanda a los organismos un gasto de energía para la protección y mantenimiento celular (Hofmann 1999; Somero 2002). En intermareales que presentan amplitudes de mareas, las presiones bióticas y abióticas crean un gradiente de distribución de especies definido como zonas del intermareal (Raffaelli y Hawkins 2012). Este patrón de zonación fue descrito por primera vez en 1949, donde se dividieron las zonas del intermareal en función de las especies presentes y este patrón luego se generalizó al resto de los intermareales (Stephenson y Stephenson 1949). Sin embargo, estos patrones no siempre se cumplen, encontrando variantes en función del grado de exposición o protección al oleaje (Raffaelli y Hawkins 2012). La gran variante dentro del esquema de zonación inicialmente descrito, son las especies

que se distribuyen en cada una de las zonas, cuyo patrón varía en función del lugar geográfico donde se encuentre el intermareal (Figura 1). Este ensamble comunitario dependerá por lo tanto de las adaptaciones de los individuos a las presiones ambientales propias de cada intermareal (Bertness *et al.* 2001). En las zonas altas del intermareal los factores físicos (presión abiótica) determinan el asentamiento de las especies, por lo tanto, solo se encontrarán presentes aquellas especies que puedan tolerarlos (Levinton 1995; Raffaelli y Hawkins 2012). Conforme nos acercamos al intermareal bajo, las presiones que rigen el asentamiento de las especies son principalmente biológicas (presiones bióticas, Levinton 1995; Bertness *et al.* 2001; Raffaelli y Hawkins 2012).

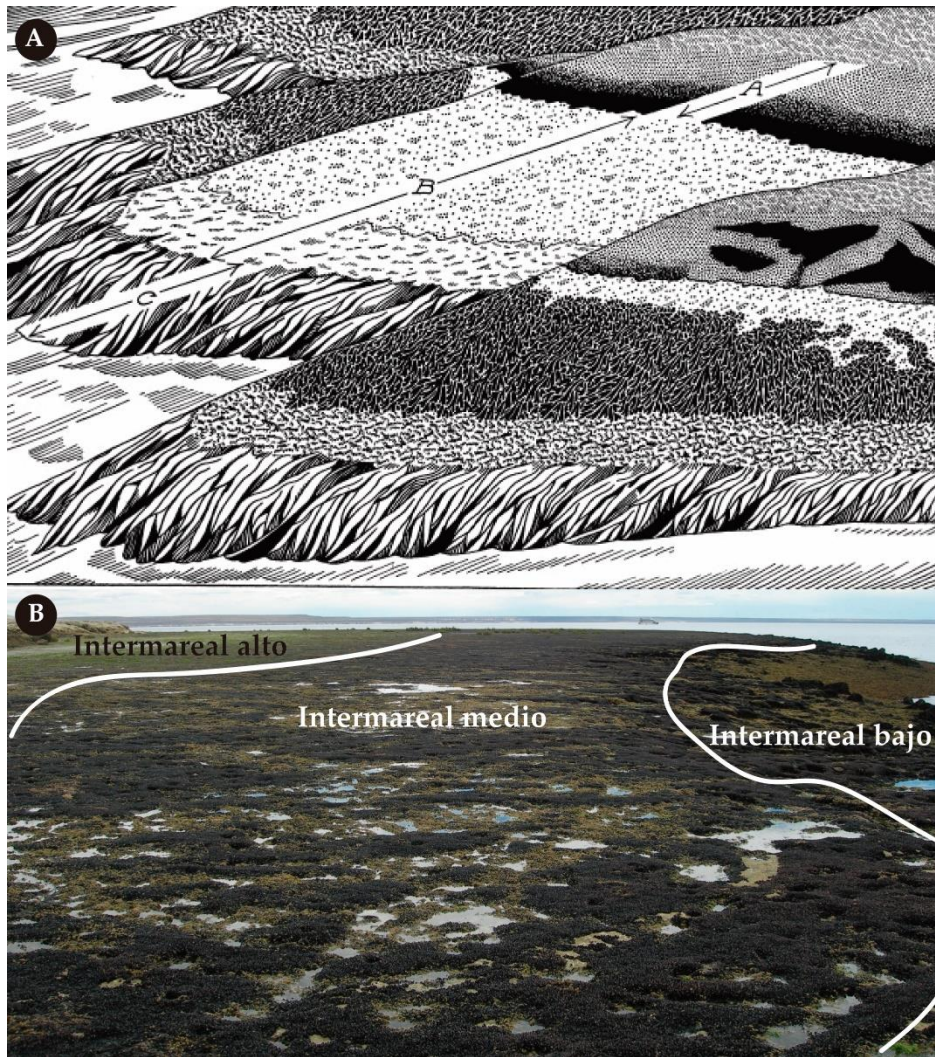


Figura 1: A- Primer zonificación realizada para intermareales rocosos (Stephenson and Stephenson, 1949) A: zona del supralitoral, B: zona del litoral medio y C: infralitoral, B- Foto de un intermareal de la zona de trabajo, las siluetas blancas delimitan las tres zonas (Foto: María Martha Méndez).

En los últimos 100 años el clima de la tierra se ha incrementado en aproximadamente  $0,6\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Gian-Reto *et al.* 2002), exponiendo a los organismos a nuevas presiones por estrés físico, lo que pudo ocasionar nuevas adaptaciones. Si bien el clima es un sistema dinámico, efectos antropogénicos aumentan la velocidad de dichos cambios limitando la capacidad de adaptación de los organismos (Haugan 1997; Feely *et al.* 2004; Roessing *et al.* 2005; Harley *et al.* 2006; Guinottea y Fabry 2008; Collins *et al.* 2013). Es por ello, que los estudios sobre tolerancia térmica y sus impactos en las especies están recibiendo un creciente interés (Pöhlmann *et al.* 2011). Entre los cambios que se esperan bajo un escenario de cambio climático, se

encuentran el aumento de la temperatura, el pH, la salinidad, el nivel del mar, cambios en los vientos y regímenes de circulación marina (IPCC 2001; Roessing *et al.* 2005; Harley *et al.* 2006; Collins *et al.* 2013). Por otro lado, el calentamiento aumenta la demanda de oxígeno de los organismos y al mismo tiempo baja su disponibilidad, ya que disminuye su solubilidad (Pörtner y Knust 2007).

Muchos invertebrados marinos han evolucionado de tal manera que pueden hacer frente a la desecación durante la marea baja, una adaptación frecuente es recluírse herméticamente dentro de sus conchas (Pöhlmann *et al.* 2011) hasta la llegada del agua con la próxima marea alta. Muchos autores han demostrado que existen adaptaciones morfológicas que responden a presiones ambientales y que es posible su interpretación biológica (Carvajal Rodríguez *et al.* 2005). Por ejemplo, la especie de caracol marino *Littorina saxatilis* presenta amplias aperturas de la concha para mantener estabilidad frente al embate de las olas en zonas expuestas, (Conde-Padín *et al.* 2007), en congéneres del gasterópodo *Lepsiella* se encontraron diferencias en el grosor de la concha y el tipo de ornamentas en función de la presencia de depredadores y el grado de exposición de las olas (Kitching y Lockwood 1974). En el caracol marino patagónico *Trophon geversianus*, se encontraron variaciones en el tamaño de la apertura y la forma de la concha entre los ecomorfotipos del inter y submareal, estos últimos menos expuestos al oleaje, pero con mayor presión por depredación (Márquez *et al.* 2015). Sin embargo, cambios en los hábitats debido a la acidificación y el aumento de la temperatura del mar generan nuevos desafíos en tiempos evolutivos reducidos, a los cuales los organismos deben adaptarse. Entre ellos, se encuentran la disminución de la disponibilidad de carbonato de calcio (Feely *et al.* 2004), lo cual se ve agravado en zonas de aguas más frías, ya que naturalmente retienen más dióxido de carbono (Guinottea y Fabry 2008). Una disminución del pH oceánico puede alterar la estructura de las valvas calcáreas disminuyendo su flexibilidad (Mackenzie *et al.* 2014). Es por esto que la acidificación de los océanos afectará a todos los organismos que presentan estructuras de carbonato (Harley *et al.* 2006). Por lo que el cambio climático, a través de las modificaciones predichas en las condiciones naturales, pueden afectar a las comunidades y poblaciones de invertebrados marinos.

Fisiológicamente se evidencian defensas contra perturbaciones físicas causadas por la temperatura, un ejemplo está dado por las proteínas de choque térmico (*Heat shock protein*, Hsp por sus siglas en inglés de) (Tomanek y Zuzow 2010; Parsell y Lindquist 1993), un grupo conservado de proteínas que actúan como chaperonas manteniendo la estabilidad de las proteínas celulares (Lindquist 1986 ; Parsell y Lindquist 1993). Cada organismo expuesto a estrés, como por ejemplo cambios térmicos, sintetiza rápidamente este tipo de proteínas (Lindquist 1986 ), las cuales ayudan a determinar la distribución que podrá tener el organismo en el intermareal (Somero 2002; Tomanek y Zuzow 2010; Pöhlmann *et al.* 2011). Incluso, los organismos que presentan la capacidad de sintetizar proteínas de choque térmico cuando viven bajo condiciones de estrés aumentan su tasa de supervivencia (Lindquist 1986 ; Schlesinger 1990).

Los gasterópodos *Tegula patagonica* y *Trophon geversianus* son organismos que habitan tanto el intermareal como el submareal y son muy abundantes en las costas argentinas. *T. patagonica* (Figura II A y C) se distribuye desde el sur de Brasil hasta la provincia de Santa Cruz en Argentina (Pastorino 1994; Linse 1999; Aranzamendi *et al.* 2014), mientras que *T. geversianus* (Figura II B y D) se lo encuentra desde la provincia de Buenos Aires hasta el Banco de Namuncurá/Burdwood en el océano Atlántico (Castellanos y Landoni 1993; Griffin y Pastorino 2005; Pastorino 2005; Cumplido 2008) y hasta los 42° de latitud sur en el océano Pacífico. Ambas especies son factibles de manipular en experimentos de acuario y de campo (Cumplido *et al.* 2010; Nieto Vilela *et al.* 2013; Márquez *et al.* 2015). Su amplia distribución a lo largo de la costa y en ambientes muy disímiles, los postula como especies modelo para estudiar variaciones morfométricas y fisiológicas asociadas al cambio de factores físicos actuales y futuros, bajo un escenario de cambio climático.

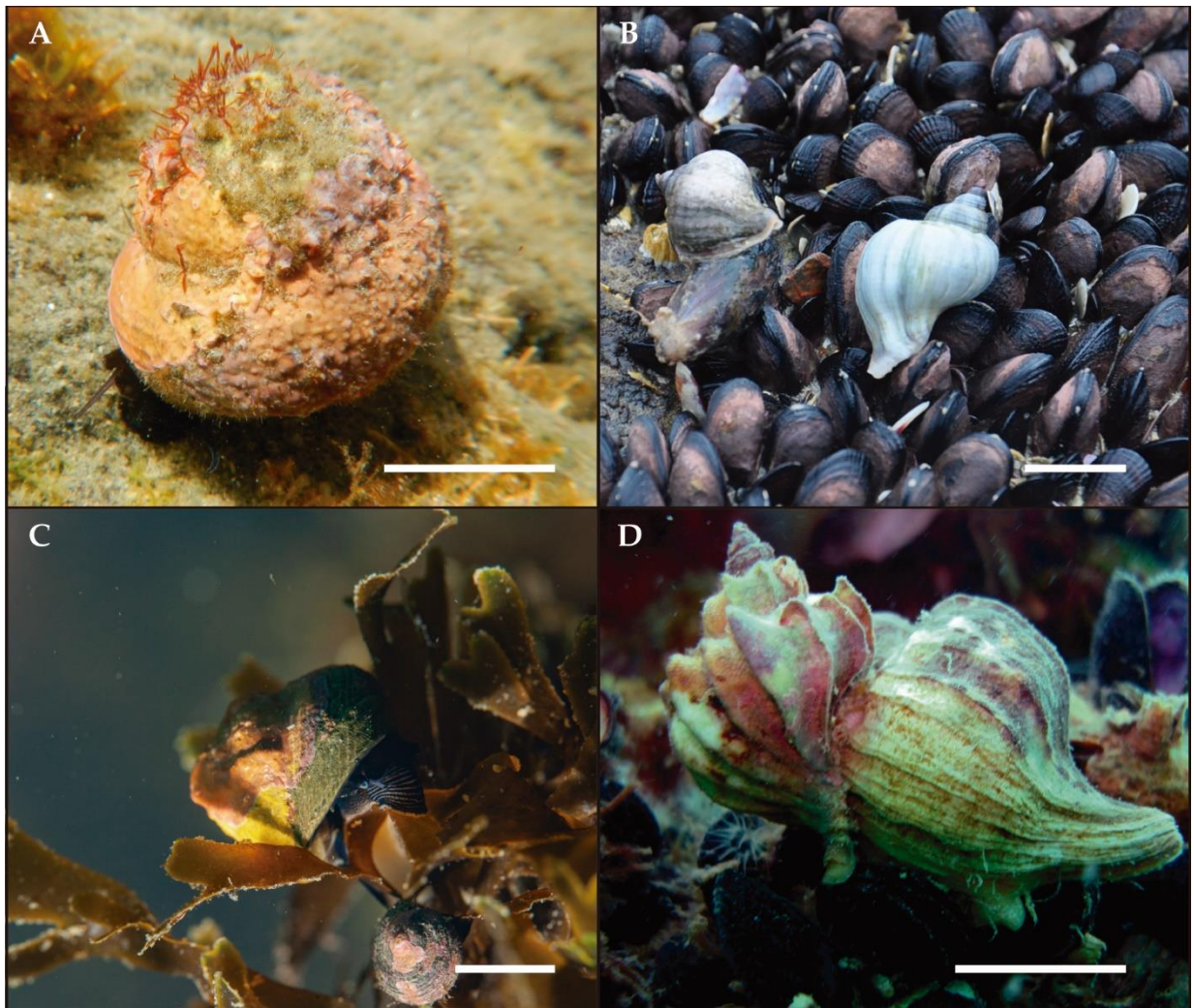


Figura 11: **A** y **C**- *Tegula patagonica* en intermareal bajo y en el submareal somero, respectivamente. **B** y **D**- *Trophon geversianus* en intermareal medio sobre mejillinar y en submareal somero sobre cholguera, respectivamente.

### Objetivo general:

Estudiar las respuestas morfológicas y fisiológicas de dos especies de gasterópodos marinos que habitan sitios con distintos niveles de estrés físico ambiental en las costas de Norpatagonia y evaluar los posibles efectos bajo un escenario de cambio climático global.

### Objetivos específicos:

1. Describir y comparar estacionalmente durante un año la dinámica de las principales variables físico químicas en ensamblajes intermareales y submareales someros a lo largo de un gradiente latitudinal donde habitan los gasterópodos *Tegula patagonica* y *Trophon geversianus*.
2. Describir y comparar los patrones de variación morfológica de *Tegula patagonica* y *Trophon geversianus* expuestas a diferentes presiones de estrés físico en las localidades estudiadas.
3. Evaluar la respuesta fisiológica de poblaciones de *Tegula patagonica* y *Trophon geversianus*, expuestas a diferentes presiones de estrés físico.
4. Evaluar experimentalmente las respuestas morfométricas y fisiológicas en embriones y adultos de *Trophon geversianus*, respectivamente, expuestas a condiciones ambientales que simulen un escenario de calentamiento climático global.

### Hipótesis y Predicciones:

H1. Las diferencias latitudinales y climáticas entre Golfo Nuevo, Rawson y Bahía Camarones, generan diferentes condiciones ambientales produciendo un estrés físico diferente para los organismos.

P1. Las áreas de muestreo localizadas más al sur (Rawson y Bahía Camarones) tendrán mayores variaciones en temperatura, pH, salinidad, fuerza de olas y desecación que las áreas de muestreo del norte (Golfo Nuevo). A su vez, mostrarán una menor riqueza y abundancia de especies.

H2. Dado que el fenotipo depende en su mayor medida de las variaciones ambientales cuando el genotipo es el mismo, los individuos del intermareal presentan diferencias morfométricas con los del submareal como consecuencia de un proceso adaptativo. A su vez, a escala latitudinal el ambiente cambia por lo que existen adaptaciones morfológicas en función de las características físicas de cada lugar.

P2. En respuesta a una necesidad de contrarrestar el efecto de las olas y adherirse al sustrato, así como contrarrestar la desecación y las altas temperaturas, los individuos del intermareal presentarán conchas globulares y con aperturas circulares comparadas con la de los organismos del submareal. A su vez, las tallas de los ejemplares serán mayores en los ambientes de menor temperatura.

H3. Los diferentes niveles de estrés físico ambiental presentes en el intermareal y submareal, generan distintas respuestas fisiológicas en los organismos que los habitan, encontrándose los mayores niveles de estrés en individuos del intermareal.

P3. Los organismos que habiten el intermareal estarán expuestos a un mayor estrés físico, por lo tanto, tendrán una mayor tasa de síntesis de proteínas de choque térmico Hsp70 que los organismos del submareal.

H4. El ambiente determina la morfología y la respuesta fisiológica de los organismos, por lo tanto, organismos que se desarrollen en ambientes diferentes responden de manera diferencial.

P4. Los embriones que se expongan a mayores temperaturas cambiarán su forma de la concha. Los adultos que se expongan a mayores temperaturas presentarán mayores niveles de proteínas Hsp70.

---

– Metodología general

---

## Materiales y métodos

A lo largo de la provincia de Chubut, se seleccionaron tres localidades de trabajo con intermareales rocosos habitados por las especies en estudio y con diferentes topografías (Figura III). La localidad ubicada más al norte fue Golfo Nuevo (GN), cercano a la ciudad de Puerto Madryn. Esta localidad se caracteriza por una elevada salinidad, una alta temperatura promedio (Rivas 1990) y una débil estratificación vertical del agua relacionada con el bajo intercambio de agua en el golfo (Rivas y Beier 1989). La segunda localidad de muestreo fue Rawson (RW), cercano a la localidad de Playa Unión. Una costa abierta al mar, caracterizada por un alto flujo de agua, elevada energía de olas y fuertes vientos (Coronato 1993). Por último, la localidad ubicada más al sur fue Bahía Camarones (BC), una bahía protegida en el sur por un Tómbolo, que constituye el nexo entre las Islas Blancas y el extremo continental de Cabo Dos Bahías (Schillizzi *et al.* 2014). Esta localidad presenta un elevado promedio anual de viento y de fuerza de olas (Bertness *et al.* 2006). En cada localidad se eligieron tres playas (sitios) sobre la base de su accesibilidad terrestre, las cuales presentarían una topografía similar y que se asemejaran en el grado de exposición al oleaje y dirección del viento predominante.

Se realizaron un total de 18 campañas desde octubre del 2015 hasta febrero del 2018 con acompañantes técnicos y colaboración de integrantes del Laboratorio de Reproducción y Biología Integrativa de Invertebrados Marinos (LAR BIM) del IBIOMAR-CONICET. Cada campaña se diseñó para poder recolectar datos físicos, tomar fotos para evaluar el ensamble comunitario y recolectar organismos que permitieran realizar el análisis de la forma y del nivel de estrés de los mismos. Para caracterizar las presiones abióticas de cada localidad se tomaron los datos físicos de temperatura, viento, humedad, desecación, salinidad y fuerza de olas (Capítulo 1). Para el estudio de la forma y el tamaño de la concha (Capítulo 2), se recolectaron manualmente individuos del intermareal y del submareal mediante buceo autónomo o en apnea; luego fueron trasladados al laboratorio y almacenados a -20 °C. Los buceos se realizaron durante la marea baja con el fin de asegurarse que los organismos capturados pertenezcan a dicho hábitat. Se recolectaron

aproximadamente 50 ejemplares de cada nivel para el estudio de la forma de la concha. Sin embargo, en algunos sitios no se encontraron las especies de interés en un número que permita un estudio confiable desde el punto de vista estadístico. Para estimar el nivel de estrés de los organismos, analizamos la expresión de proteínas de choque térmico como marcador. Los ejemplares recolectados a campo, fueron congelados inmediatamente mediante el uso de nitrógeno líquido luego de su recolección a campo en cada sitio de muestreo, permitiendo así descartar cualquier efecto por manipulación y traslado sobre el nivel de estrés basal (Capítulo 3). Para estudiar los efectos del calentamiento climático de manera experimental, se recolectaron adultos y capsulas del submareal de la localidad de GN y ejemplares del intermareal (Capítulo 4).

Todas las campañas fueron diurnas y duraron un ciclo de marea, en la cual los dispositivos de medición de variables físicas estuvieron registrando datos. En GN se realizaron 9 campañas en los sitios: Punta Este ( $42^{\circ} 47'S$ -  $64^{\circ} 57'O$ ), Punta Loma ( $42^{\circ} 48'S$ -  $64^{\circ} 53'O$ ) y Ambrossetti ( $42^{\circ} 49'S$ -  $64^{\circ} 51'O$ ). En ellas, además se realizaron las capturas de fotos en las zonas del intermareal donde habitan las especies de interés y recolección de organismos en el intermareal y submareal. En RW se realizaron 4 campañas en los sitios: Playa Bonita ( $43^{\circ} 21' S$ -  $65^{\circ} 02'O$ ), Cangrejales ( $43^{\circ} 23' S$ -  $65^{\circ} 02'O$ ) y Santa Isabel ( $43^{\circ} 25'S$ -  $65^{\circ} 04'O$ ), realizando los mismos trabajos de toma de datos, toma de fotos y recolección de organismos en el intermareal. Por cuestiones logísticas, particularmente de mala visibilidad debido a la influencia de la descarga de agua dulce del río Chubut, en esta localidad no se pudo trabajar en el submareal de ninguno de los tres sitios. En BC se concretaron 5 campañas donde se trabajó en el intermareal de tres sitios: Playa Elola ( $44^{\circ} 54'S$  -  $65^{\circ} 33'O$ ), Playa los Algueros ( $44^{\circ} 50'S$  -  $65^{\circ} 43'O$ ) y Caleta Carolina ( $44^{\circ}54'S$  -  $65^{\circ} 36'O$ ). En dos de las tres playas se logró trabajar en el submareal, aunque no en cada evento de muestreo, ya que en algunas las condiciones climáticas no lo permitieron.

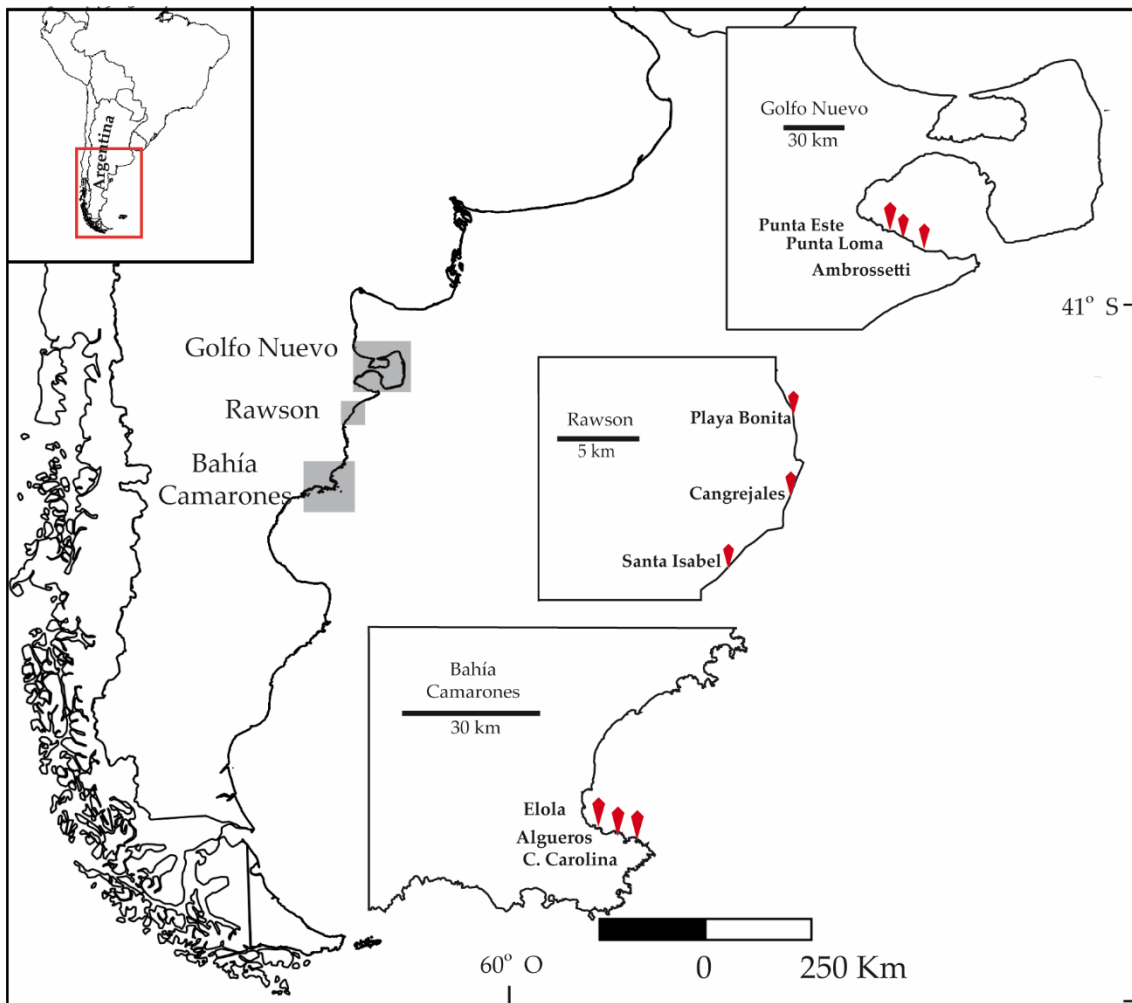


Figura III: Localización geográfica de los sitios de muestreo de cada localidad: Punta Este, Punta Loma y Ambrossetti en Golfo Nuevo (GN). Playa Bonita, Cangrejales y Santa Isabel en Rawson (RW). Elola, Algueros y Caleta Carolina en Bahía Camarones (BC).

– Capítulo 1

Caracterización del ambiente costero  
patagónico

## 1.1 Introducción

La comunidad intermareal se modela por presiones bióticas o ambientales que interactúan de diferente manera, a lo largo del tiempo numerosos estudios enriquecieron la discusión sobre la importancia relativa de estos factores (Menge y Branch 2001; Bertness *et al.* 2006; Hidalgo *et al.* 2007; Silliman *et al.* 2011; Rechimont *et al.* 2013; Márquez *et al.* 2015). Sin embargo, el grado de influencia de estos sobre el entramado de la comunidad aún permanece en discusión (Fariña *et al.* 1997). Dentro de los intermareal rocoso del hemisferio sur, debido a sus amplias mareas, las comunidades que los habitan hacen frente a un gradiente de factores físicos para mantener su equilibrio (Dayton 1971; Bertness *et al.* 2006). Siendo los más importantes los efectos de la fuerza de olas y la desecación (Dayton 1971; Denny y Wethey 2001; Tomanek y Helmuth 2002; Bertness *et al.* 2006). Sin embargo, las diferentes condiciones ambientales dentro de un mismo intermareal modelan la comunidad en distintas zonas, siendo las condiciones abióticas más importantes en las zonas media y alta, mientras que las bióticas (como la depredación) en la baja (Connell 1961; Dayton 1971). La zonación es, por lo tanto, el resultado de las adaptaciones de los distintos individuos a estas fuerzas físicas que rigen la abundancia, diversidad, biomasa y riqueza de especies a lo largo del gradiente vertical (Menge y Branch 2001; Raffaelli y Hawkins 2012).

Las altas temperaturas y la cantidad de horas de exposición a la desecación en los estratos superiores, causa una limitación en la reproducción y el crecimiento de los organismos que lo habitan (Menge *et al.* 2002; Petes *et al.* 2007). El intermareal alto, es una zona de baja riqueza de especies, donde uno de los factores más restrictivos es la deshidratación (Harley 2007; Raffaelli y Hawkins 2012). En esta zona los organismos más exitosos son los que pueden cerrarse herméticamente en sus conchas para guardar humedad (Harley 2007; Pöhlmann *et al.* 2011) como el caso del cirripedio invasor, *Balanus glandula* y la falsa lapa, *Siphonaria lessonii* (Schwindt 2007; Livore *et al.* 2018). En el intermareal medio, descubierto dos veces al día en cada ciclo de mareas, suelen dominar los bivalvos filtradores (Harley 2007). Estos organismos modifican el ambiente físico, alterando el número de especies y su abundancia (Jones *et al.* 1994), generando una capa protectora para

ovicápsulas y juveniles de numerosas especies. Entre las especies que habitan esta zona, se destacan mitílidos, lapas, quitones, isópodos, cangrejos y predadores tope como caracoles perforantes y estrellas de mar (Harley 2007). En el intermareal bajo, donde el período en que se descubre es el más corto, se encuentra una gran diversidad de algas (Raffaelli y Hawkins 2012). También, se encuentra un gran número de invertebrados que se ven favorecidos tanto por la protección y constante humedad otorgada por algas coralinas (Kelaheer *et al.* 2007) así como por tener acceso a los nutrientes que circulan en las aguas costeras (Levinton 1995). Algunos ejemplos son las esponjas, tunicados, lapas, quitones, erizos y depredadores como estrellas de mar, gasterópodos, nudibranquios y pulpos (Harley 2007). Estas condiciones más homogéneas y de menor exposición a la desecación en la zona baja, crean un ambiente óptimo para el asentamiento de numerosos individuos (Bertness *et al.* 2001). Como consecuencia, se encuentra una elevada presión por competencia en la zona baja (Silliman *et al.* 2011) que desplaza a aquellas especies menos competentes a estratos superiores de mayor estrés físico (Connell 1961).

Si bien este patrón de zonación está muy extendido mundialmente, se desdibuja y pierde cuando vamos de una costa expuesta al oleaje a otra protegida (Menge y Branch 2001; Raffaelli y Hawkins 2012). El grado de exposición a las olas y la complejidad topográfica, modifica el hábitat multiplicando o disminuyendo el número de refugios para los organismos (Menge y Branch 2001). Un aumento de microhábitats crea grandes diferencias en la magnitud de las presiones físicas causadas por olas y vientos en escalas que van de centímetros a kilómetros (Menge 1992). Los efectos que tienen estos factores físicos dentro de una comunidad dependen de su magnitud, duración y frecuencia (Bertness *et al.* 2001). Los disturbios frecuentes e intensos disminuyen dramáticamente la diversidad de especies, en cambio los disturbios intermedios maximizan la diversidad de una comunidad (Sousa 1979). En Patagonia, los intermareales rocosos tienen una desecación tan elevada que los ubica dentro de los más estresantes del mundo, a su vez la intensidad de la misma varía en gran medida en función del grado de exposición de cada costa (Bertness *et al.* 2006). Dentro de un intermareal rocoso,

la coexistencia de especies con requerimientos similares de recursos, no se logra a través de mecanismos de diferenciación en el uso de los mismos, sino debido a la acción de agentes perturbadores físicos (Sousa 1979).

Teniendo en cuenta que cada ambiente tiene la más alta medida de vida que puede ser producida y mantenida (teoría biocenótica) (Volvenko 2012), este capítulo tiene como objeto caracterizar los ensambles de los sitios muestreados y cuantificar los factores de estrés físico que operan sobre cada comunidad intermareal seleccionada.

## **1.2 Objetivo:**

Describir y comparar estacionalmente, durante un año la dinámica de las principales variables físico químicas en ensambles intermareales y submareales someros a lo largo de un gradiente latitudinal donde habitan los gasterópodos *Tegula patagonica* y *Trophon geversianus*.

## **1.3 Hipótesis:**

Las diferencias latitudinales y climáticas entre Golfo Nuevo, Rawson y Bahía Camarones, generan diferentes condiciones ambientales produciendo un estrés físico diferente para los organismos.

## **1.4 Predicción:**

Las áreas de muestreo localizadas más al sur (Rawson y Bahía Camarones) tendrán mayores variaciones en temperatura, pH, salinidad, fuerza de olas y desecación que las áreas de muestreo del norte (Golfo Nuevo). A su vez, mostrarán una menor riqueza y abundancia de especies.

## 1.5 Materiales y métodos:

### 1.5.1 Descripción de los sitios de estudio

En la localidad de GN los tres sitios seleccionados se encuentran emplazados sobre la formación La Colonia (Pesce 1979), conformada por rocas sedimentarias. En cada sitio seleccionado, el intermareal se encontró sobre una columna constituida por areniscas limosas, conglomerados y calizas (Haller *et al.* 2017). Este tipo de rocas se caracteriza por tener una elevada erosión eólica y pluvial, creando ambientes dinámicos que se encuentran en cambio constante (Tarbuck y Lutgens 2003). El sitio Punta Este ( $42^{\circ} 47'S$ -  $64^{\circ} 57'O$ ) se encuentra cercano a la ciudad de Puerto Madryn y se utiliza como un área de recreación preferentemente por público local. El sitio Punta Loma ( $42^{\circ} 48'S$ -  $64^{\circ} 53'O$ ) es un área protegida, de 1707 hectáreas creada en 1967 por ley provincial (N° 697 artículo 1) en forma conjunta a las áreas protegidas Punta Norte e Isla de los Pájaros. Por último, el sitio Ambrossetti ( $42^{\circ} 49'S$ -  $64^{\circ} 51'O$ ) se encuentra en la punta de una bahía y es el sitio más cercano a la boca del Golfo Nuevo.

En la localidad de RW los tres sitios seleccionados se encuentran sobre rocas sedimentarias, donde se distinguen areniscas consolidadas y conglomerados (Ichazo 2001). Este tipo de sustrato es resistente a la erosión creando ambientes estables (Tarbuck y Lutgens 2003). Los primeros dos sitios Playa Bonita ( $43^{\circ} 21' S$ -  $65^{\circ} 02'O$ ) y Cangrejales ( $43^{\circ} 23' S$ -  $65^{\circ} 02'O$ ) se encuentran protegidos del mar por una formación de conglomerado. Ambos sitios se utilizan como áreas recreativas por lugareños. El sitio Santa Isabel ( $43^{\circ} 25'S$ -  $65^{\circ} 04'O$ ) se encuentra expuesto al mar y el intermareal rocoso se encuentra rodeado de una playa de grava. En la zona se encuentra un apostadero itinerante de elefantes marinos y la zona se utiliza como sitio de pesca.

Los tres sitios seleccionados dentro de la localidad de BC se encuentran sobre el complejo denominado Marifil, compuesto de rocas riolitas, leucoriolitas, ignimbritas, pórfiros riolíticos, tobas y brechas (Lema *et al.* 2001). Particularmente en esa sección de la formación se encontró una elevada proporción de sílice que les confiere una elevada dureza (Haller *et al.* 1990). Este tipo de rocas de elevada

dureza, determina que cada sitio tenga un muy bajo efecto de modelado por abrasión (eólica o marina) (Tarbuck y Lutgens 2003). El sitio Playa Elola ( $44^{\circ} 54'S$  -  $65^{\circ} 33'O$ ) se encuentra en el extremo de una bahía y es utilizado para la pesca. El sitio Playa los Algueros ( $44^{\circ} 50'S$  -  $65^{\circ} 43'O$ ) está formado por grandes rocas densamente pobladas de algas y en las cuales se adhieren los organismos del intermareal. Por último, el sitio Caleta Carolina ( $44^{\circ}54'S$  -  $65^{\circ} 36'O$ ) posee un intermareal protegido hacia los laterales por la costa.

### 1.5.2 Recolección de datos

Se muestrearon un total de 9 sitios, 3 pertenecientes a cada localidad. En cada uno de ellos se registraron datos puntuales y se colocaron dispositivos de registros continuos para caracterizar cada una de las tres localidades. A su vez, se extrajeron datos de estaciones meteorológicas, se incorporaron datos satelitales y se estimaron la altura de olas y el grado de exposición al oleaje y viento cada sitio.

1.5.2.1 Datos puntuales: Para cuantificar la fuerza de las olas (Bell y Denny 1994) sobre el intermareal medio, se construyeron 16 dinamómetros probados para su uso en el intermareal en estudios previos (Fuji 1988). Los dinamómetros fueron colocados durante un ciclo de mareas (Figura 1.1 A). El viento se registró mediante un anemómetro manual que se posicionó siempre con el registrador hacia el mar a dos alturas, una a aproximadamente 1,80 m y la otra sobre el sustrato siempre en la zona media del intermareal (Figura 1.1 B). La salinidad se registró con un refractómetro de campo, en cada evento de muestreo se tomaron tres registros de los cuales se obtuvo un promedio (Figura 1.1 C). La desecación se estimó con 5 esponjas florales (de 5 cm x 5 cm y 2 cm de ancho) saturadas con agua (Figura 1.1 D), las cuales se colocaron en una zona expuesta del intermareal alto. De cada esponja se registró su peso inicial y final, la pérdida de peso se estimó como el porcentaje de desecación por hora (Bertness *et al.* 2006).

1.5.2.2 Datos continuos: Con el objeto de conocer las fluctuaciones en la temperatura en dos sectores (expuesto y protegido) dentro del intermareal medio, se colocaron 2 registradores de temperatura por localidad que fueron dejados fijos mediante la utilización de clavos y/o tornillos con tarugos dependiendo del sustrato.

Los sectores fueron adyacentes (menor a 1 m) y fueron revisados periódicamente para la extracción de los datos (Figura 1.1 F). Los registradores fueron programados para almacenar un dato por hora.

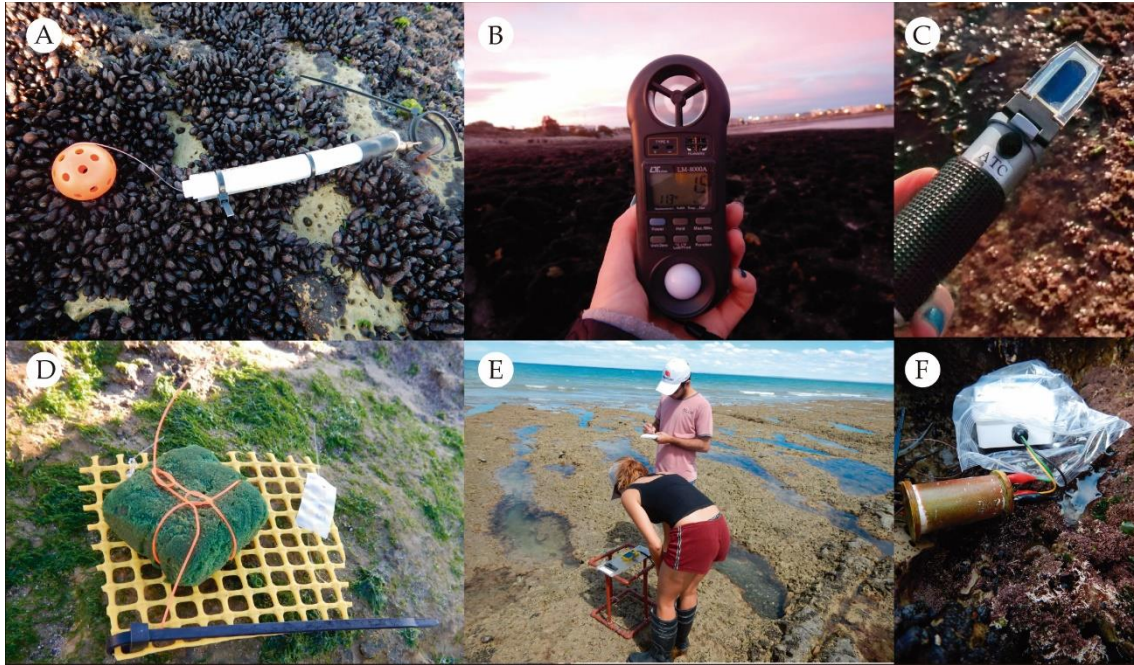


Figura 1.1: Materiales utilizados en el campo para registrar variables físicas. A- Dinamómetro, B- Anemómetro, C- Refractómetro, D- Esponjas para medición de desecación, E- Foto cuadrante y F- Registradores de temperatura fijo al intermareal y detalle de acople *bluetooth* para extracción de datos.

1.5.2.3 Eventos extremos: En la localidad de GN, se eligieron tres días donde el pronóstico del tiempo ([www.windguru.cz](http://www.windguru.cz)) indicaba temperaturas superiores a 30 °C y se registraron las temperaturas corporales de *T. patagonica* y *T. geversianus*. Para ello se utilizó una cámara termográfica modelo Flir C2, mediante la cual se capturó una imagen digital con datos de temperatura de 5 individuos de cada especie por día (Figura 1.2). La información térmica de cada imagen fue analizada con el *software* Flir Tools.

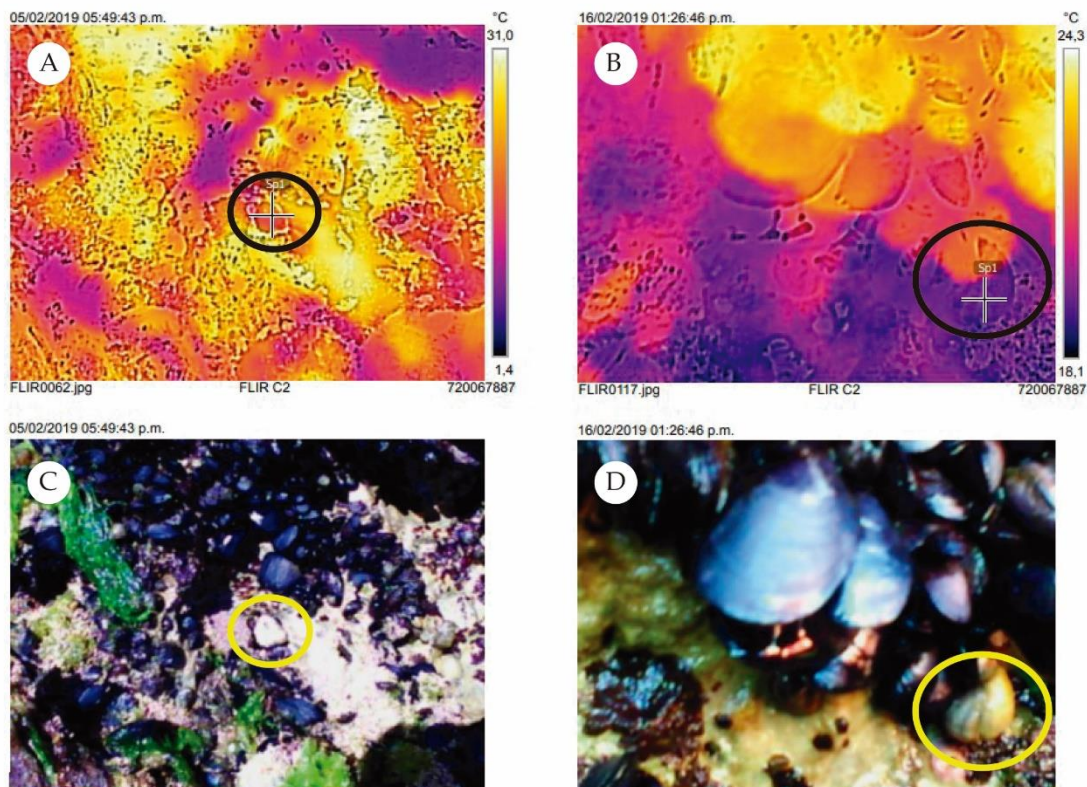


Figura 1.2: Detalle del registro de temperaturas mediante el uso de imágenes: en el extremo superior las imágenes de la cámara térmica y debajo las fotográficas. A-C- Imagen tomada en el intermareal bajo sobre un ejemplar de *Tegula patagonica* (círculo). B-D- Imagen tomada en el intermareal medio sobre un ejemplar de *Trophon geversianus* (círculo).

1.5.2.4 Centrales meteorológicas: Para describir las condiciones físicas de cada localidad se trabajó con datos obtenidos de las centrales meteorológicas del el CCT-CENPAT para GN, de la Estación Fotobiológica de Playa Unión en RW y del Centro de Información Meteorológica para BC, (los datos obtenidos fueron los de la central más cercana a la zona de estudio, ubicada a 160 km al sur). Se trabajó con registros mensuales para el año 2017.

1.5.2.5 Modelos: La altura de las olas de cada sitio fue extraída de la plataforma Windy.tv ([www.windy.com](http://www.windy.com)). Dado que el modelo no presenta mucha sensibilidad a poca distancia, se realizaron medias con todos los valores de los sitios para trabajar con un solo valor por localidad. Por otro lado, el grado de exposición de cada costa se estimó con la función *Fetch* en R utilizando la librería *fetchR* (Blake 2018), sobre un mapa de la provincia de Chubut georreferenciado (Burrows

*et al.* 2008), siguiendo metodologías descritas previamente. Este cálculo nos da una medida del grado de exposición al viento y al oleaje de sitios en la línea de costa, se calcula como la longitud de agua sin obstrucciones (alcance) sobre la cual puede soplar el viento desde cierta dirección. Mediante vectores equiangulares en todas las direcciones, se estima el viento promedio que puede sufrir cada costa. El alcance máximo considerado fue de 200 km, esta distancia corresponde al "punto de transición" donde el alcance es lo suficientemente largo como para crear olas completamente desarrolladas (Harborne *et al.* 2006; Burrows *et al.* 2008). Dado que la suma de datos locales robustece el cálculo de exposición por la función *Fetch* (Burrows *et al.* 2008), se decidió desestimar las direcciones de viento en cada sitio, que no producen olas en base a las proyecciones estimadas por la función.

1.5.2.6 Datos satelitales oceánicos: Se obtuvieron los promedios mensuales de salinidad (PSU), temperatura del agua (°C), pH, nitratos (ppm), clorofila ( $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ ) y calcita ( $\text{mol} \cdot \text{m}^{-2}$ ) a partir de capas *raster* de la base de datos BioOracle (<http://www.oracle.ugent.be/> (Tyberghein *et al.* 2012)), con una resolución espacial de aproximadamente 9,2 km. Las capas fueron analizadas en el programa computacional QGIS (2.14.3-Essen), donde se extrajeron los datos de interés en cada sitio.

1.5.2.7 Ensamble de la comunidad: Para estudiar el ensamble de la comunidad, se construyó un foto cuadrante (soporte que sostiene el objetivo de la cámara a una distancia fija sobre un cuadrante de 25 cm x 25 cm) y se capturaron imágenes en las zonas medias (donde habita *T. geversianus*) y bajos (donde habita *T. patagonica*) (Figura 1.1 E). Para determinar el número de fotos necesarias para no subestimar la riqueza ni diversidad de cada comunidad, se realizó una curva de saturación de especies (Ugland *et al.* 2003). Finalmente se utilizaron 10 fotos en cada una de las zonas, dentro de los tres sitios de cada una de las tres localidades (GN, RW y BC) durante el verano y el invierno del 2017. El programa computacional utilizado fue el CPCe (*Coral Point Count with excel extensions* 4.1; Sousa 1979) para conteo de especies sésiles. En el mismo se utilizó una grilla de 100 puntos distribuidas equidistantemente (Figura 1.3), donde se registraron las especies sésiles

presentes en cada punto, las algas y los organismos que se encontraron fueron identificados hasta el menor nivel taxonómico posible.

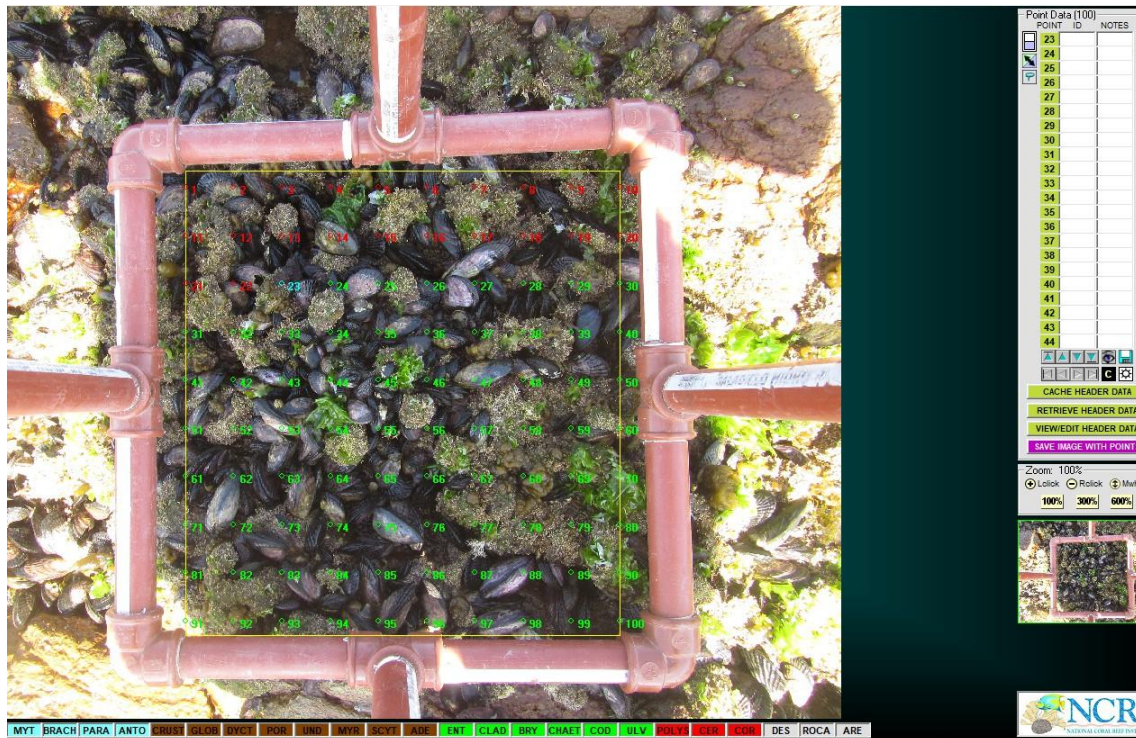


Figura 1.3: Imagen tomada en el intermareal medio analizada mediante el programa CPCe utilizando una grilla de 100 puntos superpuesta.

### 1.5.3 Análisis estadístico

Para conocer la variabilidad entre los sitios dentro de cada localidad, se realizaron diagramas de cajas, mostrando las medias y los desvíos estándares de cada variable puntual registrada a lo largo de un año. Se realizó un análisis ANOVA para comparar las medias de cada variable, previamente se pusieron a prueba los supuestos de normalidad y homocedacia (prueba de Lillifors y Levenne, respectivamente) realizando transformaciones para corregir los datos en los casos necesarios. Cuando se encontraron diferencias significativas entre las medias, se realizó un test de contrastes a *posteriori* (Bonferroni) y en los casos de falta de homocedacia se trabajó con comparaciones no paramétrica (test de Kruskal Wallis) en el programa estadístico computacional InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011). De los 24 valores de temperatura diarias almacenados por los registradores de temperatura se seleccionó el valor máximo y mínimo de cada día y se compararon sus medias estacionales entre cada uno de los sectores (expuestos y protegidos)

del intermareal. Las medias de los registros máximos y mínimos fueron comparadas con un análisis de la varianza ANOVA y se graficaron por sector del intermareal en el programa InfoStat. Además, para conocer la variación anual de la temperatura, se graficaron los 24 registros diarios de cada sector. Para el análisis de los eventos extremos, se compararon las medias de temperatura tomada por la cámara termográfica con una prueba T-Student en el programa GraphPad Prism versión 5 (CA, EE.UU.). Las medias anuales de viento y temperatura registradas por las estaciones meteorológicas se compararon con un análisis de la varianza ANOVA y se realizaron comparaciones a *posteriori* con una prueba de Tukey en el programa InfoStat. En el caso de la altura de olas y la exposición de las costas, se compararon las medias con un análisis de la varianza ANOVA en el programa InfoStat.

Para el análisis de la comunidad se trabajó sobre la matriz de abundancia de especies extraída de cada zona del intermareal, de cada sitio y localidad, por estación. Esta matriz fue analizada con el programa PRIMER (*Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research*; (Clarke y Warwick 1994)), donde se realizó un pre tratamiento de los datos (raíz cuarta) para quitar el peso de las especies más dominantes antes de calcular el índice de disimilitud de Bray-Curtis. Este índice se utiliza para cuantificar la diferencia de composición entre dos sitios diferentes, según los recuentos en cada sitio (Clarke y Warwick 1994). Sobre todos los datos de abundancia de especies, se realizó un ordenamiento de las muestras mediante un escalamiento multidimensional no métrico (n-MDS por sus siglas en inglés). El análisis de ordenamiento no paramétrico, n-MDS, utiliza un procedimiento iterativo que construye un gráfico con las variables ordenadas a lo largo de dos ejes. El proceso de iteración se interrumpe cuando las posiciones de los puntos satisfacen de la mejor manera posible las relaciones de similitud entre las muestras. De manera que las organiza en un gráfico bidimensional donde las muestras más similares aparecen más cercanas entre sí. Este análisis tiene asociada una medida de la bondad de la representación bidimensional, un valor denominado estrés (Kruskal y Wish 1978). Finalmente, la estructura de la comunidad fue comparada entre localidades y sitios usando PERMANOVA (análisis de varianza multivariado, con base en permutaciones). Se realizó un diseño multivariado de cuatro niveles:

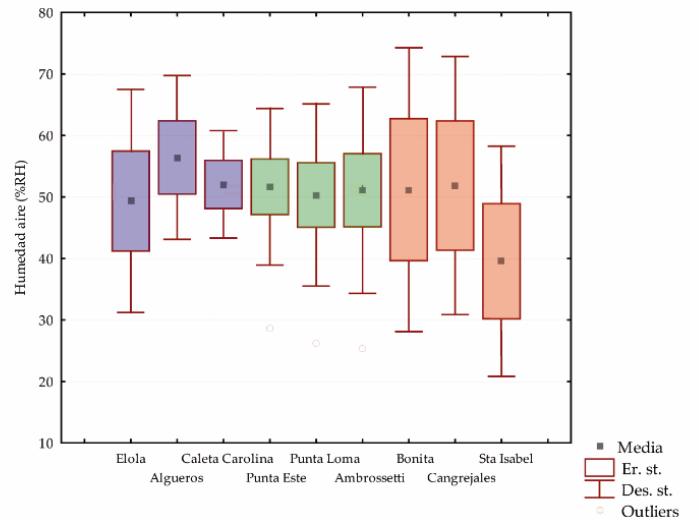
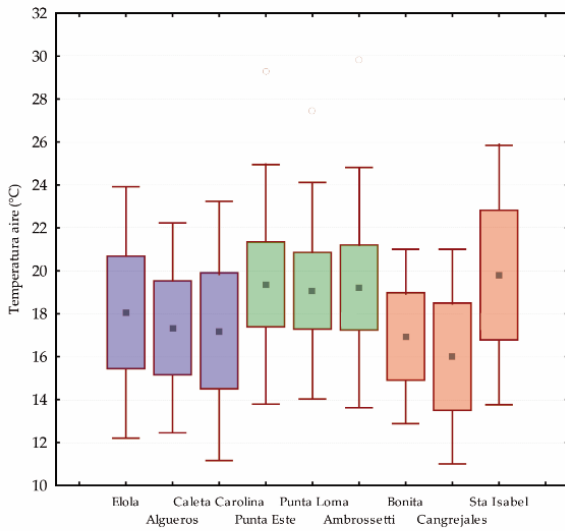
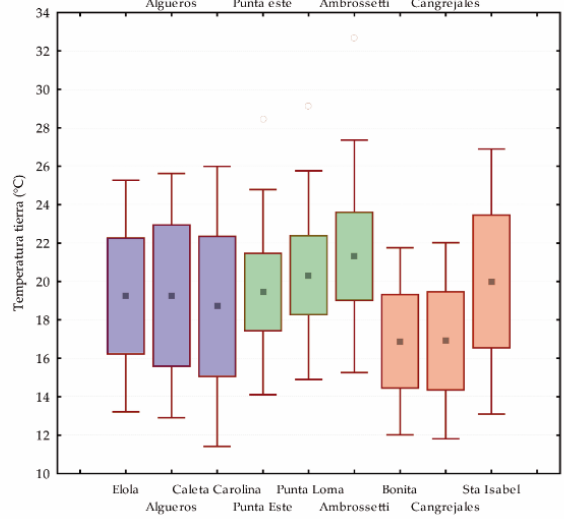
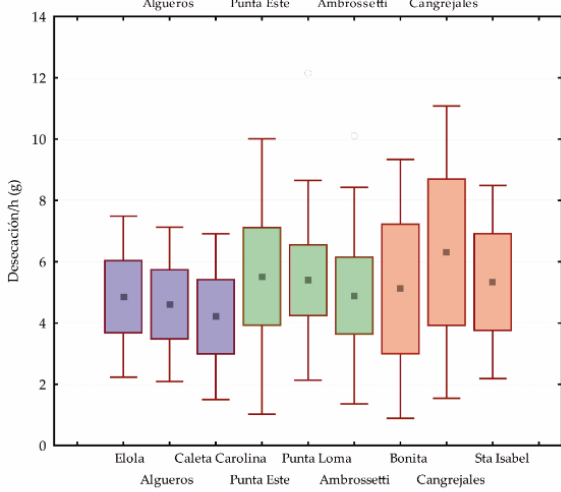
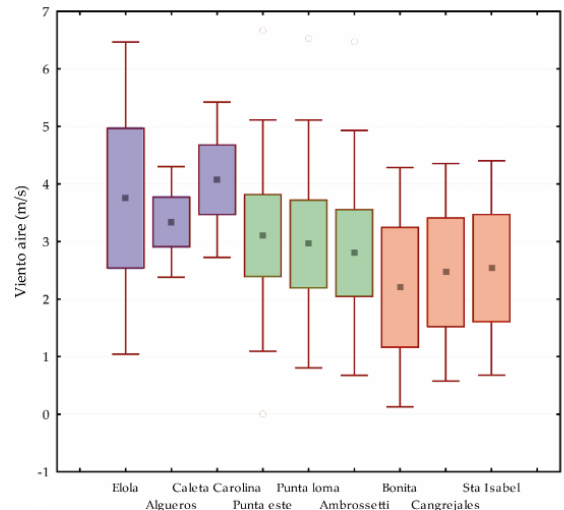
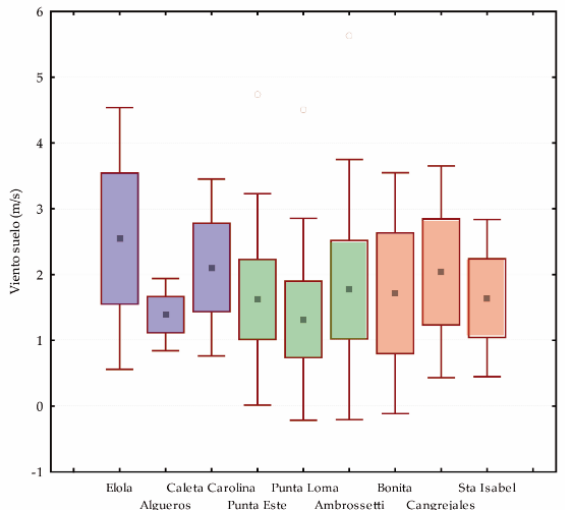
Estación (**verano, invierno**), Localidad (**GN, RW, BC**), Sitio (GN: **PE, PL, AM**; RW: **BN, CR, ISA**; BC: **EO, AL, CC**) y Zona del intermareal (**media, baja**). Donde se tomaron como factor anidado a los sitios dentro de las localidades. Los factores fijos fueron las Estaciones, las Localidades y las Zonas del intermareal. Frente a la significancia en la diferencia de medias, se realizaron test a posteriori de a pares. Por último, se graficó mediante histogramas riqueza el número de especies.

## 1.6 Resultados

### 1.6.1 Datos Puntuales: Condiciones físicas encontradas en los sitios de cada localidad

Se compararon las medias obtenidas luego de los muestreos en cada sitio para evaluar su uso como réplicas dentro de cada localidad (Figura 1.4, Tabla 1.1). Los resultados se agruparon en gráficos de cajas según el origen de los datos, las variables de desecación: viento del suelo, viento del aire y desecación, no presentaron diferencias significativas entre cada una de los sitios de cada localidad. Las variables de temperatura de la tierra, del aire y humedad tampoco presentaron diferencias significativas, aunque en la localidad de RW la temperatura del sitio Sta. Isabel siempre fue más elevada y su humedad menor. En el caso de las variables marinas, fuerza de olas, temperatura y salinidad, se encontraron diferencias significativas entre los sitios de la localidad GN en la fuerza de las olas, donde la mayor media encontrada fue en la playa de Punta Loma ( $11,92 \text{ N}$ ). En el caso de RW no se registraron diferencias entre las medias de las variables marinas. En la localidad de BC, si bien se registraron valores muy elevados en el sitio de Elola ( $21,96 \pm 22,73 \text{ N}$ ) en comparación a Algüeros ( $15,61 \pm 7,60 \text{ N}$ ) y Caleta Carolina ( $10,40 \pm 1,05$ ), la gran dispersión de los datos no los hizo diferentes significativamente.

# Capítulo 1: Caracterización ambiental



## Capítulo 1: Caracterización ambiental

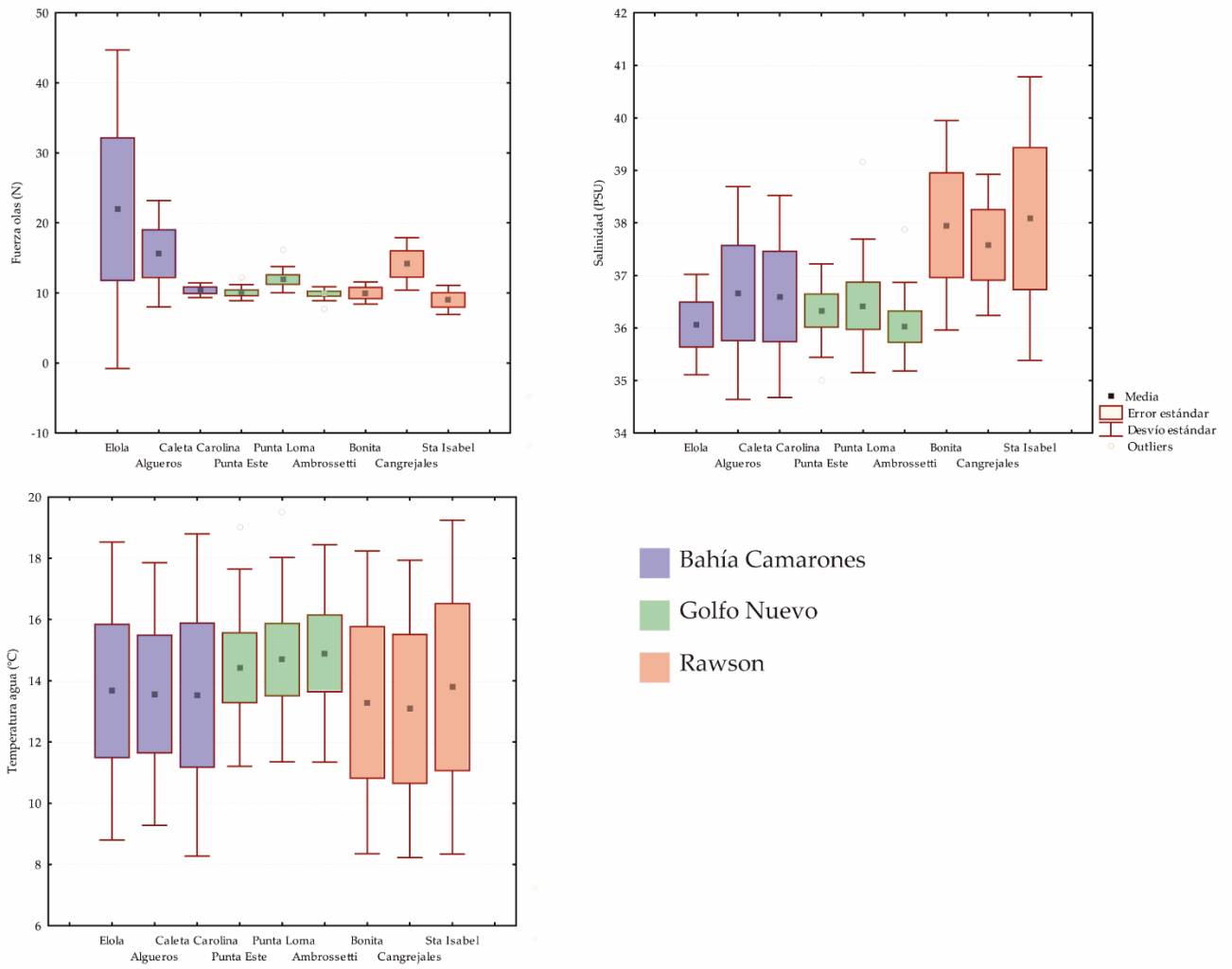


Figura 1.4: Diagrama de cajas con la media en el centro, error estándar marcado con la caja y desvío estándar con las barras. Se grafica la media anual de cada variable para cada sitio, cada color representa una localidad.

Tabla 1.1: Resultado de las comparaciones de medias por la prueba ANOVA de una vía entre las medias de los sitios. Los resultados significativos se describen en **cursiva**, a los cuales se les practicó una prueba de Bonferroni a posteriori.

Loc.	Sitio	Viento Suelo (m/s)	Viento Aire (m/s)	deseccación (g/h)	Temp. Aire (°C)	Temp. Agua (°C)	Temp. Tierra (°C)	Salinidad (PSU)	F olas (N)	Hum. Aire (%RH)	Hum. Suelo (%RH)
GN	Punta Este	p=0,88;	p=0,95;	p=0,94;	p=0,99;	p=0,96;	p=0,82;	p=0,72;	<b><i>p=0,01;</i></b>	p=0,98;	p=0,63;
	Punta Loma	F <sub>2,20</sub> =0,13	F <sub>2,23</sub> =0,04	F <sub>2,23</sub> =0,08	F <sub>2,23</sub> =0,01	F <sub>2,23</sub> =0,04	F <sub>2,20</sub> =0,19	F <sub>2,23</sub> =0,33	<b><i>F<sub>2,23</sub>=5,31</i></b>	F <sub>2,23</sub> =0,02	F <sub>2,20</sub> =0,47
	Ambrossetti										
RW	Bonita	p=0,92;	p=0,96;	p=0,90;	p=0,56;	p=0,97;	p=0,68;	p=0,93;	p=0,98;	p=0,66;	p=0,21;
	Cangrejales	F <sub>2,11</sub> =0,07	F <sub>2,11</sub> =0,03	F <sub>2,11</sub> =0,1	F <sub>2,11</sub> =0,6	F <sub>2,11</sub> =0,02	F <sub>2,11</sub> =0,4	F <sub>2,11</sub> =0,06	F <sub>2,11</sub> =0,2	F <sub>2,11</sub> =0,43	F <sub>2,11</sub> =1,81
	Sta. Isabel										
BC	Elola	p=0,53;	p=0,82;	p=0,92;	p=0,96;	p=0,99;	p=0,99;	p=0,83;	p=0,44;	p=0,72;	p=0,63;
	Algueros	F <sub>2,11</sub> =0,68	F <sub>2,14</sub> =0,2	F <sub>2,14</sub> =0,08	F <sub>2,14</sub> =0,03	F <sub>2,14</sub> =0,001	F <sub>2,8</sub> =0,01	F <sub>2,14</sub> =0,19	F <sub>2,14</sub> =0,87	F <sub>2,14</sub> =0,33	F <sub>2,11</sub> =0,48
	Caleta Carolina										

### 1.6.2 Datos Continuos: Condiciones físicas encontradas en cada localidad

Se obtuvieron diferente cantidad de datos de temperatura registrados para distintos años en cada localidad. Esto ocurrió, ya que algunos registradores fueron extraviados debido a la falla de los elementos de sujeción o a efectos antrópicos. Se muestran los resultados estadísticos y un ejemplo gráfico del año con mayor número de registros tomados.

Durante el 2018 en GN se observaron diferencias significativas entre la temperatura MAX y MIN media del sector expuesto y protegido (Tabla 1.2). A lo largo de todas las estaciones los registros máximos fueron significativamente mayores en el sector expuesto del intermareal. Por otro lado, las MIN mostraron un cambio de tendencia en la mitad del año, durante verano y otoño no presentaron diferencias entre los sectores expuestos y protegidos. Durante el invierno y la primavera las MIN del sector protegido fueron significativamente superiores (Tabla 1.2). A lo largo de este año se registraron temperaturas bajo cero durante más de la mitad del mismo, en las estaciones de otoño, invierno y primavera (Figura 1.5). Se observó una mayor fluctuación en los registros de temperatura del sector expuesto, a diferencia del sector protegido, sobre todo en las estaciones de otoño e invierno (Figura 1.6).

Tabla 1.2: Medias, desvíos, registros más altos y más bajos en los valores máximos y mínimos de temperatura por estación para cada sector del intermareal de GN durante el 2018. Resultado de una prueba de ANOVA para las medias de cada variable entre sectores. Los resultados significativos se marcan en *cursiva*.

Estación	Sector	Variable	n	Media	D.E.	Mín.	Máx.	F	p
Verano	Expuesto	MAX	92	26,68	5,17	16,13	36,31	7,13	<i>0,0083</i>
Verano	Protegido	MAX	91	24,52	5,74	15,81	35,00		
Verano	Expuesto	MIN	92	12,85	3,20	4,13	24,75	0,26	0,6137
Verano	Protegido	MIN	91	13,07	2,83	4,88	23,50		
Otoño	Expuesto	MAX	92	18,02	5,37	10,81	34,31	11,65	<i>0,0008</i>
Otoño	Protegido	MAX	92	15,82	3,10	12,08	29,25		
Otoño	Expuesto	MIN	92	6,53	4,13	-0,63	14,94	1,81	0,1798
Otoño	Protegido	MIN	92	7,31	3,72	0,57	14,81		
Invierno	Expuesto	MAX	93	16,66	5,00	9,69	26,56	83,48	<i>&lt;0,0001</i>
Invierno	Protegido	MAX	93	11,64	1,76	9,75	17,63		
Invierno	Expuesto	MIN	93	4,41	2,95	-4,75	9,19	14,20	<i>0,0002</i>
Invierno	Protegido	MIN	93	5,92	2,50	-0,95	9,81		
Primavera	Expuesto	MAX	88	23,03	5,67	10,75	33,63	24,03	<i>&lt;0,0001</i>
Primavera	Protegido	MAX	89	18,92	5,48	10,25	30,38		
Primavera	Expuesto	MIN	88	9,16	2,70	2,00	14,06	7,69	<i>0,0062</i>
Primavera	Protegido	MIN	89	10,24	2,48	3,88	14,00		

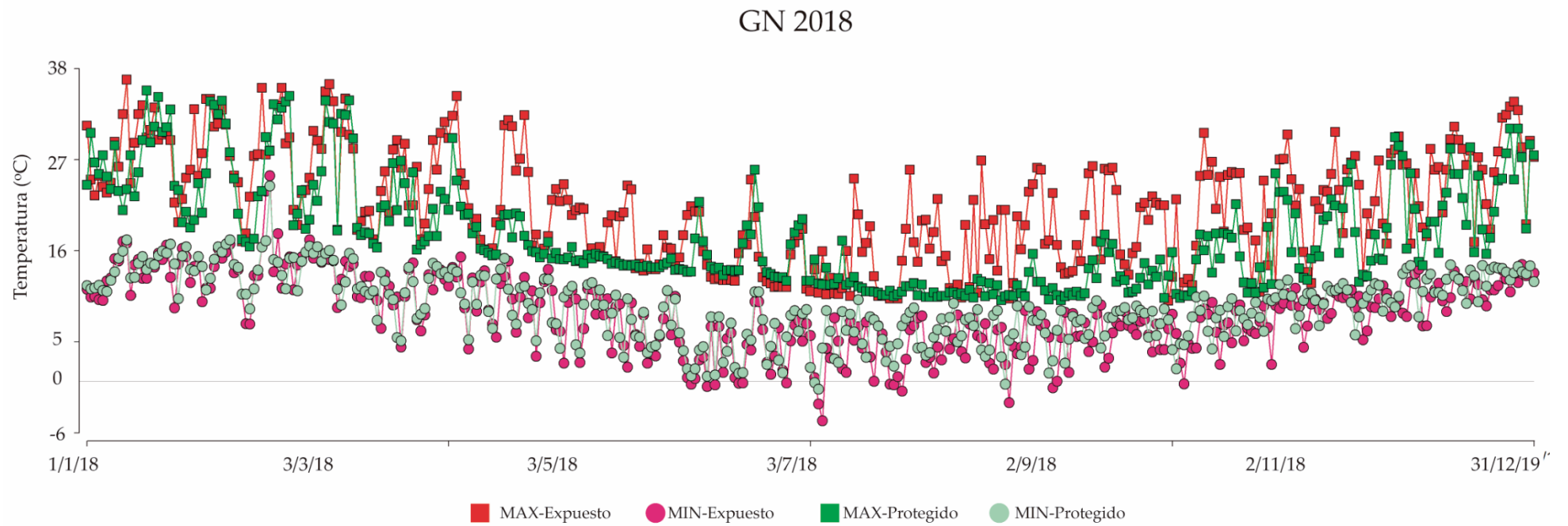


Figura 1.5: Registros de temperaturas máximas (MAX) y mínimas (MIN) para los sectores expuestos y protegidos del intermareal de GN durante el 2018.

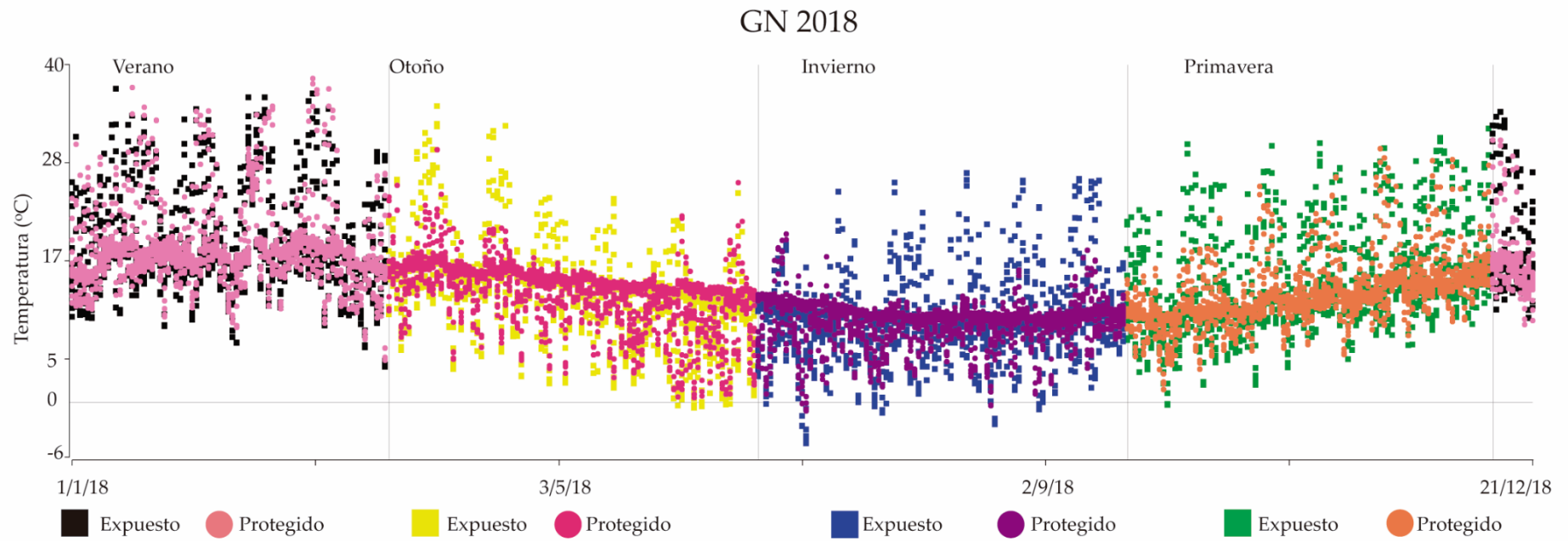


Figura 1.6: Gráfico de temperatura anual para el GN durante el 2018. Se grafican 24 registros por día para los sectores Expuesto y Protegido.

En los tres eventos (04/02/2019, 05/02/2019 y 16/02/2019) de elevada temperatura seleccionados en GN para el verano del 2019, se registró una diferencia significativa en la temperatura del cuerpo entre las especies de caracoles muestreados. Frente a la misma temperatura ambiental, la temperatura del cuerpo de *T. patagonica* en dos de los tres eventos fue significativamente superior que la de *T. geversianus* (Figura 1.7).

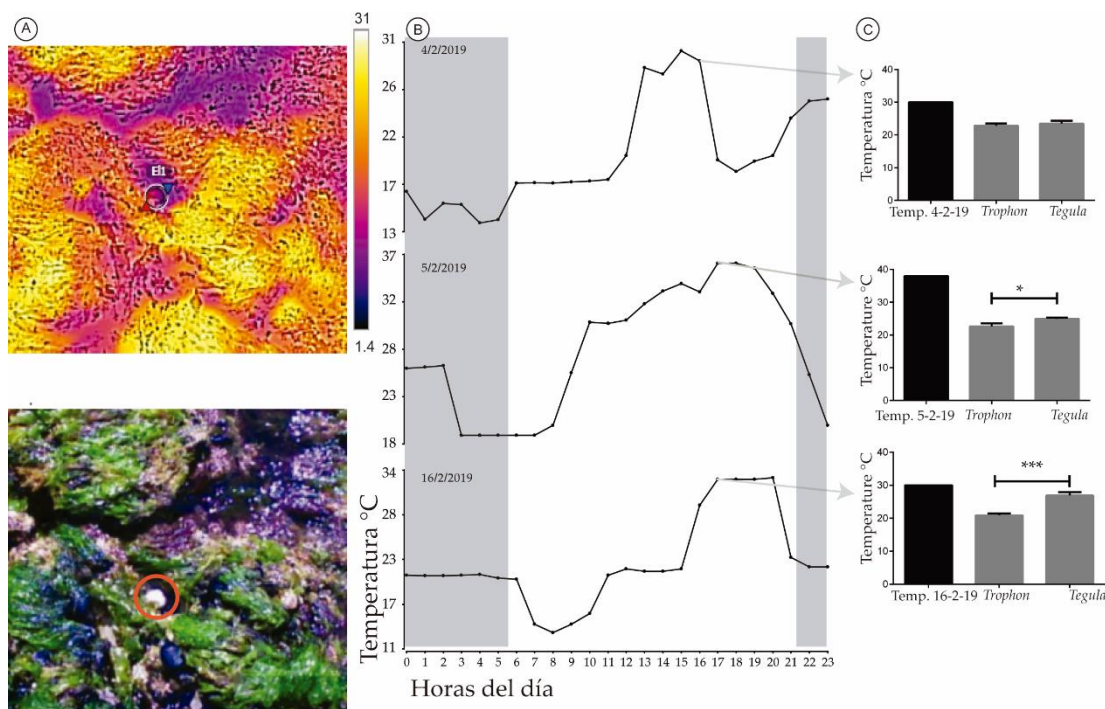


Figura 1.7: A- Detalle de la obtención del dato de temperatura corporal mediante la cámara termográfica para un individuo de *Tegula patagonica*. B- Registro de la temperatura del día por hora, en gris se marcan las horas correspondientes a la noche. C- Media de temperatura diaria registrada en el cuerpo de cada especie. El número de individuos analizados fue de 5 por especie. En negro se grafica la temperatura ambiental al momento en que se tomaron las fotografías. El asterisco indica diferencias significativas en la temperatura media del cuerpo, (T-Student, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Durante el 2017 en RW se perdió el registrador de temperatura ubicado en el sector protegido en la mitad del año. Dentro de las estaciones registradas, se observaron diferencias significativas entre la temperatura MAX media del sector expuesto y protegido (Tabla 1.3). Tanto en otoño como en invierno las MAX fueron significativamente mayores en el sector expuesto. Por otro lado, las MIN en ambas estaciones fueron iguales entre los sectores del intermareal (Tabla 1.3). A lo largo

del año se observa una mayor fluctuación en los registros de temperatura del sitio expuesto (Figura 1.8). También en esta localidad se registran temperaturas cercanas a cero durante el otoño y bajo cero en el invierno en pocas ocasiones. Durante el año de registros se ve una temperatura más homogénea entre las estaciones y a su vez más bajas (Figura 1.9).

Tabla 1.3: Medias, desvíos, registros más altos y más bajos en los valores máximos y mínimos de temperatura por estación para cada sector del intermareal de RW durante el 2017. Resultado de una prueba de ANOVA para las medias de cada variable entre sectores. Los resultados significativos se marcan en *cursiva*.

Estación	Sector	Variable	n	Media	D.E.	Mín.	Máx.	F	p
Otoño	Expuesto	MAX	38	12,34	4,40	7,88	23,88	11,17	<i>0,0013</i>
Otoño	Protegido	MAX	38	9,74	1,94	7,56	17,13		
Otoño	Expuesto	MIN	38	4,32	2,24	0,13	8,19	1,27	0,2626
Otoño	Protegido	MIN	38	4,89	2,11	0,75	9,06		
Invierno	Expuesto	MAX	93	15,00	5,85	6,44	33,13	44,02	<i>&lt;0,0001</i>
Invierno	Protegido	MAX	43	8,91	2,03	6,50	17,81		
Invierno	Expuesto	MIN	93	4,75	2,48	-0,81	10,00	0,03	0,8722
Invierno	Protegido	MIN	43	4,83	2,26	0,00	8,56		
Primavera	Expuesto	MAX	43	21,57	5,31	12,81	35,31		
Primavera	Expuesto	MIN	43	8,79	2,45	1,81	13,75		

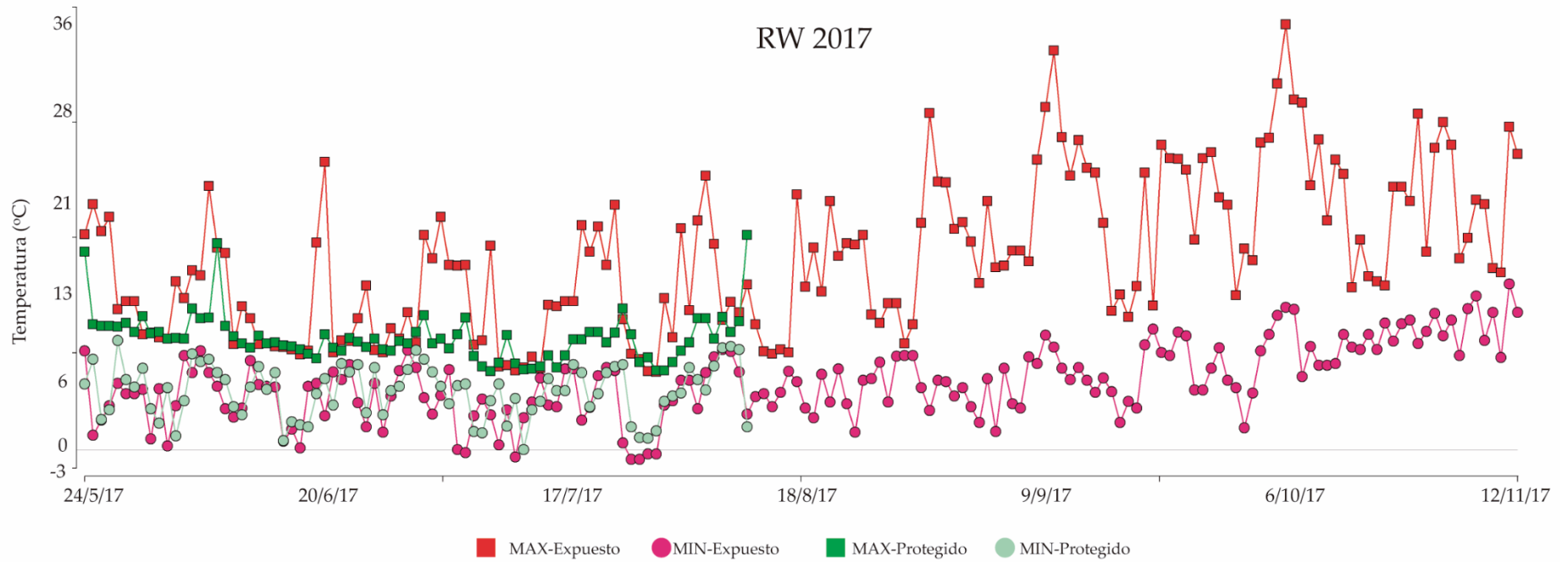


Figura 1.8: Registros de temperaturas máximas (MAX) y mínimas (MIN) para los sectores expuestos y protegidos del intermareal de RW durante el 2017.

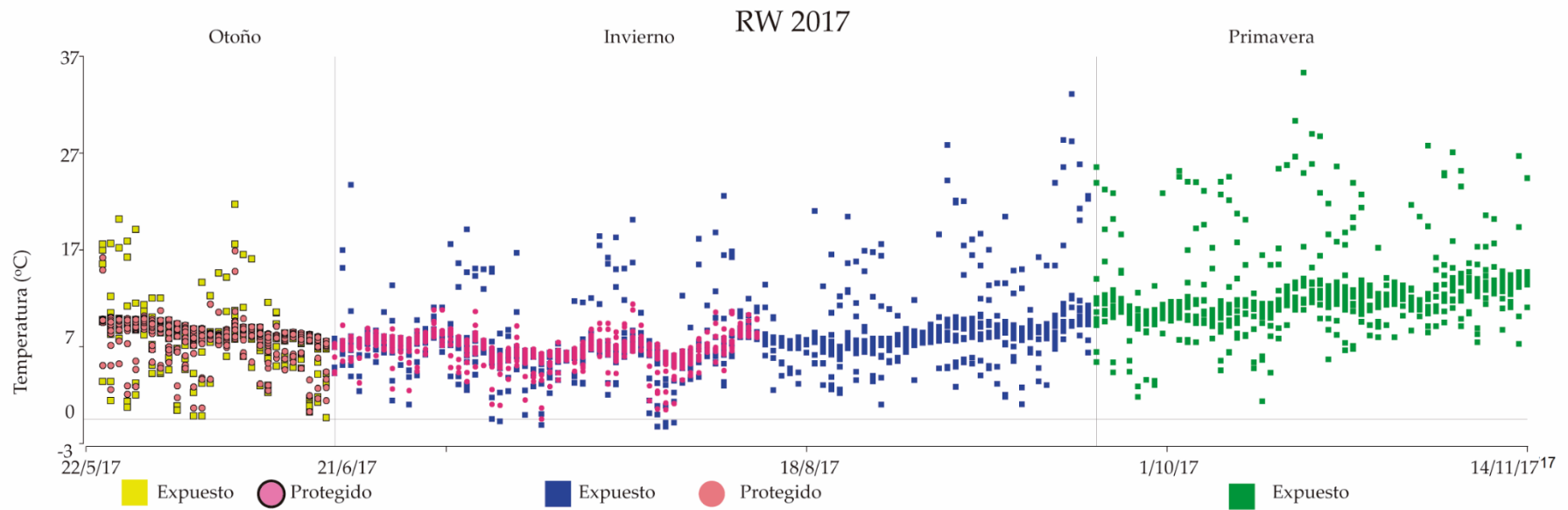


Figura 1.9: Gráfico de temperatura anual para el RW durante el 2017. Se grafican 24 registros por día para los sectores Expuesto y Protegido.

En la localidad de BC durante el 2016 se pudieron registrar las temperaturas durante casi todo el año, perdiendo los datos en la primavera. En esta localidad, durante el verano las temperaturas MAX y MIN de los sectores expuestos y protegidos no presentaron diferencias significativas. En el otoño las MAX y MIN del sector expuesto fueron significativamente superiores; mientras que en el invierno, solo las MIN fueron significativamente superiores en el sector expuesto (Tabla 1.4). Por lo tanto, se observa que el sector protegido generalmente presentó temperaturas MIN menores que el sector expuesto (Figura 1.10). A lo largo del año se observó un marcado descenso de temperatura luego del otoño y eventos de temperaturas bajo cero registrados durante el invierno en los sectores protegidos (Figura 1.11).

Tabla 1.4: Medias, desvíos, registros más altos y más bajos en los valores máximos y mínimos de temperatura por estación para cada sector del intermareal de BC durante el 2016. Resultado de una prueba de ANOVA para las medias de cada variable entre sectores. Los resultados significativos se marcan en cursiva.

Estación	Sector	Variable	n	Media	D.E.	Mín.	Máx.	F	p
Verano	Expuesto	MAX	56	22,05	3,16	16,99	31,79	3,30	0,0723
Verano	Protegido	MAX	48	21,02	2,56	16,50	26,83		
Verano	Expuesto	MIN	56	15,05	3,84	8,25	25,65	1,52	0,2207
Verano	Protegido	MIN	48	14,27	2,31	9,00	20,00		
Otoño	Expuesto	MAX	91	16,86	3,24	11,78	30,41	29,39	<i>&lt;0,0001</i>
Otoño	Protegido	MAX	91	14,29	3,18	9,58	22,00		
Otoño	Expuesto	MIN	91	10,34	3,47	2,72	21,94	12,34	<i>0,0006</i>
Otoño	Protegido	MIN	91	8,53	3,48	1,70	16,08		
Invierno	Expuesto	MAX	77	16,46	4,72	8,72	23,11	2,42	0,1218
Invierno	Protegido	MAX	82	11,80	2,66	8,42	17,82		
Invierno	Expuesto	MIN	77	6,13	2,19	-0,01	11,01	6,37	<i>0,0126</i>
Invierno	Protegido	MIN	82	5,27	2,09	-0,34	9,36		

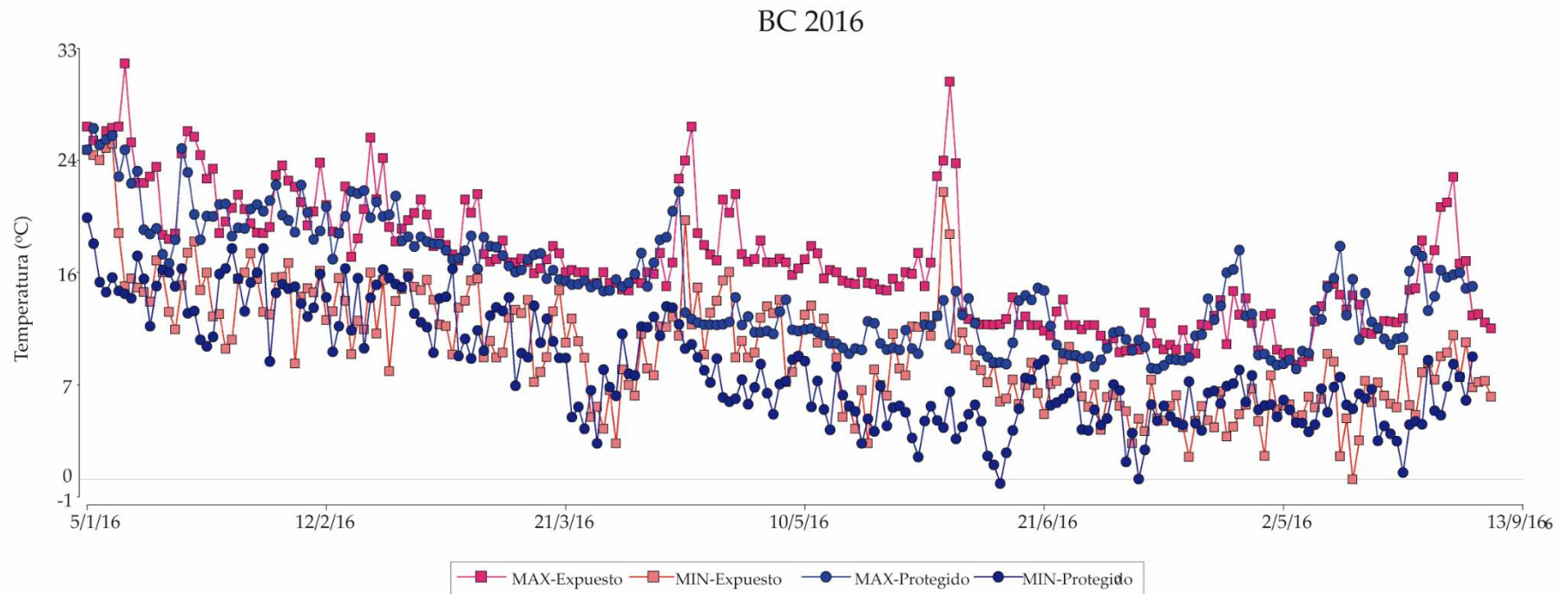


Figura 1.10: Registros de temperaturas máximas (MAX) y mínimas (MIN) para los sectores expuestos y protegidos del intermareal de BC durante el 2016.

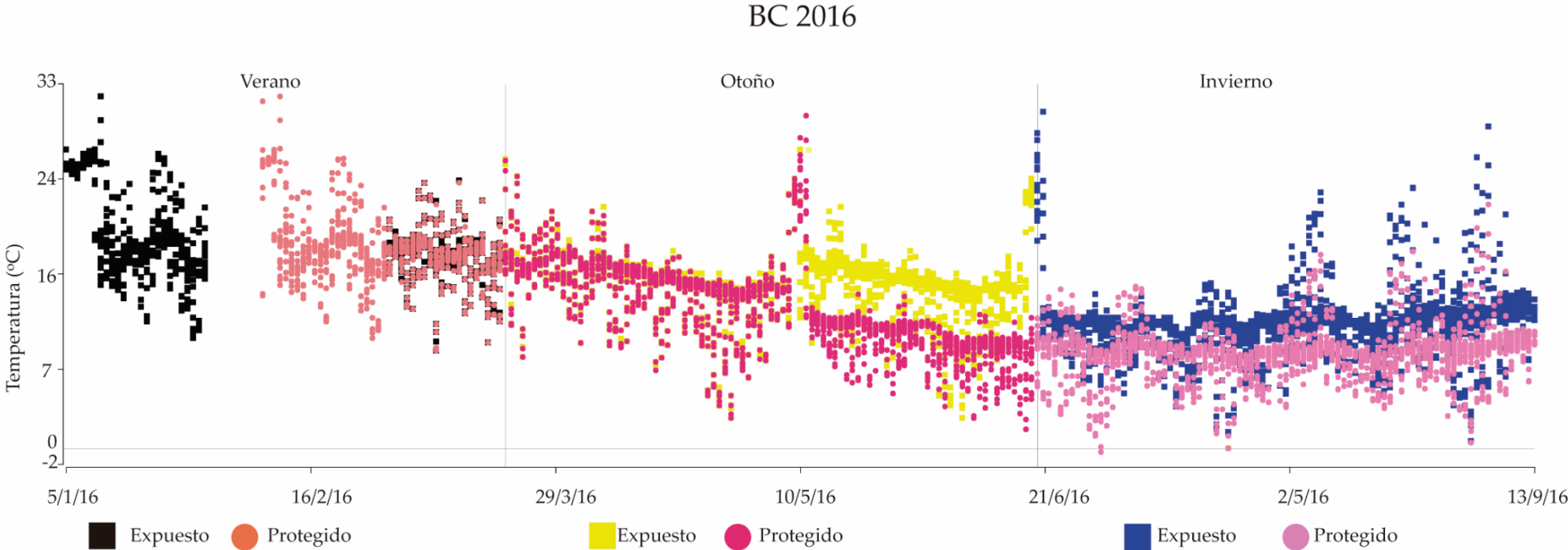


Figura 1.II: Gráfico de temperatura anual para BC durante el 2016. Se grafican 24 registros por día para los sectores Expuesto y Protegido.

1.6.3 Centrales Meteorológicas: Condiciones físicas encontradas en cada localidad

Se calcularon medias ambientales mensuales de viento y temperatura a partir de los registros de las estaciones meteorológica del CCT CONICET-CENPAT para GN, de la estación de Fotobiología Playa Unión (EFPU) para RW y del Servicio Meteorológico Nacional para la zona de BC durante el 2017 (Figura 1.12). Se observó aproximadamente el mismo patrón de evolución del viento y la temperatura a lo largo del año en las tres localidades. Una disminución desde enero a mayo y un aumento a partir de junio.

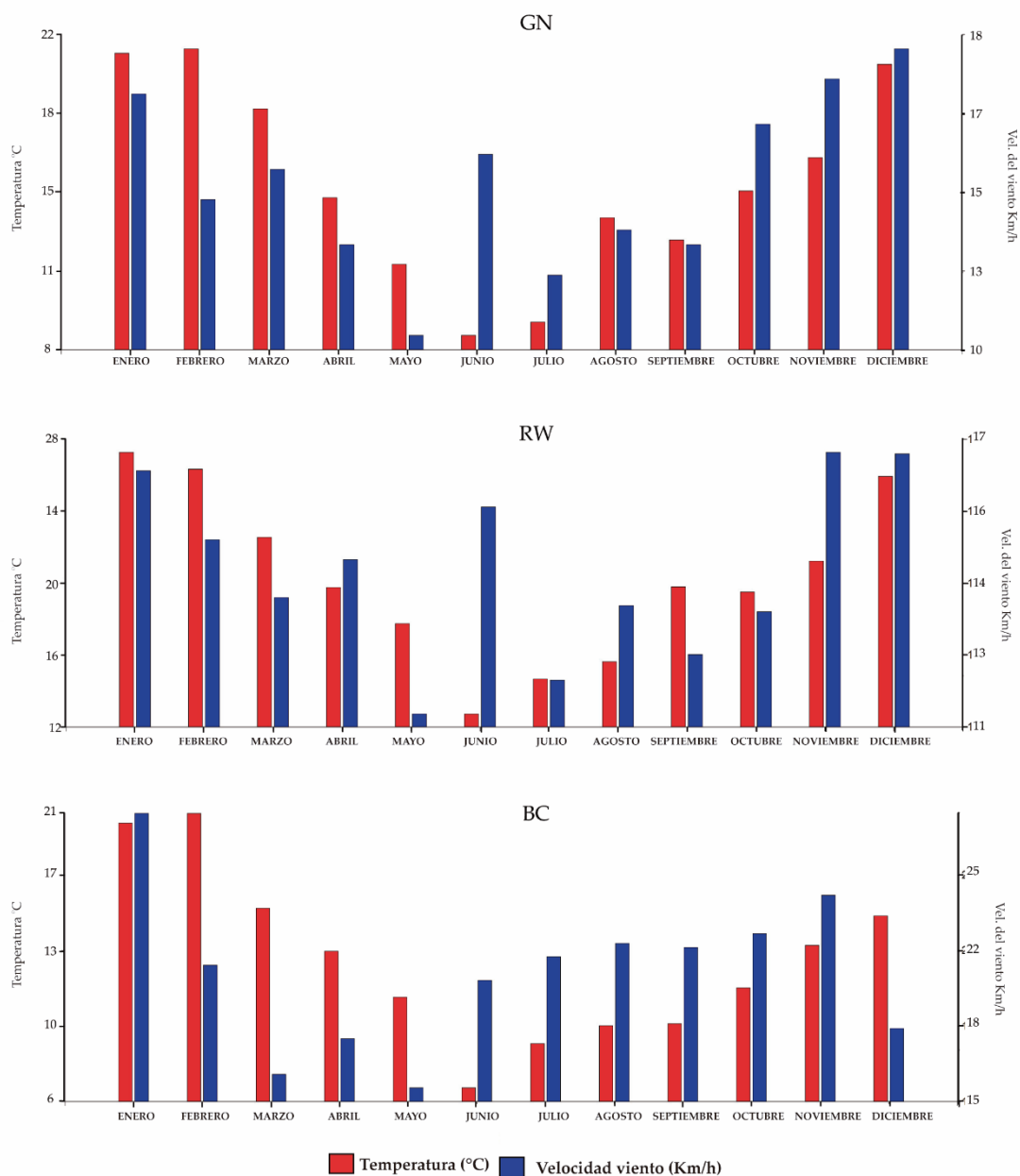


Figura 1.12: Medias mensuales obtenidas de centrales meteorológicas durante el año 2017, temperatura registrada en °C y velocidad del viento en km/h.

El valor medio de temperatura de RW difirió significativamente de BC y GN, siendo el mayor registrado para el año 2017. En la localidad de GN se registró una temperatura intermedia, mientras que la más baja se encontró en BC. En cuanto al viento, la mayor velocidad registrada fue en la localidad de BC siendo significativamente distintas de GN y RW, mientras que entre estas últimas no se encontraron diferencias significativas (Tabla 1.5)

Tabla 1.5: Medias de temperatura y viento anual tomadas por las estaciones meteorológicas para cada localidad. Se informa un contraste de Tukey luego de rechazar la igualdad de medias con una prueba de ANOVA. Letras iguales indican diferencias no significativas  $p > 0,05$ .

Loc.	Variable	n	Media	D.E.	Mín.	Máy.	Tukey
GN	Temperatura	12	14,94	4,48	8,10	21,00	A
RW	Temperatura	12	19,87	4,69	12,31	26,89	B
BC	Temperatura	12	12,97	4,16	6,71	20,17	A
GN	Vel. Viento	12	14,79	2,07	11,16	18,00	A
RW	Vel. Viento	12	14,26	1,83	11,29	16,71	A
BC	Vel. Viento	12	20,72	3,36	15,69	27,61	B

#### 1.6.4 Modelos: Condiciones físicas encontradas en cada localidad

*Altura estacional de olas:* En GN, durante el año 2018, se registró una altura máxima de olas promedio de  $0,79 \pm 0,36$  m. Durante la estación de primavera la altura fue significativamente mayor, siendo el otoño la estación con la menor altura media registrada (Tabla 1.6).

Tabla 1.6: Comparación de medias estacionales en los registros de altura máxima de olas para el año 2018 en GN, mediante el análisis no paramétrico Kruskal Wallis. En los contrastes a posteriori (CP) las letras comunes no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ): otoño y verano; verano e invierno.

Loc.	Variable	Estación	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	CP
GN	Altura max m	Verano	72	0,73	0,29	0,80	15,93	0,0011	AB
GN	Altura max m	Otoño	108	0,68	0,29	0,70			A
GN	Altura max m	Invierno	90	0,90	0,52	0,80			B
GN	Altura max m	Primavera	90	0,88	0,25	0,85			C

En RW se registró una media en la altura máxima de ola de  $1,2 \pm 0,45$  m, presentando la mayor altura en primavera. En esta estación del año se registró una altura significativamente superior respecto a las demás (Tabla 1.7).

Tabla 1.7: Comparación de medias estacionales en los registros de altura máxima de olas para el año 2018 en RW, mediante el análisis no paramétrico Kruskal Wallis. En los contrastes a posteriori (CP) las letras comunes no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ): invierno, verano y otoño.

Loc.	Variable	Estación	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	CP
RW	Altura max m	Verano	72	1,10	0,37	1,20	42,43	<0,0001	A
RW	Altura max m	Otoño	108	1,11	0,38	1,20			A
RW	Altura max m	Invierno	90	1,16	0,61	0,95			A
RW	Altura max m	Primavera	90	1,43	0,30	1,45			B

En BC durante el año 2018 se registró una media en la altura máxima de la ola de  $1.03 \pm 0,4$  m. La altura significativamente mayor fue durante la primavera y el menor valor se registró en el otoño (Tabla 1.8).

Tabla 1.8: Comparación de medias estacionales en los registros de altura máxima de olas para el año 2018 en BC, mediante el análisis no paramétrico Kruskal Wallis. En los contrastes a posteriori (CP) las letras comunes no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ): otoño y verano, verano e invierno.

Loc.	Variable	Estación	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	CP
BC	Altura max m	Verano	72	0,90	0,27	0,90	123,21	<0,0001	AB
BC	Altura max m	Otoño	108	0,82	0,29	0,80			A
BC	Altura max m	Invierno	90	1,02	0,42	1,00			B
BC	Altura max m	Primavera	90	1,41	0,32	1,50			C

Analizando los valores medios a lo largo del año entre localidades, se encontró que la altura de olas máxima presentó diferencias significativas (Figura 1.13). La mayor altura se registró en la localidad de RW y la menor en GN.

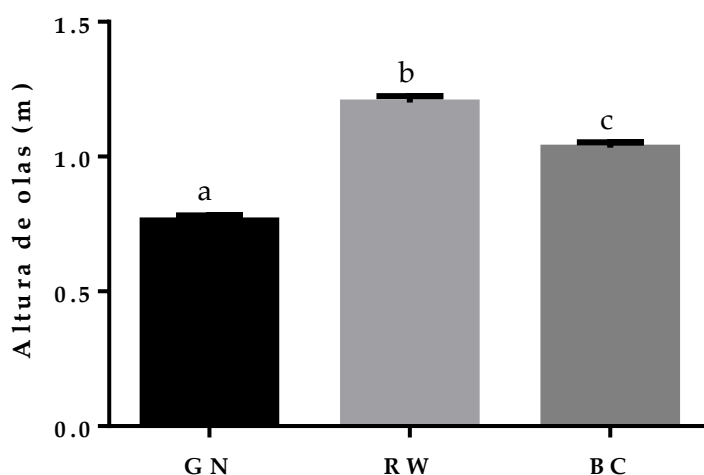


Figura 1.13: Media estacional de la altura de olas máxima para cada localidad calculada a partir de datos obtenidos de la aplicación web Windytv. Letras distintas hacen referencia a diferencias significativas entre las medias de las localidades, con un  $p < 0,001$ .

A modo de resumen de los resultados descriptos previamente, se encontraron diferencias en la temperatura entre los sectores protegidos y expuestos dentro de cada localidad. La temperatura interna de las especies estudiadas, fueron diferentes entre los eventos de temperatura extremos en GN. Las estaciones meteorológicas indicaron que la localidad de RW presentó las temperaturas más elevadas, mientras que BC el viento más elevado. A su vez, la estimación de altura de ola realizada por Windy.tv indicó que RW fue la localidad con mayor altura de marea.

#### 1.6.5 Modelos: Condiciones físicas encontradas en los sitios de cada localidad

*Intensidad de olas Fetch:* En el caso de la localidad GN, en el sitio Punta Este, los vientos que presentaron importancia en la generación de olas y su posterior impacto sobre la costa fueron en orden decreciente del este, norte y oeste. La influencia del viento del sur es despreciable en la formación de olas (Figura 1.14 A) ya que es una costa protegida hacia ese punto cardinal. Para el sitio Punta Loma la dirección del viento con mayor influencia corresponde al norte, en menor medida del este y con un aporte aún menor del oeste (Figura 1.14 B). En el caso de Ambrossetti los vientos que influyeron en la formación de olas fueron los mismos

que para Punta Loma, con un menor aporte del viento este por ser un sitio al resguardo por un acantilado (Figura 1.14 C).

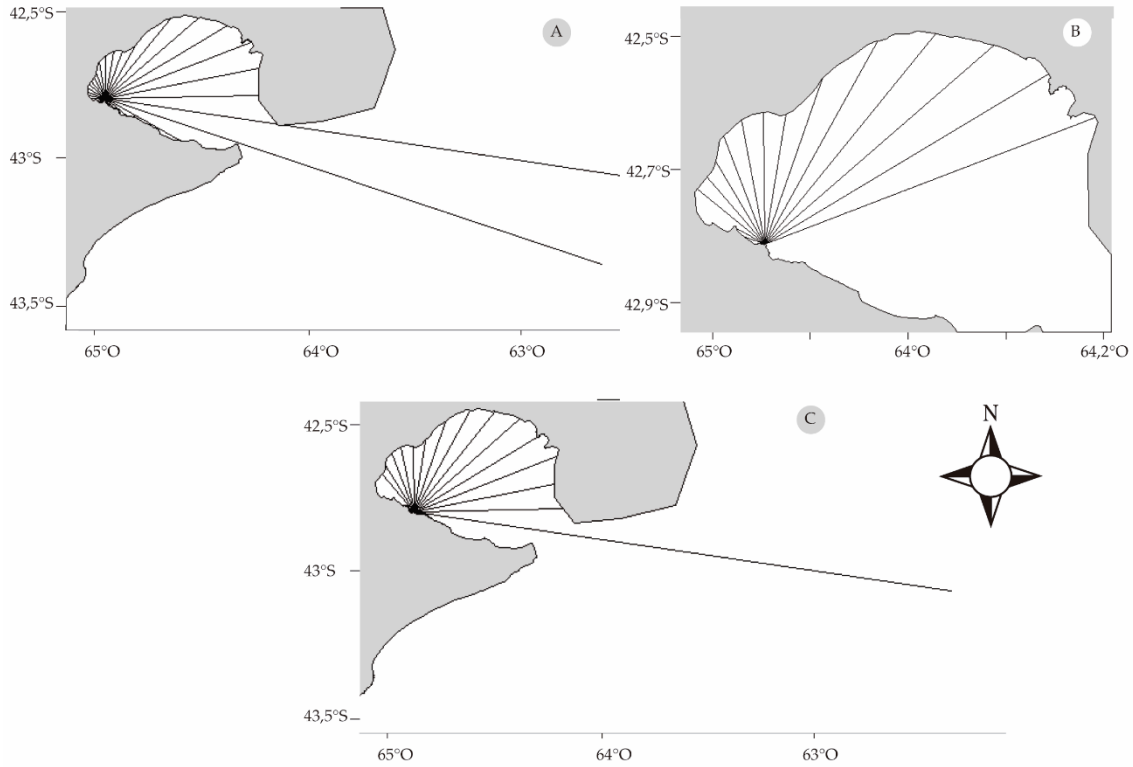


Figura 1.14: En gris se ve el polígono correspondiente al continente en donde se encuentra la localidad GN, las líneas negras representan vectores equiangulares de recorrido del agua desde el sitio de estudio. A- Punta Este; B- Punta Loma; C- Ambrossetti.

Los tres sitios analizados en la localidad de RW se encontraron más expuestos al oleaje, y por su ubicación, los vientos que presentaron importancia en la generación de olas fueron similares. Los vientos más importantes fueron en primer lugar del este, luego del norte y por último del sur. Este último, mostró una influencia menor en Playa Bonita (Figura 1.15 A) y mayor en los sitios de más al sur: Cangrejales y Santa Isabel (Figura 1.15 B y C)

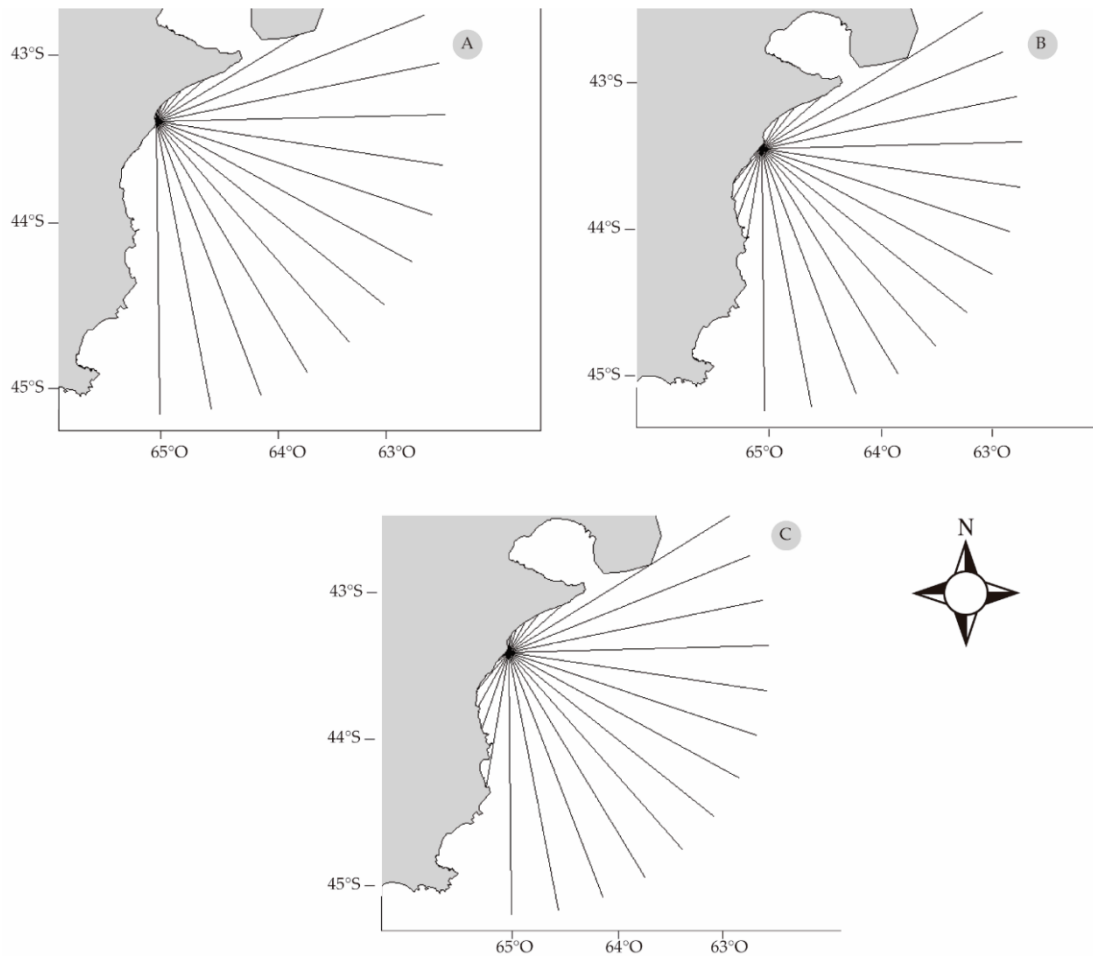


Figura 1.15: En gris se ve el polígono correspondiente al continente donde se encuentra la localidad de RW. Las líneas negras representan vectores equiangulares de recorrido del agua desde cada uno de los sitios bajo estudio. **A-** Playa Bonita; **B-** Cangrejales; **C-** Santa Isabel.

En BC el efecto de los vientos de la dirección sur se encontraron en su mayoría atenuados por la posición geográfica de la Bahía. En el caso del sitio Elola los vientos que influyeron en su costa fueron los del este, norte y en menor medida del sur, en este caso se descartó el viento oeste dado que es continental (Figura 1.16 A). En el sitio Algueros, dado que se encuentra en una posición sur y despejada al oeste (Figura 1), los vientos principales en la formación de olas en su costa son del norte, este y oeste. Dada su posición, los vientos del sur son descartados como formadores de olas (Figura 1.16 B). Por último, en el sitio Caleta Carolina los vientos de importancia estimados por la función *Fetch* (Figura 1.16 C) no fueron concordantes con observaciones *in situ*. Muy posiblemente esto se deba por falta de definición en los píxeles de la capa de la línea de costa cargada como el polígono

continental. La caleta es un espacio cerrado hacia el este por una proyección costera que actúa como barrera a la entrada de la caleta, por lo tanto, el viento estimado de esta dirección por la función *Fetch* fue desestimado. Los vientos más importantes en la formación de olas fueron de la dirección norte y oeste (Figura 1.16 C).

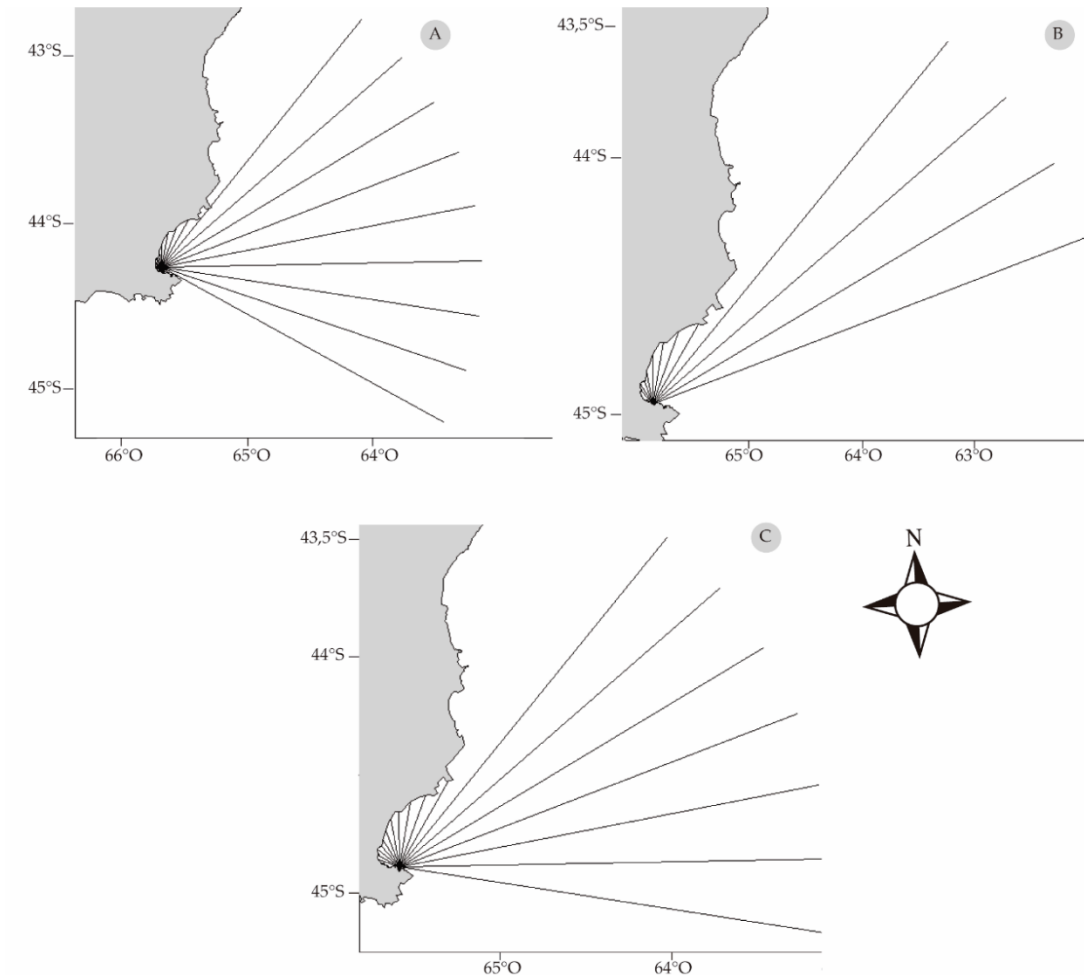


Figura 1.16: En gris se ve el polígono correspondiente al continente donde se encuentra la localidad de BC. Las líneas negras representan vectores equiangulares de recorrido del agua hasta cada uno de los sitios: **A-** Elola; **B-** Algueros; **C-** Caleta Carolina.

En el cálculo de *Fetch* para cada sitio de muestreo en la localidad de GN, Punta Loma fue la costa menos expuesta (Tabla 1.8), aunque no se encontraron diferencias significativas entre las medias de todos los vientos (ANOVA;  $F_{2,8}=0,34$ ;  $p= 0,722$ ).

Tabla 1.8: Cálculo del *Fetch* para cada sitio en la localidad de GN. Medidas de viento estimadas por punto cardinal para cada sitio en Km. Comparación de medias realizada con una prueba de ANOVA de una vía.

GN	Norte	Este	Oeste	Promedio
Punta Este	17,603	80,475	5,448	34,508
Punta Loma	25,482	18,423	2,756	15,554
Ambrossetti	29,042	52,722	1,381	40,882

En el caso de RW se encontraron las medias más elevadas en comparación a GN y BC en los tres sitios (Tabla 1.9), comparadas con las del GN. Dentro de RW no se detectaron diferencias significativas (ANOVA;  $F_{2,8}=0,022$ ;  $p=0,978$ ).

Tabla 1.9: Cálculo del *Fetch* para cada sitio en la localidad de RW. Medidas de viento estimadas por punto cardinal para cada sitio en Km. Comparación de medias realizada con una prueba de ANOVA de una vía.

RW	Norte	Este	Sur	Promedio
El Faro	8,764	173,371	111,405	97,841
Cangrejales	12,956	183,951	139,146	112,018
Santa Isabel	9,114	184,411	133,803	109,109

En la localidad de BC los valores estimados fueron intermedios (Tabla 1.10) con respecto a GN y RW. Dentro de BC tampoco se observaron diferencias significativas entre los sitios (ANOVA;  $F_{2,7}=0,406$ ;  $p=0,686$ ).

Tabla 1.10 Cálculo del *Fetch* para cada sitio en la localidad de BC. Medidas de viento estimadas por punto cardinal para cada sitio en Km. Comparación de medias realizada con una prueba de ANOVA de una vía.

BC	Norte	Este	Sur	Oeste	Promedio
Elola	36,048	178,711	3,574		72,778
Algueros	40,173	67,258		0,581	36,004
Caleta Carolina	45,452			4,525	24,988

Las medias del *Fetch* entre localidades fueron significativamente diferentes (ANOVA;  $F_{2,25}=4,797$ ;  $p=0,0181$ ) donde RW presentó el valor de *Fetch* más elevado, siendo significativamente mayor que la de GN (Figura 1.17).

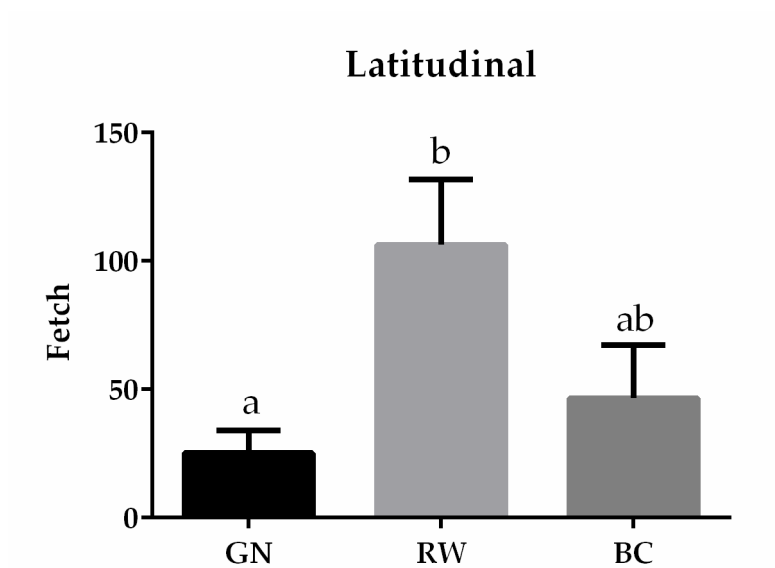


Figura 1.17: Cálculo del *Fetch* para cada localidad, comparación de medias realizada con un Test de Tukey a posteriori ( $p < 0,05$ ).

La estimación del *Fetch* indicó que los tres sitios que presentaron una mayor intensidad de viento y por lo tanto están más expuestos al oleaje son los ubicados dentro de la localidad de RW.

1.6.6 Datos Satelitales oceánicos

Las imágenes satelitales obtenidas durante el 2017 mostraron poca dispersión entre las variables físicas de los sitios y tendencias latitudinales entre las localidades (Tabla 1.11).

Tabla 1.11 Resultados obtenidos de imágenes satelitales para cada variable analizada en los sitios de muestreo.

Loc.	Sitios	Salinidad (PSU)	Temp. (°C)	pH	Nitrato (ppm)	Clorofila (mg*m <sup>-3</sup> )	Calcita (mol*m <sup>-2</sup> )
GN	Punta Este	33,62	14,25	8,21	2,70	2,36	0,00063
GN	Punta Loma	33,61	13,85	8,21	2,91	2,37	0,0007
GN	Ambrossetti	33,60	14,03	8,21	3,02	2,01	0,00062
RW	Playa Bonita	33,58	12,78	8,22	3,31	2,37	0,00234
RW	Cangrejales	33,58	12,80	8,22	3,41	2,19	0,00241
RW	Sta. Isabel	33,57	12,64	8,22	3,47	2,28	0,00224
BC	Elola	33,48	11,98	8,24	4,76	2,53	0,00262
BC	Algueros	33,47	12,19	8,24	4,84	2,03	0,0023
BC	Caleta Carolina	33,47	11,98	8,24	4,88	2,03	0,00215

Analizando los resultados de los valores medios anuales (Tabla 1.12), se encontró un aumento latitudinal en la salinidad, el pH y los nitratos, siendo significativas estas diferencias entre las localidades de GN y BC. Contrario a esto, la temperatura disminuyó latitudinalmente, siendo significativamente menor en BC en comparación a GN. La clorofila y calcita no mostraron diferencias significativas entre las localidades.

Tabla 1.12: Resultado de las comparaciones de medias por la prueba de medias no paramétricas Kruskal Wallis entre las medias de las localidades. Los resultados significativos se describen en  **cursiva**, a los cuales se les practicó una prueba de comparaciones de a pares a posteriori y los resultados se informan en el texto.

Loc.	Salinidad (PSU)	Temp. (°C)	pH	Nitrato (ppm)	Clorofila (mg*m <sup>-3</sup> )	Calcita (mol*m <sup>-2</sup> )
GN						
RW	<i>p=0,0036</i>	<i>p=0,0036</i>	<i>p=0,0036</i>	<i>p=0,0036</i>	p=0,957	p=0,071
BC	H <sub>2,8</sub> =7,2	H <sub>2,8</sub> =7,2	H <sub>2,8</sub> =7,2	H <sub>2,8</sub> =7,2	F <sub>2,8</sub> =0,09	F <sub>2,8</sub> =5,42

1.6.7 Diversidad y riqueza

Analizando la matriz de abundancia de especies por localidad, con los análisis de ordenamiento MDS, no se encontró una agrupación clara de los datos, siendo BC la localidad con mayor dispersión (Figura 1.18 A, estrés 0,12). Al clasificar la matriz en función de la estación (Figura 1.18 B, estrés 0,12) tampoco se evidenció una separación entre las mismas; sin embargo, al clasificarla por zona, la matriz presento dos grupos bien definidos (Figura 1.18 C, estrés 0,12).

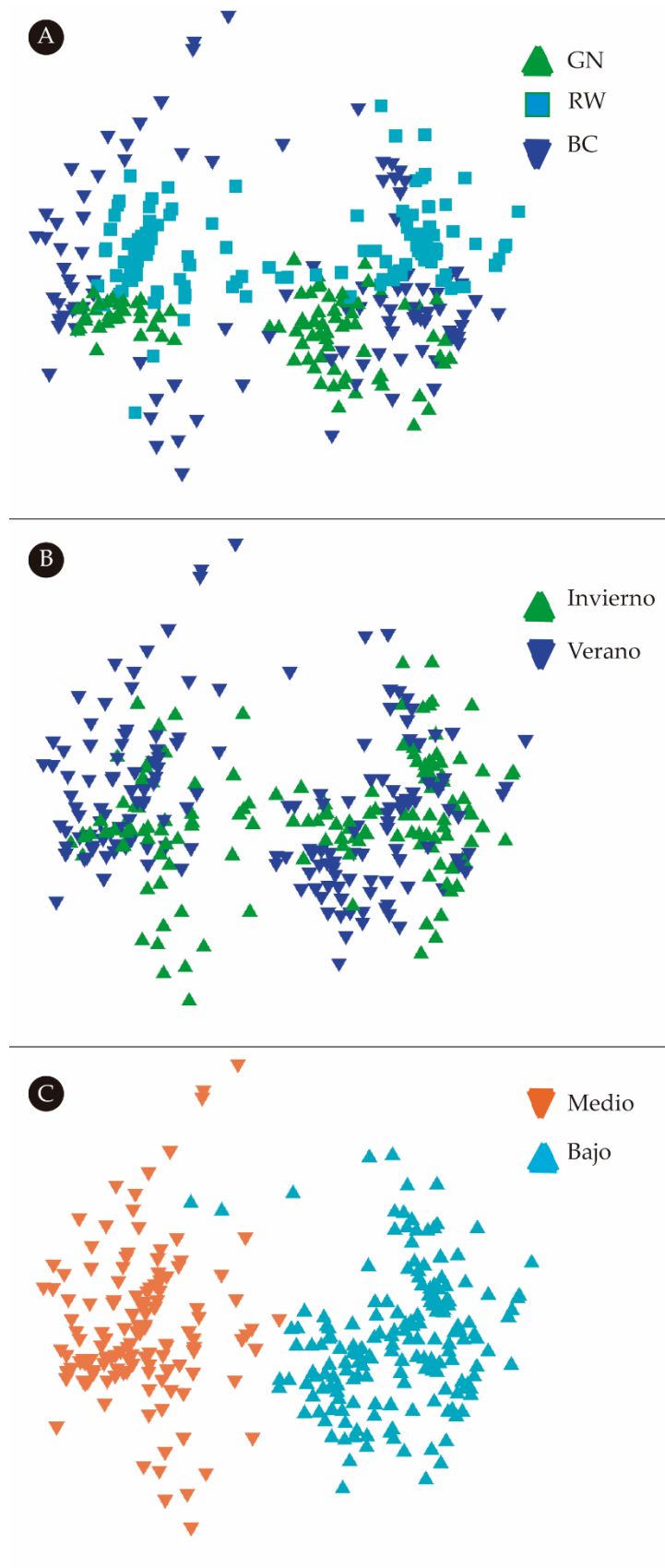


Figura 1.18: Resultado del análisis MDS sobre la matriz de especies extraída, clasificando los datos por A-localidad, B-estación y C-zona.

La estructura de la comunidad (composición y abundancia de especies) de los intermareales rocosos analizados presentó diferencias significativas entre las localidades, las zonas y los sitios dentro de cada localidad (Tabla 1.13). Además, se encontró que BC fue significativamente diferente que GN y RW, mientras que estas últimas no mostraron diferencias significativas (Tabla 1.14). Comparando las medias de la estructura de la comunidad de cada localidad para la zona baja, no se encontraron diferencias significativas, en cambio en las medias de la zona media se encontraron diferencias significativas entre las localidades GN y BC (Tabla 1.14)

Tabla 1.13: Resultado de PERMANOVA. Abreviaciones: ES-estación, LO-localidad, ZN-zona, SI-sitio. Los p significativos se indican en cursiva.

Factores	df	CM	Pseudo-F	p
ES	1	12898	4,0281	0,0509
LO	2	41446	6,6166	<i>0,0011</i>
ZN	1	2,5794E5	77,738	<i>0,0001</i>
SI(LO)	6	6546,4	19,762	<i>0,0001</i>
ESxLO	2	3892,3	1,1933	0,3513
ESxZN	1	5134,6	4,0632	0,0875
LOxZN	2	4217,8	1,2478	0,3694
ESxSI(LO)	6	3401,5	10,268	<i>0,0001</i>
SI(LO)xZN	6	3525,5	10,642	<i>0,0001</i>
ESxLOxZN	2	4849,9	3,8379	0,0572
ESxSI(LO)xZN	5	1263,7	3,8146	<i>0,0001</i>
Res	315	331,27		
Total	349			

Tabla 1.14: Contrastes a posteriori con una prueba T de a pares. Los p significativos se indican en **cursiva**.

Factor	Contrastes	p(perm)
Localidad	GN, BC	<b>0,032</b>
Localidad	GN, RW	0,1021
Localidad	BC, RW	<b>0,0311</b>
Zona baja	GN, BC	0,0954
Zona baja	GN, RW	0,1004
Zona baja	BC, RW	0,1
Zona media	GN, BC	<b>0,0353</b>
Zona media	GN, RW	0,0966
Zona media	BC, RW	0,0529

En el conteo total de especies sésiles se encontró que a lo largo de las dos estaciones muestreadas en la localidad de GN, se identificaron 15 especies en los 3 intermareales. En la localidad de RW se identificaron 6 especies y 20 en los tres sitios muestreados de BC.

Durante el invierno en la zona media de las tres localidades se encontró que la especie dominante (mayor abundancia) fue *Perumytilus purpuratus*. En la localidad de BC se detectaron especies de algas que no estuvieron presentes en las otras localidades (Figura 1.19).

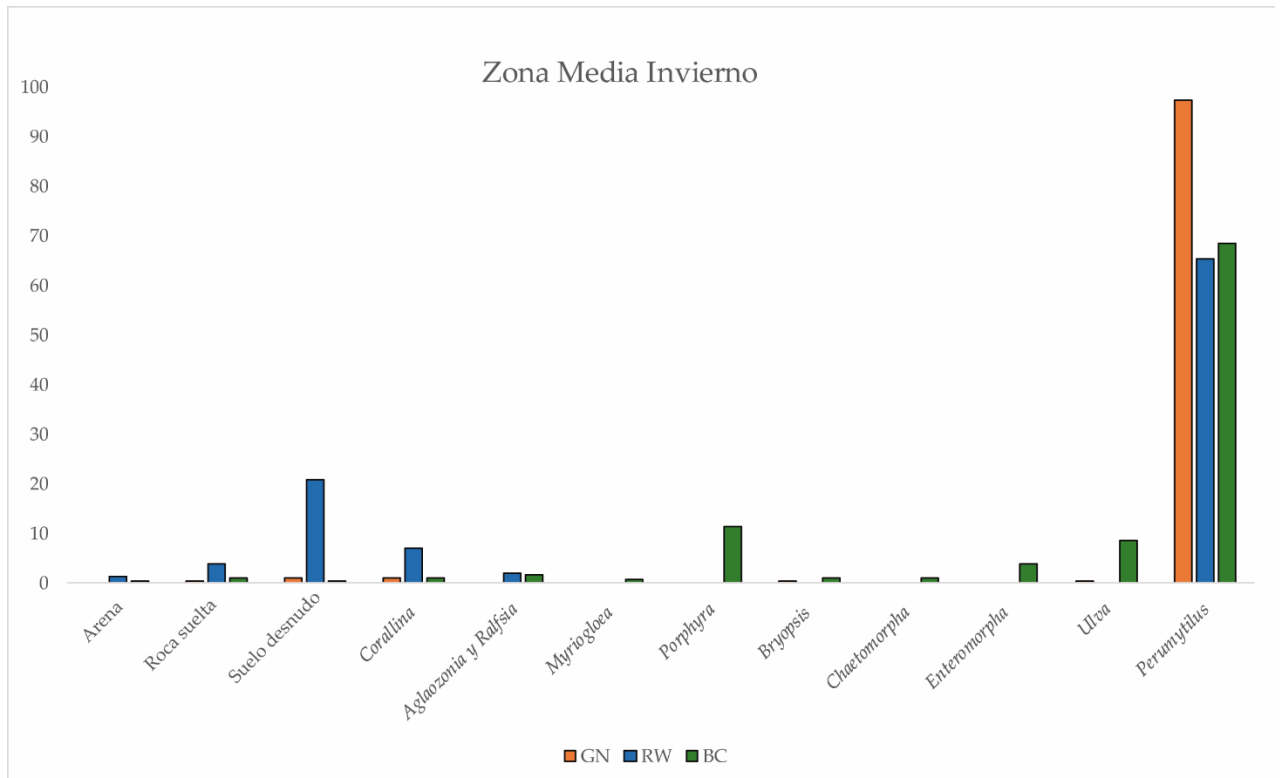


Figura 1.19: Valores medios del número de especies encontradas y tipo de suelo en la zona media de cada localidad durante el invierno.

En la zona baja del intermareal durante el invierno, se encontró que en las tres localidades la especie más abundante fue el alga *Corallina officinalis*. RW presentó la mayor cobertura de suelo desnudo (arena y roca suelta) (Figura 1.20).

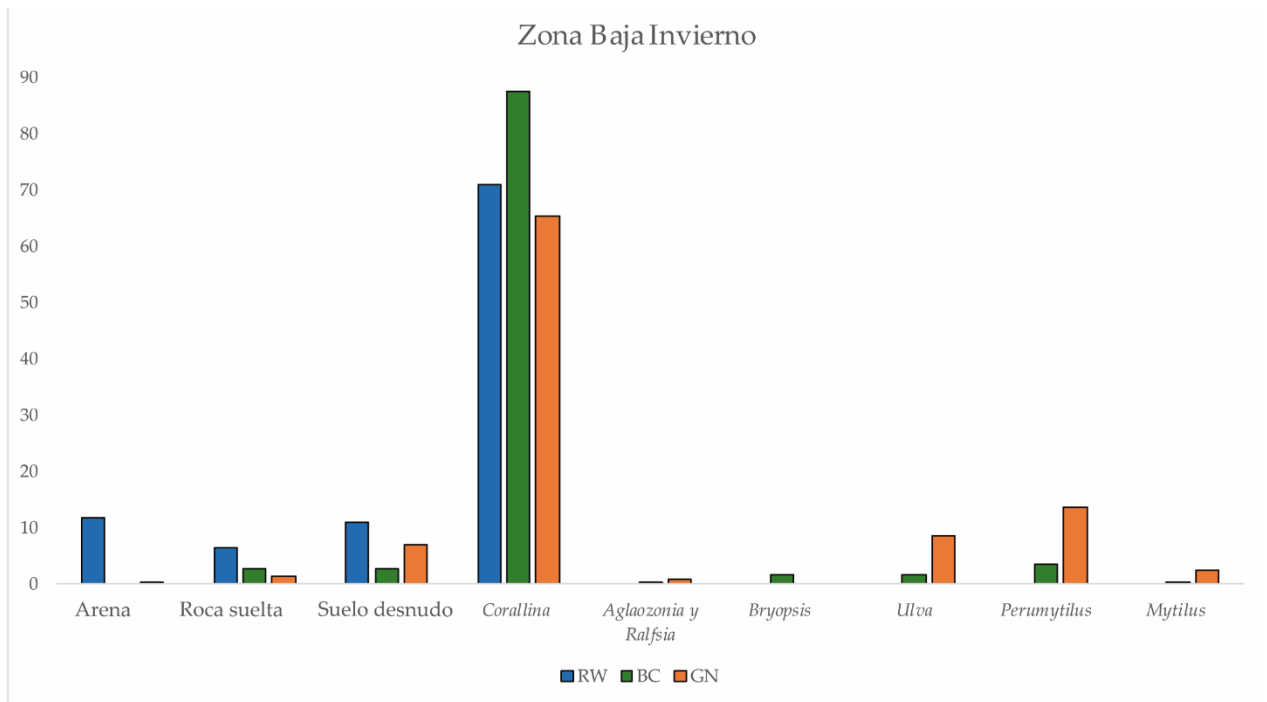


Figura 1.20: Valores medios del número de especies encontradas y tipo de suelo en la zona baja del intermareal de cada localidad durante el invierno.

Durante el verano, en la zona media, se encontró una gran abundancia de *P. purpuratus* en las tres localidades. El número de especies de algas disminuyó, pero la abundancia de las presentes aumentó (Figura 1.21).

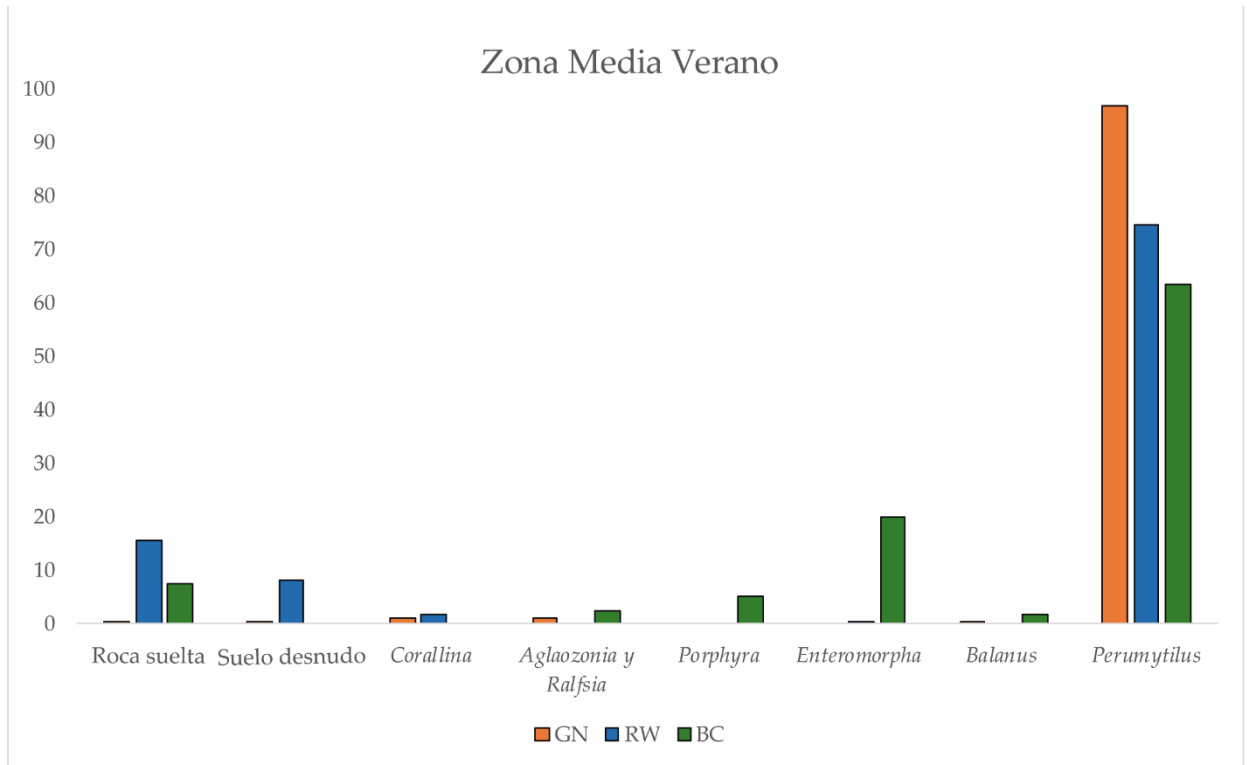


Figura 1.21: Valores medios del número de especies encontradas y tipo de suelo en la zona media de cada localidad durante el verano.

Durante el verano en la zona baja, se encontró en las tres localidades una gran abundancia del alga *C. officinalis*, junto a una mayor representación de algas. En GN se observó una mayor presencia de *Ulva* sp. y *P. purpuratus*. (Figura 1.22).

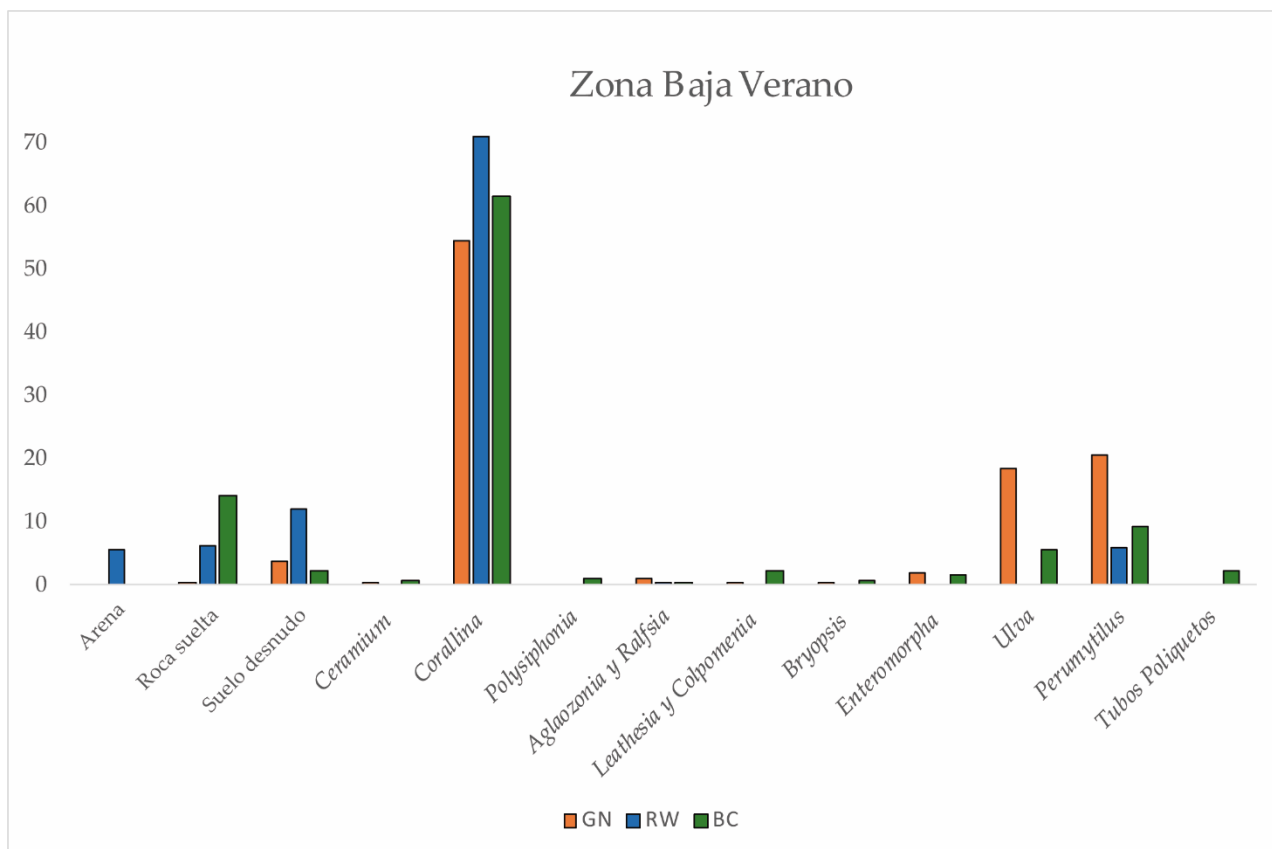


Figura 1.22: Valores medios del número de especies encontradas y tipo de suelo en la zona baja de cada localidad durante el verano.

El factor que mejor ordeó la abundancia relativa de las especies encontradas en cada ensamble de especies fue la zona. A su vez, la estructura de la comunidad de BC fue significativamente diferente a la encontrada en GN y RW. Por otro lado, se encontró un mayor número de especies sésiles en BC, principalmente compuesta por algas. Dentro de cada zona del intermareal independientemente de la localidad y la estación las especies más abundantes fueron las mismas.

## 1.7 Discusión

En el presente capítulo se caracterizaron y compararon, desde un punto de vista ambiental tres localidades de la costa de la Patagonia Argentina. Las diferencias entre las localidades dependen de las variables físicas analizadas que se encuentran asociadas a la influencia de la latitud y la geomorfología de la costa.

Dentro de la localidad de GN los tres sitios seleccionados fueron muy similares entre sí, dado que de las 10 variables puntuales tomadas no se encontraron diferencias significativas en 9 (Tabla 1.1). Dentro de esta localidad se encontró que los sectores protegidos del intermareal (cavidades y/o grietas), donde se refugia el caracol marino *Trophon geversianus* funcionan como un microhábitat *buffer* principalmente durante la temporada estival. Estos ambientes atenúan los efectos de las variaciones térmicas extremas (Figura 1.5 y 1.6), ya que se observó que presentan menor variación entre la temperatura máxima y mínimas diarias comparadas con la de zonas expuestas. En el caso de los sitios muestreados en RW y BC también se consideraron como réplicas, dado que de las 10 variables registradas, ninguna mostró diferencias significativas entre cada sitio dentro de la localidad (Tabla 1.1).

Un comportamiento observado en numerosos invertebrados marinos es refugiarse en sitios protegidos durante la marea baja (Bertness *et. al.* 2001). Particularmente, *T. geversianus* generalmente se encontró en sectores protegidos del intermareal en comparación a *T. patagonica* (Com. Pers.). En la localidad de GN los registradores de temperatura indicaron que los sectores protegidos operan como una especie de “buffer”. Brindando un espacio con menor temperatura durante temporadas de calor y protección contra las bajas temperaturas en temporadas frías (Figuras 1.5 y 1.6). Como se evidenció en eventos de extremo calor (Figura 1.7), las especies pueden variar sus temperaturas internas en función de su comportamiento. Resaltando así la importancia de los sectores protegidos para algunas especies durante la marea baja. Los registros de temperatura en la localidad de RW mostraron una estacionalidad menos marcada, presentando medias de temperaturas máximas más bajas que las demás localidades. En esta localidad, los sectores protegidos del intermareal no serían un refugio para las temperaturas bajas (Figura 1.8, 1.9) ya que se registraron menores temperaturas que el sector expuesto. Esto mismo se observó para BC, por lo que no serían un buen refugio durante las estaciones frías. A su vez, las temperaturas máximas registradas en algunas ocasiones (extremas) no difirieron con las registradas en el sector expuesto, indicando que los organismos intermareales podrían verse afectados

independientemente de sus estrategias comportamentales de guarecerse en refugios (Figura 1.10 y 1.11).

En la recopilación de datos realizados, para la localidad de GN se registró la menor media de vientos totales (Figura 1.12), la menor altura de olas (Figura 1.13) y la menor exposición del oleaje (Figura 1.17) en comparación a las medias de los mismos años para las otras dos localidades. El golfo al tener una boca estrecha (17 km) permite un bajo intercambio de agua, alrededor del 1% anual (Rivas y Beier 1989), reduce el ingreso del oleaje y limita el recorrido de la onda formada lo que se traduce en olas de menor altura. Estas características topográficas, disminuyen la influencia de fuentes de estrés sobre los organismos intermareales que habitan el golfo. Por otro lado, este bajo intercambio de agua en el golfo en general, genera cambios en las variables oceanográficas, como un elevado valor de salinidad, pH y temperatura del mar (Rivas 1990). En la localidad de RW se registraron temperaturas ambientales bajas (Figura 1.12), los valores más elevados de altura de olas (Figura 1.13) y el mayor grado de exposición al oleaje (Figura 1.17) en comparación a los registros del mismo período de las demás localidades. El hecho de haber presentado los valores más extremos de altura y exposición al oleaje, puede relacionarse con el alto grado de exposición que presentan sus costas (<http://www.hidro.gov.ar/>). Sin embargo, las variables oceánicas presentaron valores intermedios a las restantes localidades (Tabla 1.11). La localidad de BC mostró, en su mayoría, condiciones intermedias de estrés para los organismos del intermareal, con alturas de ola y exposición detrás de los datos encontrados para RW (Figura 1.13, 1.17). Aunque la media de vientos totales fue la más elevada, (Figura 1.12), los vientos formadores de olas fueron intermedios (Figura 1.16). Esto podría deberse a que, si bien se encuentra en el sitio más austral de los seleccionados, es una bahía protegida en el sur por un Tómbolo (Schillizzi *et al.* 2014), dando una costa con una exposición intermedia. Las variables oceánicas en BC tuvieron sus valores más bajos en comparación a los registros de las demás localidades, (Tabla 1.11). Dichas variables mostraron un rango de variación relacionado con la latitud donde fueron registradas, indicando que las condiciones físicas del agua variarían en un patrón latitudinal, de mayor severidad con el aumento de la latitud.

Cabe destacar que la fuerza de olas y la exposición son consideradas dos de las variables más estresantes para los organismos intermareales (Bertness *et al.* 2001). Por lo tanto, RW puede considerarse como la localidad de mayor estrés para la comunidad intermareal, BC como una localidad de estrés intermedio y GN como la menos estresante para estas variables.

Este gradiente de estrés influye en las comunidades que habitan los intermareales rocosos de cada sitio. Por un lado, se encontró que el factor determinante en el ensamble de especies sésiles fue la zona del intermareal (baja o media, Figura 1.18). El hecho de que el factor más influyente en el ensamble sea la zona del intermareal (microescala) y no la latitud (macro o mesoescala) ya fue resaltado en trabajos previos (Levinton 1995; Bertness *et al.* 2001; Raffaelli y Hawkins 2012). Por lo tanto, la microescala presenta mayor importancia en los patrones de riqueza y diversidad, indicando que las especies dependen principalmente del grado de exposición o protección que le brinda el mismo (Menge *et al.* 1985). Por otro lado, se observó que el ensamble de la localidad de BC fue diferente al de las demás, principalmente debido a las especies que se encontraron en la zona media del intermareal (Tabla 1.14). Es posible que el nivel intermedio de estrés encontrado en la localidad de BC sea la causa de su mayor número de especies sésiles, en comparación a los otros dos ensambles analizados. Modelos de disturbios intermedios realizados en rocas, demostraron que si los disturbios físicos son muy frecuentes e intensos la diversidad disminuye dramáticamente, mientras que la diversidad más elevada fue presentada en donde se realizaron disturbios intermedios (Sousa 1979).

Los registros realizados en el presente capítulo, resaltan las elevadas condiciones de estrés encontradas en los intermareales de Patagonia y dan cuenta de la importancia de los patrones verticales de variación física en ellos.

---

– Capítulo 2

Patrones de variación morfométrica de  
dos especies de gasterópodos que  
habitan ambientes heterogéneos

---

## 2.1 Introducción:

El entendimiento de los patrones de variaciones fenotípicas de los organismos como respuesta a causas biológicas y físicas ha captado la atención de los ecólogos evolutivos a lo largo del tiempo (Piersma y Van Gils 2011). Las estructuras duras de los organismos marinos contienen información sobre su historia, incluidas las condiciones cambiantes de mineralización, el estrés físico o enfermedades (Okoshi 1996). Los cambios ambientales afectan el fenotipo, siendo un tema importante para los estudios de biodiversidad y taxonomía. Además, el estudio de dichas variaciones en los organismos, presentan un componente utilizable como indicador ecológico y paleoecológico (Trussell 2000; Del Río *et al.* 2016; Trovant *et al.* 2018). Desde la descripción de las reglas ecogeográficas (Mayr 1956) como las de Bergmann y Allen (Bergmann 1848) que expresan la relación entre la forma corporal y la temperatura ambiental, los patrones de variación morfológica se analizaron generalmente sobre una escala latitudinal. Sin embargo, se debe considerar que las especies con grandes distribuciones latitudinales presentan variaciones morfológicas asociadas a las condiciones físicas de cada sitio (Partridge y Coyne 1997; Bertness *et al.* 2006; Márquez *et al.* 2011; Márquez *et al.* 2018) y a su vez adaptaciones dentro de cada sitio en una escala geográfica menor (Johannesson 1986, 1996; Márquez *et al.* 2015). Las variaciones encontradas dentro de la microescala (menores a 1km) como defensa para evitar el movimiento de las olas, la depredación y la desecación, son factores determinantes en el patrón de distribución de los organismos dentro del intermareal rocoso (Menge *et al.* 1985). Dado que, dependiendo del tipo de terreno, en pocos metros se pueden encontrar una gran variedad de hábitats generando un gradiente ambiental (Menge y Branch 2001).

Los moluscos presentan variación fenotípica, correlacionada y considerada como una respuesta a los gradientes ambientales generados tanto en el espacio como en el tiempo (Vermeij 1972). Este tipo de variaciones pueden manifestarse intraespecíficamente (Grahame *et al.* 2006; Conde-Padín *et al.* 2007), como ha sido observado en una especie de gasterópodo marino de la Patagonia Argentina por Márquez y colaboradores (2015). En dicho estudio se encontraron diferencias

morfológicas entre dos sitios (el inter y submareal separadas por escasos metros) habitado por *Trophon geversianus*. Los individuos del intermareal, se caracterizaron por presentar conchas globosas de aperturas amplias relacionadas con la fijación al sustrato durante los eventos de exposición al oleaje. Mientras que la forma característica del submareal, fueron conchas fusiformes y aperturas más estrechas relacionadas con la necesidad de disminuir la presión por depredación causada por los cangrejos. Los análisis genéticos realizados en la especie, determinaron que las diferencias encontradas fueron solo a nivel fenotípico, postulando entonces la existencia de dos ecomorfotipos; es decir dos variaciones en forma dentro de una misma especie como resultado a adaptaciones específicas (García-Navas *et al.* 2017). En la misma área geográfica, Livore y colaboradores (2018) estudiaron la variación de la forma en la falsa lapa, *Siphonaria lessonii* encontrando diferentes formas entre dos zonas del intermareal. Los ejemplares del intermareal alto se caracterizaron por aperturas amplias, márgenes más planos y tamaños grandes. Estas variaciones fueron relacionadas con la necesidad de una mejor adhesión al sustrato que disminuya la pérdida de humedad durante las horas de exposición. Mientras que los ejemplares del intermareal medio, se caracterizaron por tener aperturas estrechas, márgenes arqueados y tamaños más pequeños. Este tipo de formas son el resultado de habitar sobre la trama de mejillines. Estas diferencias morfológicas si bien se encuentran en la misma especie, podrían representar diferencias genéticas entre subpoblaciones, “ecotipos”. Esto último fue observado para la especie de gasterópodo *Littorina saxatilis* (Grahame *et al.* 2006) donde los cambios en la forma de la concha en diferentes ambientes se encuentran en dos ecotipos (de ola y cangrejo), cuyas poblaciones están separadas por escasos metros (microescala). El ecotipo “cangrejos” está expuesto a la depredación y en consecuencia presenta conchas gruesas, alargadas y de apertura pequeña (concha robusta), mientras que el ecotipo “oleaje” presenta conchas más comprimida, una apertura grande relativo a la talla y un tamaño más pequeño (Johannesson 1986; Conde-Padín *et al.* 2007). En dicha especie, además se registró la presencia de ambos ecotipos en diferentes áreas del Reino Unido, España (Galicia) y a lo largo de la costa sueca (Grahame *et al.* 2006).

Se observa que, en los estudios realizados sobre la variación de la forma de la concha de moluscos, se relaciona dicha variación como respuesta a factores biológicos y físicos en escalas latitudinales de cientos a miles de kilómetros o en escalas de escasos metros. Sin embargo, si bien ambas escalas son influyentes en el desarrollo de variaciones morfológicas de las especies, en algunos casos es la microescala la que determina la mayor influencia en la forma. Por ejemplo, en la lapa *Lottia subrugosa*, se encontró que la fuerza de olas en una microescala fue el factor determinante en la morfología de la concha. Seleccionando formas de apertura más amplias en zonas de oleaje más intenso, que evitan el desprendimiento de los ejemplares por oleaje (Vieira y Bueno 2019).

En base a lo mencionado, es posible hipotetizar que los gasterópodos *Tegula patagonica* y *T. geversianus* que habitan en ambientes tan disimiles desde el punto de vista del estrés ambiental, como lo son el inter y el submareal, y que además se encuentran a lo largo de la costa Argentina (gradiente latitudinal), presentan distintos ecomorfotipos. A su vez, el análisis a distintas escalas geográficas de la variación en forma de las conchas y su asociación con distintos tipos de ambientes, permitirá entender cuál de las escalas es más influyente en el modelado de la forma de la concha en estas especies.

### 2.2 Objetivo:

Describir y comparar los patrones de variación morfológica de *Tegula patagonica* y *Trophon geversianus* expuestas a diferentes presiones de estrés físico en las localidades estudiadas.

### 2.3 Hipótesis:

Dado que el fenotipo depende en su mayor medida de las variaciones ambientales cuando el genotipo se supone constante, los individuos del intermareal presentan diferencias morfométricas con los del submareal como consecuencia de un proceso adaptativo. A su vez, a escala latitudinal el ambiente cambia por lo que existen adaptaciones morfológicas en función de las características físicas de cada lugar.

## 2.4 Predicción:

En respuesta a una necesidad de contrarrestar el efecto de las olas y adherirse al sustrato, así como contrarrestar la desecación y las altas temperaturas, los individuos del intermareal presentarán conchas globulares y con aperturas circulares comparadas con la de los organismos del submareal.

## 2.5 Materiales y métodos:

### 2.5.1 Procesamiento de muestras y morfometría clásica:

Se recolectaron aproximadamente 50 individuos de las especies *T. geversianus* y *T. patagonica* manualmente en los sitios de muestreo en el nivel intermareal y submareal (Figura 1). La recolección de *T. geversianus* en GN se pudo realizar en los niveles inter y submareal de los tres sitios; en la localidad de RW en los intermareales de Cangrejales y Santa Isabel y dentro de la localidad de BC en el inter y submareal del sitio Algueros. La recolección de *T. patagonica* dentro del GN se realizó en Punta Este y Ambrossetti, en RW dentro del intermareal del sitio Cangrejales y en BC en el intermareal de Caleta Carolina. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Reproducción y Biología Integrativa de Invertebrados Marinos (LARBIM) del IBIOMAR–CCT CENPAT CONICET, donde se registró: peso total del cuerpo, peso de la concha y peso del cuerpo, en una balanza digital. A cada una también se le registró la longitud con un calibre digital. En el caso de *T. geversianus* se refirió a la distancia del ápice al canal sifonal y en la *T. patagonica* a la distancia del ápice a la abertura. La longitud se utilizó para relativizar el peso de cada ejemplar muestreado. Los análisis realizados sobre el peso se encuentran realizados sobre la relación peso/talla. Se calcularon las medias de cada variable por nivel, dentro de cada sitio y se compararon. En ambos casos no se pudieron cumplir los supuestos de la prueba ANOVA, por lo tanto, se trabajó con un análisis no paramétrico de la varianza Kruskal Wallis con el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011).

### 2.5.2 Morfometría geométrica:

Para el estudio de la forma de las conchas se utilizó morfometría geométrica 2D en *T. patagonica* y 3D en *T. geversianus*. Para eso se utilizaron una serie de

*landmarks* o puntos anatómicos definidos como loci con “nombre”. Estos puntos implican correspondencia de un individuo a otro y fueron definidos por coordenadas cartesianas (Bookstein *et al.* 1999) en las conchas calcáreas de cada especie. En el caso de las conchas de *T. geversianus* se utilizó una configuración de 17 *landmarks*: 14 en la cara apertural y 3 en la abapertural (Figura 2.1) siendo esta una modificación de la diseñada por Márquez y colaboradores (Márquez *et al.* 2015); la cual fue digitalizada con un brazo digitalizador 3D Microscribe.

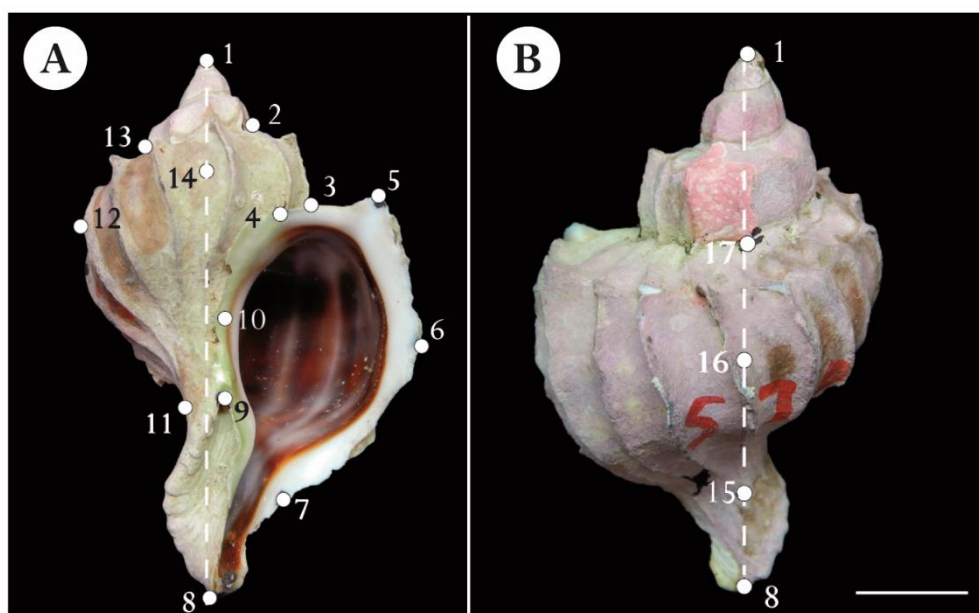


Figura 2.1: Configuración de *landmarks* para *Trophon geversianus*. A- *Landmarks* en cara apertural: 1-ápex, 2-borde derecho, sutura donde se une el penúltimo anillo con el plano y-z, 3-sutura del último anillo con el plano y-z, 4-donde termina la sutura, 5-cambio de curvatura en la primera parte de la vuelta, 6-parte más externa del labio externo, 7-cambio de pendiente del labio derecho del sifón, 8-máxima depresión del labio el sifón, 9-fasiola sifonal, 10-máxima curvatura sobre la apertura, 11-máxima curvatura de borde izquierdo, sobre el canal sifonal, 12-máxima curvatura del borde izquierdo, 13-borde izquierdo, sutura donde se une el penúltimo anillo con el plano y-z, 14-punto medio de la última vuelta; B- *Landmarks* en cara abapertural: 15-máxima curvatura sobre el canal sifonal, 16-máxima curvatura de la última vuelta, 17-sutura última vuelta. Barra de escala de 1 cm.

La digitalización consistió en dos etapas: inicialmente se marcaron los puntos con un marcador indeleble de punta fina sobre la superficie de cada concha (Figura 2.2 A). Para eso se hicieron en una superficie que los dejara inmóvil y se sistematizó el orden del marcado. En una segunda etapa se extrajeron las coordenadas en el plano x, y, z de cada uno de los puntos, previamente marcados, con el brazo

digitalizador (Figura 2.2 B). La información de forma fue luego analizada con el programa computacional MorphoJ versión 1.06d (Klingenberg 2011).



Figura 2.2: Proceso de digitalización. A- Marcado de los 17 puntos con tinta. B- Extracción de la coordenada del punto con el brazo digitalizador Microscribe.

Para analizar la forma de *T. patagonica*, se escaneó la cara apertural con un escáner 2D *Epson Perfection V370 Photo* y se trabajó solo en este plano para evitar error por la presencia de epibiosis (Figura 2.3).

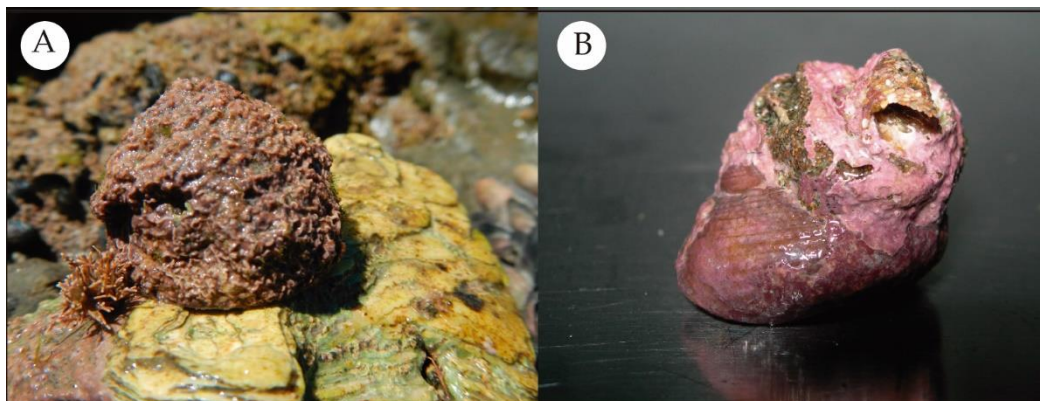


Figura 2.3: Detalle de epibiosis sobre *Tegula patagonica*, A- Incrustación de algas coralinas. B- Algas incrustantes y tubo de poliqueto.

En esta especie se trabajó sobre contornos curvos, en los cuales no se identificaron *landmarks*, por lo tanto, se utilizaron *semilandmarks*. Los mismos fueron distribuidos uniformemente sobre la superficie que se quiso capturar y luego fueron homologados matemáticamente (Bookstein 1991). En cada imagen escaneada se marcaron 5 *landmarks* y 18 *semilandmarks* (Figura 2.4), el proceso de digitalización se realizó mediante la utilización de una serie de programas computarizados denominados TPS (por sus siglas en inglés, *Thin Plate Spline*). Que consiste en tres módulos, el primero es TpsUtil que transforma un conjunto de archivos .jpg a otro .tps, luego este archivo es abierto en el programa TpsDig2 donde se escalan y digitalizan cada uno de los individuos. Posteriormente en el programa TpsRelw (Rohlf y Marcus 1993) se deslizan los *semilandmarks* a lo largo del contorno minimizando la energía de curvatura (*bending energy*), como criterio de homología, hasta que coincidan con la configuración de referencia (Bookstein 1991). Esta configuración de referencia es llamada también forma consenso, es decir el promedio de las formas bajo estudio. Finalmente se realizó el estudio de la forma en el programa MorphoJ.

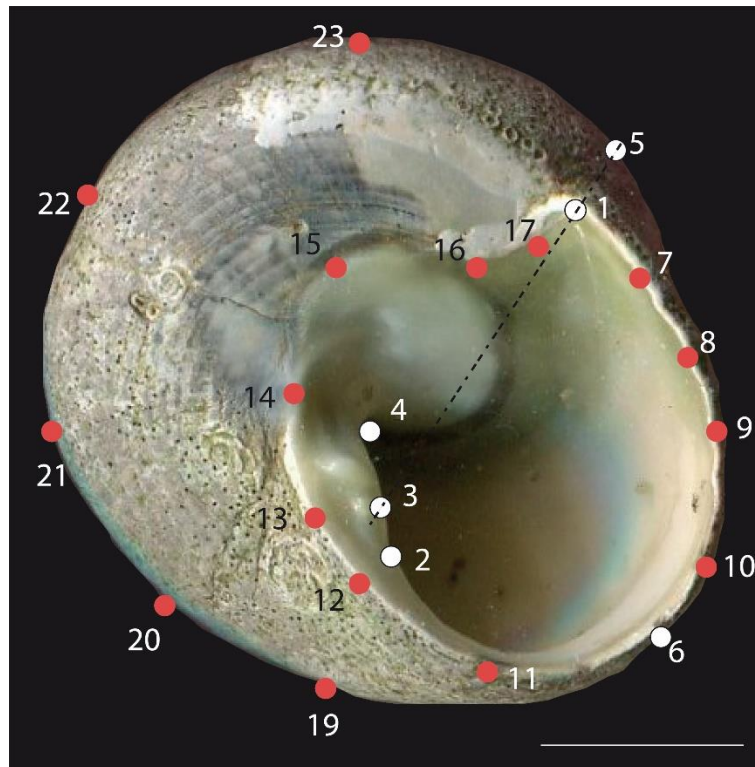


Figura 2.4. Configuración de *landmarks* para *Tegula patagonica*: En negro los de tipo 1 y en rosa los *semilandmarks*: 1-comienzo de la espira, 2-final del diente columelar, 3-punto medio del diente columelar, 4-comienzo de la apertura, 5-punto del contorno ubicado en línea recta a la intersección entre el *landmark* 1 y 3, 6-uni3n de la apertura y el contorno de la primera vuelta, 7-17-*semilandmarks* deslizados alrededor de la apertura, 18-23-*semilandmarks* deslizados en el contorno. Barra de escala de 1 cm.

Luego de extraer la informaci3n de forma de cada individuo, se estudi3 la misma dentro de MorphoJ de la siguiente manera: inicialmente se realiz3 el ajuste de Procrustes. Este ajuste elimina del objeto los efectos de escala, rotaci3n y translaci3n (Bookstein 1991), de la siguiente manera: se escalan las configuraciones de *landmarks* a un mismo tama1o, luego se rotan para minimizan la suma de cuadrados de las distancias entre s3 y por 3ltimo se desplazan a un origen de coordenadas com3n (Rohlf y Slice 1990). Al realizar el ajuste de Procrustes, se obtiene un valor estimado de tama1o para cada individuo denominado *centroid size* (CS), que est3 definido como la ra3z cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado desde un conjunto de *landmarks* al centroide que ellos definen (Rohlf y Slice 1990; Slice *et al.* 1996b; Zelditch *et al.* 2004). Con el objetivo de determinar qu3 porcentaje de la variaci3n en la forma est3 asociada con la variaci3n en el tama1o, se estudi3 la alometr3a mediante una regres3n multivariada (agrupada por sitio/nivel) de la forma

(coordenadas alineadas de Procrustes) sobre el tamaño (CS) (Bookstein *et al.* 1999; Monteiro 1999). Se visualizó el cambio de forma alométrico, proyectando los datos de la forma media de la muestra al incremento de determinada cantidad (factor de escala) de CS (Drake y Klingenberg 2007; Klingenberg 2008). En el caso de presencia de alometría en la muestra, en los subsiguientes análisis se trabajó con los residuos de la regresión como nuevas variables de forma independientes de la talla. Para conocer los componentes de forma que determinan los ejes del morfoespacio con mayor variación en forma, se realizó un análisis de componentes principales sobre la matriz de varianza-covarianza de las variables de forma. Posteriormente, se realizó un análisis discriminante canónico entre nivel x sitios x localidad y un análisis discriminante lineal entre los niveles inter y submareal de cada sitio. Estos análisis discriminantes buscan los componentes de forma que maximizan la separación entre los grupos. La diferencia entre las medias de la forma de la concha de cada nivel del intermareal se puso a prueba mediante el estadístico T cuadrado de Hotelling. La confiabilidad de la función discriminante se evaluó mediante una prueba de validación cruzada iterativa. Los resultados fueron graficados en histogramas de frecuencia acompañados de la reconstrucción de la forma media de cada nivel superpuestas, con el objeto de visualizar los componentes de forma que maximizan las diferencias de forma entre grupos. En el caso de *T. geversianus*, para mejorar la visualización de los cambios de forma de la concha en datos 3D, se utilizó una técnica de deformación de superficies (Wiley *et al.* 2005) mediante el uso de la función TPS (*Thin plate spline*). Los archivos de los vectores de variación se exportaron desde el programa MorphoJ como entrada para el software Landmark (Wiley *et al.* 2005), donde se deformó una superficie 3D proveniente de una tomografía computada de una concha de *T. geversianus*, que fue utilizada como punto de partida (individuo target) para visualizar el cambio en forma a partir del vector variación (individuo objetivo). Finalmente, para conocer el patrón de distancias de forma y su significancia estadística entre los sitios muestreados por niveles (SUB e IN) entre las localidades, se utilizó el método basado en el análisis de conglomerado jerárquico UPGMA-MDGC (Di Rienzo, Guzman y Casanoves), para el caso multivariado de comparación múltiples (Valdano y Di Rienzo 2007). Se tomó como significativo un  $p < 0,05$ , la línea de corte (Q) se estimó con una simulación de

Monte Carlo para la que se setearon 500 iteraciones en el *software* InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011).

## 2.6 Resultados:

### 2.6.1 Morfometría Clásica: *T. geversianus*

Se encontraron diferencias significativas entre las variables de peso y talla (peso total/longitud, peso de la concha/longitud, peso del cuerpo/longitud y longitud) para los niveles de cada sitio (Tabla 2.1). En los contrastes a posteriori, se observó que los organismos de menor peso y menor talla fueron los de Santa Isabel y Cangrejales de la localidad de RW. Mientras que entre los de mayor peso y talla se encontraron los ejemplares del submareal de Punta Este y Ambrossetti (GN).

**Tabla 2.1:** Resultado de la prueba Kruskal Wallis realizada sobre las variables medidas en *Trophon geversianus*. Las medias de los pesos se encuentran relativizadas a la talla. A la derecha se encuentran los contrastes de a pares, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

<b>Peso total (g)/longitud (mm)</b>									
Sitio	Nivel	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	Ranks	
Santa Isabel	Intermareal	50	0,28	0,09	0,26	337,62	<0,0001	48,26	A
Cangrejales	Intermareal	50	0,43	0,15	0,40			115,44	B
Algueros	Submareal	50	0,59	0,30	0,51			177,98	C
Ambrosetti	Intermareal	50	0,64	0,20	0,62			206,94	C
Punta Loma	Intermareal	50	0,69	0,44	0,63			214,29	C
Punta Este	Intermareal	50	0,71	0,22	0,72			234,00	C D
Algueros	Intermareal	50	0,92	0,46	0,90			284,36	D
Ambrosetti	Submareal	50	1,42	0,57	1,27			398,08	E
Punta Loma	Submareal	50	1,37	0,39	1,30			402,49	E
Punta Este	Submareal	45	1,45	0,37	1,47			414,84	E
<b>Peso de la concha (g)/longitud (mm)</b>									
Sitio	Nivel	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	Ranks	
Santa Isabel	Intermareal	50	0,18	0,08	0,16	303,30	<0,0001	56,71	A
Cangrejales	Intermareal	50	0,26	0,09	0,26			110,00	A
Algueros	Submareal	50	0,37	0,18	0,34			191,18	B
Punta Loma	Submareal	50	0,44	0,22	0,38			231,65	B C
Punta Loma	Intermareal	50	0,47	0,33	0,45			243,92	B C
Ambrosetti	Intermareal	50	0,44	0,14	0,43			247,90	C
Punta Este	Intermareal	50	0,46	0,15	0,43			252,98	C D
Algueros	Intermareal	50	0,59	0,27	0,56			308,87	D
Ambrosetti	Submareal	50	0,96	0,40	0,82			420,31	E
Punta Este	Submareal	45	1,06	0,35	1,03			435,20	E
<b>Peso del cuerpo (g) /longitud (mm)</b>									
Sitio	Nivel	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p	Ranks	
Santa Isabel	Intermareal	50	0,11	0,08	0,09	240,43	<0,0001	68,08	A
Cangrejales	Intermareal	50	0,17	0,09	0,16			154,18	B
Ambrosetti	Intermareal	50	0,19	0,08	0,18			190,48	B
Punta Loma	Intermareal	50	0,22	0,16	0,17			196,23	B
Algueros	Submareal	50	0,22	0,13	0,20			209,05	B C
Punta Este	Intermareal	50	0,26	0,12	0,23			256,24	C D
Algueros	Intermareal	50	0,33	0,21	0,28			293,64	D
Punta Este	Submareal	45	0,35	0,09	0,34			351,43	E
Punta Loma	Submareal	50	0,41	0,14	0,37			378,14	E
Ambrosetti	Submareal	50	0,46	0,20	0,40			392,87	E

2.6.2 Morfometría Geométrica: *T. geversianus*

El análisis permutacional de alometría realizado en todo el set de datos, rechaza la independencia entre la forma (coordenadas de Procrustes) y la talla (CS) ( $p < 0,0001$ ). El porcentaje de variación de la forma asociado al tamaño fue del 7,1 % (Figura 2.5). Los individuos de tamaños más grandes presentaron conchas con ápices constreñidos, espiras esbeltas y canal sifonal proyectado. A su vez, presentan apertura constreñidas en la zona cercana a la columela, con una expansión de la última vuelta (*wireframe* derecho Figura 2.5). Lateralmente presentan una espira retraída en el ápice y proyectada dorsoventralmente, con un canal sifonal proyectado y en ángulo.

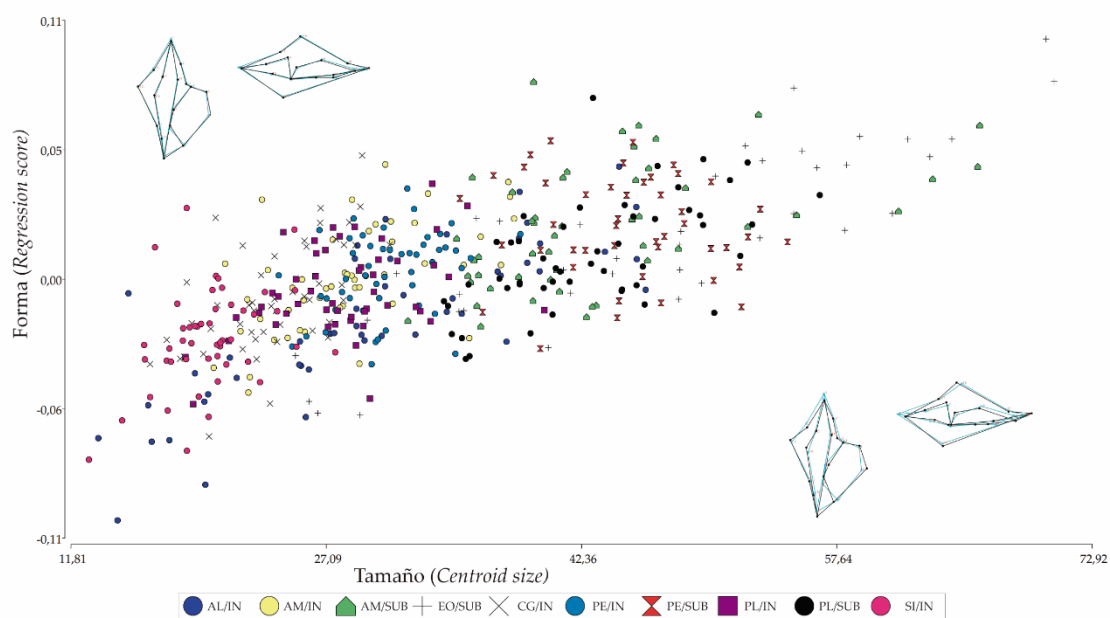


Figura 2.5: Gráfico de puntos entre la forma de la concha (*regression score*) en función del *centroid size* (CS), que ilustran la alometría en *Trophon geversianus*. Los polígonos (*wireframe*) celeste muestran la forma consenso y los negros los cambios correspondientes a aumentar 30 valores (derecha) y disminuir 30 valores (izquierda) de CS. Abreviaturas IN: intermareal, SUB: submareal, Al: Algueros, AM: Ambrossetti, CG: Cangrejales, PE: Punta Este, PL: Punta Loma, SI: Santa Isabel.

Para explorar el espectro de variación total de la muestra, se realizó un análisis de componentes principales (ACP). Se graficó la dispersión de cada individuo en el espacio de forma (morfoespacio), utilizando la variación explicada por los componentes principales (CP) 1 y 2 y se agruparon con elipses de confianza los

individuos por sitio y nivel (IN, SUB). La variación general explicada por los restantes CP mostró un elevado solapamiento, por lo que no fueron representados gráficamente (Figura 2.6, gráfica inferior). A lo largo del CP1, que explicó el 18,54% de la variación total, se observó una separación del grupo correspondiente al intermareal del sitio Santa Isabel (RW) hacia los valores positivos. La forma que caracterizó a los individuos de este extremo fue en vista apertural, conchas más elongadas y fusiformes con el borde de la apertura más retraído, ápices más estrechos y proyectado en ángulo opuesto a la apertura (imagen derecha, bajo el CP1 Figura 2.6). En vista lateral se observa que la concha está más proyectada en la última vuelta, con el canal sifonal menos desarrollado y desplazado hacia arriba. Las variaciones de forma contrarias son las que se observan en los valores negativos (apertura y espira más desarrolladas). El CP2 explicó el 10,5% en el cual también se observó un solapamiento de los grupos, separando levemente los individuos del intermareal de Santa Isabel y submareal de Alguerós hacia los valores negativos. Los individuos distribuidos hacia el extremo negativo del CP2 presentaron conchas estilizadas, aperturas amplias y proyectada (imagen inferior, a la izquierda del CP2, Figura 2.6). En vista lateral se observó que la apertura se encontró cercana al sedimento, la última vuelta comprimida dorsoventralmente y con el ápex y el canal sifonal en ángulo hacia arriba. Los ejemplares que se encontraron en los valores positivo mostraron los cambios de forma opuestos (imagen superior, a la izquierda del CP2, Figura 2.6).

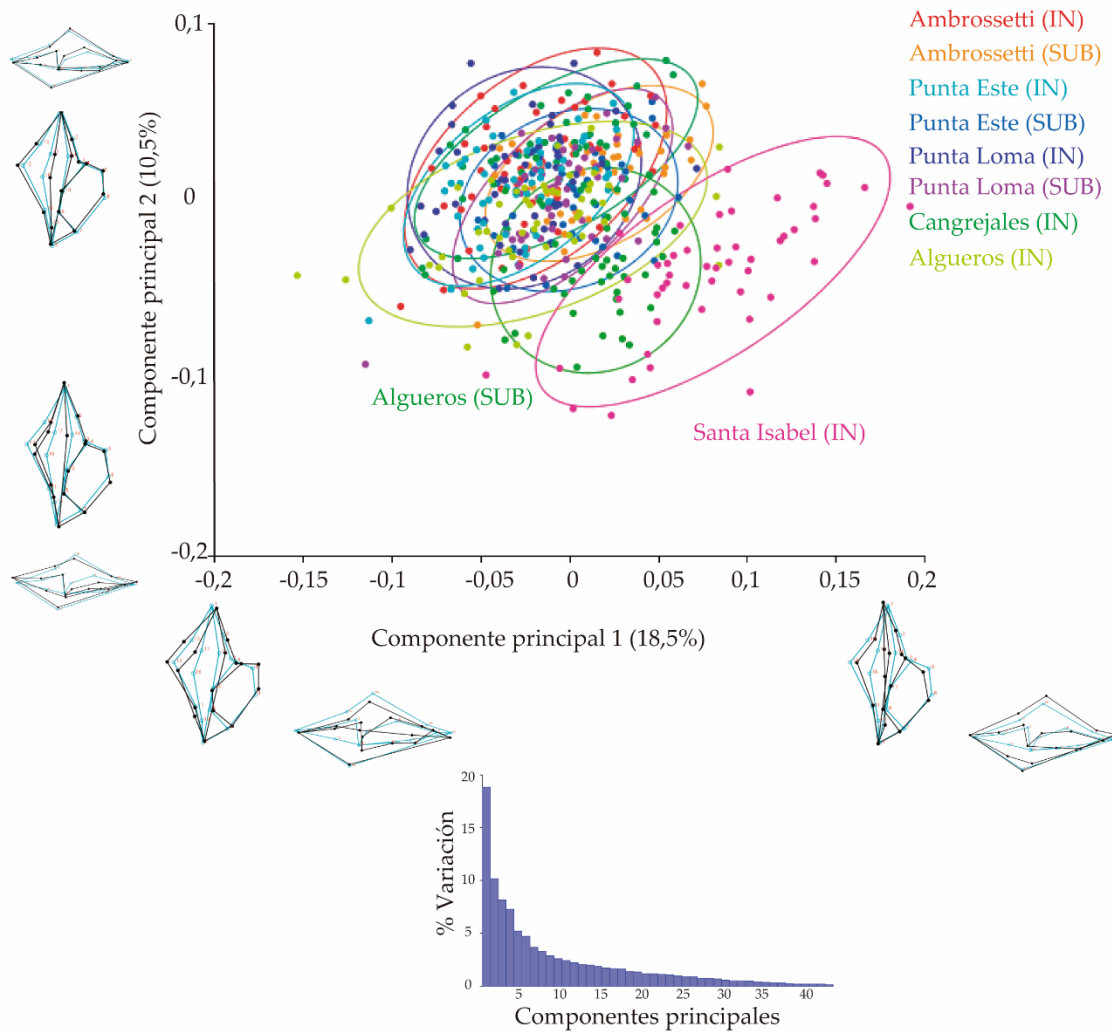


Figura 2.6: Diagrama de los dos primeros componentes principales, basado en sus distancias de Procrustes con elipses de confianza del 90%. Debajo de cada eje de variación se muestran las figuras con los vectores de desviación (negro) del promedio de la forma (celeste) hacia los valores positivos y negativos factor de escala CPI: -0,2 y 0,2, CP2: -0,15 y 0,15. Abreviaciones: IN, intermareal; SUB, submareal. Abajo se ven los componentes principales y la variación explicada por cada uno.

La regresión permutacional realizada entre los niveles de cada sitio dentro de GN también rechaza la independencia de la forma y la talla ( $p < 0,05$ ). En el caso Punta Este explicó un bajo porcentaje de variación 1,89 %, en Punta Loma 2,14% y 2,68% en Ambrossetti. La función discriminante indicó diferencias significativas entre todos los sitios de la localidad de GN (T-cuadrado:  $p < 0,0001$ ); en cada sitio los errores de asignación de cada ejemplar a los niveles IN y SUB fueron bajos (Tabla 2.2). En el caso del sitio Algueros (BC), la alometría explicó un 8,35% de variación.

El análisis discriminante (AD) indicó diferencias significativas entre los niveles (T-cuadrado:  $p < 0,0001$ ) y los errores de asignación fueron bajos (Tabla 2.2)

**Tabla 2.2:** Prueba de validación cruzada, se muestra el número de individuos clasificados en cada nivel y el porcentaje de asignación correcta.

Localidad	Sitio-Nivel	IN	SUB	% Precisión
GN	PE-IN	44	6	88
	PE-SUB	3	42	93
	PL-IN	45	5	90
	PL-SUB	6	44	88
	AM-IN	50	0	100
	AM-SUB	1	48	98
BC	AL-IN	44	5	90
	AL-SUB	5	34	69

En la variación de la forma entre los niveles, en general en todos los sitios se vio una tendencia a conchas más elongadas y fusiformes en el submareal (Figura 2.8). Los ápices fueron más agudos, en algunos casos en ángulo hacia abajo (PE, PL), la última vuelta siempre fue más ancha y comprimida, de manera más marcado en alguno de los sitios (AL).

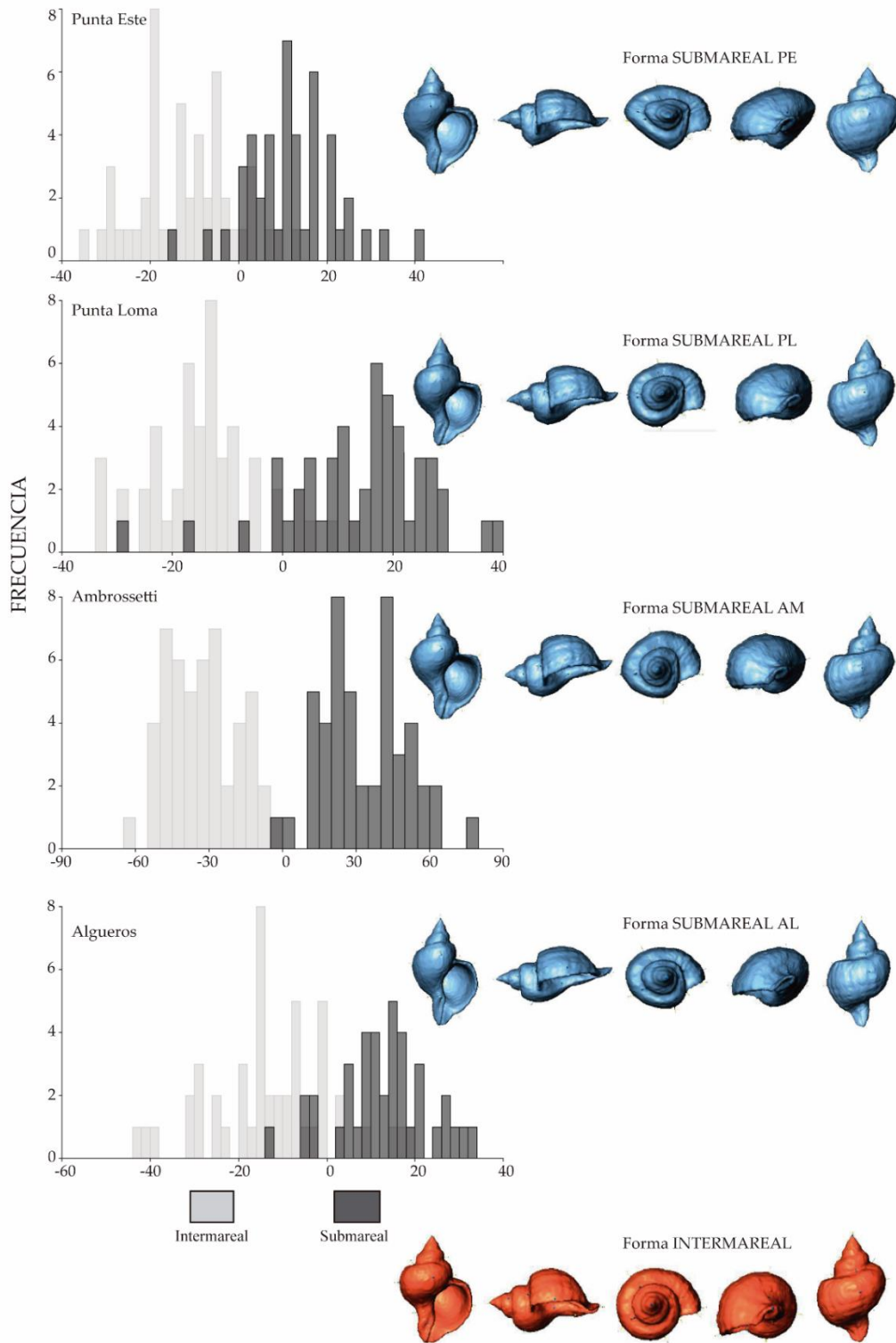


Figura 2.8: Diagrama de frecuencias correspondientes a la prueba de validación cruzada entre los niveles de cada sitio (gris intermareal y negro submareal). A la derecha se ven las formas resultantes en el desplazamiento a lo largo del eje discriminante, mostrando la deformación de la forma media intermareal (mostrada abajo) hacia la submareal de cada sitio. Abreviaciones: PE: Punta Este, PL: Punta Loma, AM: Ambrossetti, AL: Algueros.

Finalmente, se realizaron análisis de conglomerados con los valores de los CP para los intermareales y submareales de todos los sitios. En el conglomerado del intermareal (Figura 2.9), se obtuvieron 6 grupos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Dentro del conglomerado, se encuentra como grupo más divergente en forma, al intermareal de Santa Isabel (RW). Luego se separan los ejemplares del intermareal de Algüeros (BC) y Cangrejales (RW). La menor distancia se encuentra en los intermareales de GN, donde se separa la forma del intermareal de Ambrossetti.

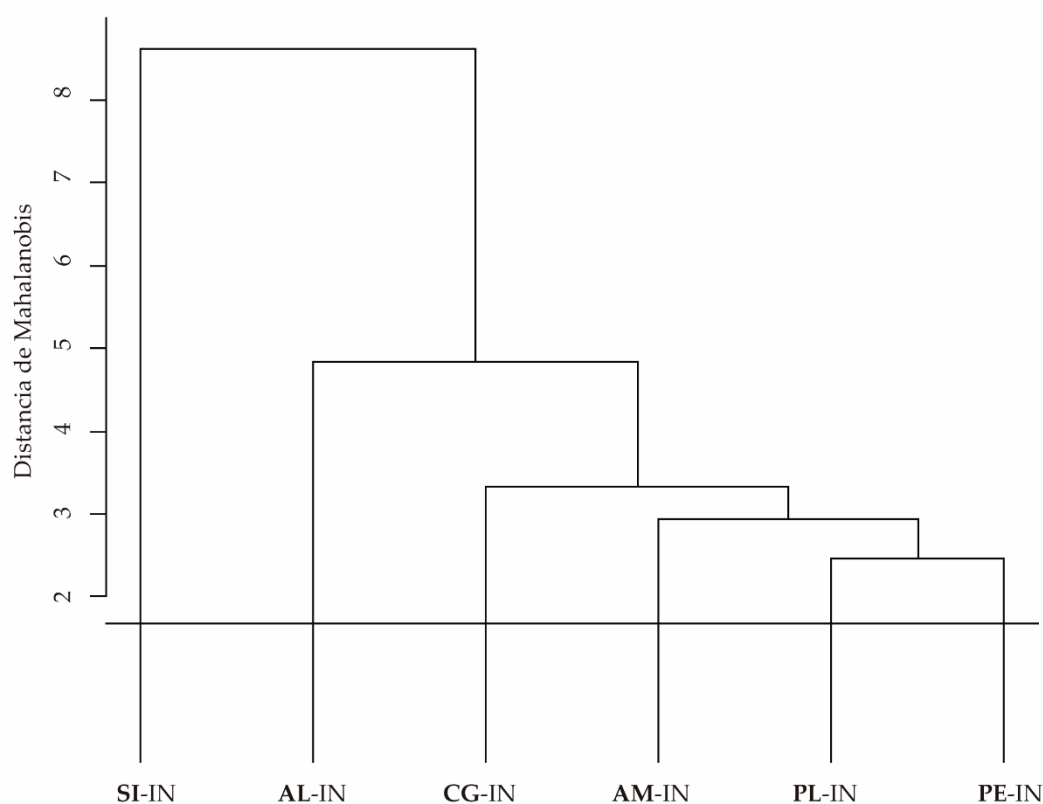


Figura 2.9: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA sobre las distancias de Mahalanobis, con los *PCscores* de todos los intermareales. El criterio de corte ( $p < 0,05$ ) fue obtenido con un MDGC y se indica con una línea horizontal. Abreviaciones: SI: Santa Isabel, AL: Algüeros, CG: Cangrejales, AM: Ambrossetti, PL: Punta Loma, PE: Punta Este.

En el conglomerado realizado entre los submareales (Figura 2.10), todas las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) y se encontraron por lo tanto 4 grupos. El grupo con menores distancias entre sí fue el conformado por

los sitios de AM y PE de GN, seguido por el de PL. Siendo el sitio que presentó mayor diferencia en forma el de Algueros.

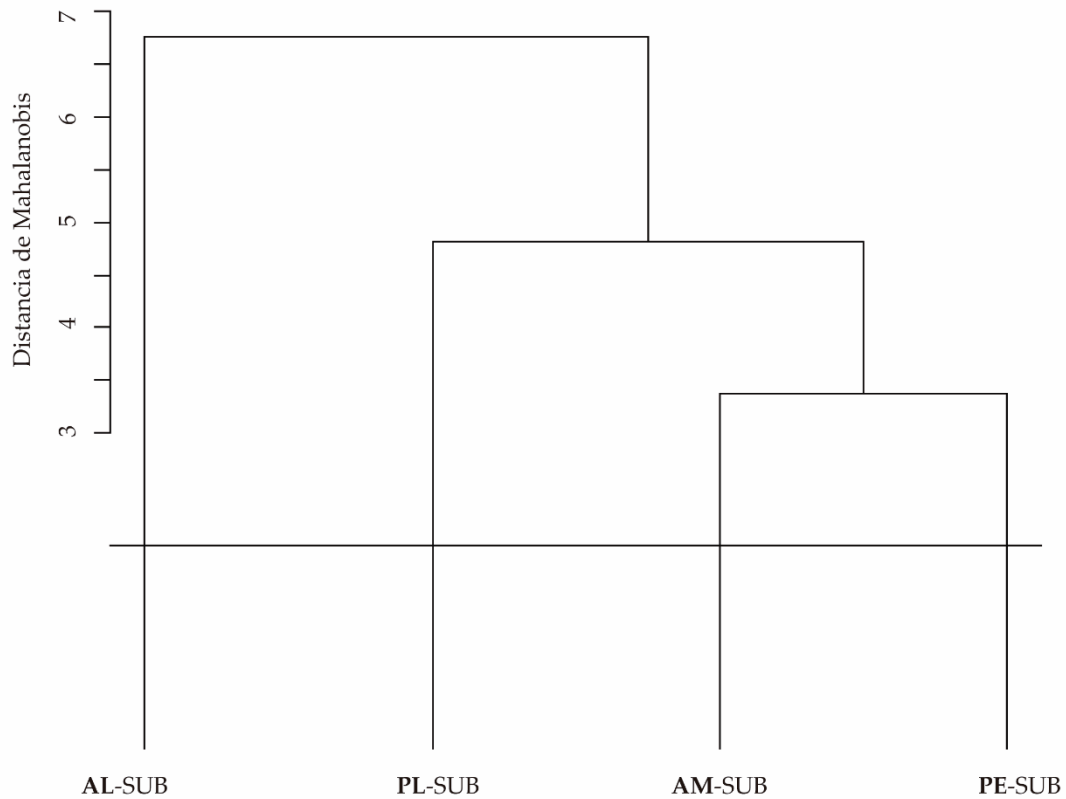


Figura 2.10: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA sobre las distancias de Mahalanobis, con los *PCscores* de todos los submareales. El criterio de corte ( $p < 0,05$ ) fue obtenido con un MDGC y se indica con una línea horizontal. Abreviaciones: AL: Algueros, PL: Punta Loma, AM: Ambrossetti, PE: Punta Este.

### 2.6.3 Morfometría Clásica: *T. patagonica*

Analizando el peso/talla se encontraron diferencias significativas para los niveles de cada sitio (Tabla 2.3). En los contrastes a *posteriori* realizados se encontró que el sitio y nivel de mayor peso/talla fue el intermareal de Cangrejales. Mientras que el menor índice fue encontrado en el intermareal de Punta Este.

**Tabla 2.3:** Resultado de la prueba Kruskal Wallis realizada sobre las variables medidas. Las medias de los pesos se encuentran relativizadas a la talla. A la derecha de encuentran los contrastes de a pares, las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Nivel	Sitio	N	Peso total (g)			H	p	Ranks	
			Medias	D.E.	Medianas				
Intermareal	Punta Este	50	0,89	0,11	0,89	155,99	<0,0001	128,32	A
Submareal	Punta Este	50	0,93	0,17	0,94			157,55	A
Intermareal	Caleta Caro	50	0,96	0,16	0,92			171,17	A B
Intermareal	Ambrossetti	50	0,96	0,16	0,92			171,17	A B
Submareal	Ambrossetti	50	1,01	0,13	1,00			214,02	B C
Intermareal	Cangrejales	50	1,69	0,25	1,70			370,12	D

### 2.6.4 Morfometría Geométrica: *T. patagonica*

Se observó la presencia de alometría en la muestra ( $p < 0,0001$ ), la cual explicó el 3,5 % de la variación en forma. Las formas correspondientes a los tamaños más grandes presentaron una apertura proyectada, con dientes columelares dispuestos en ángulo y la última vuelta más constreñida y circular (*wireframe* derecho Figura 2.11).

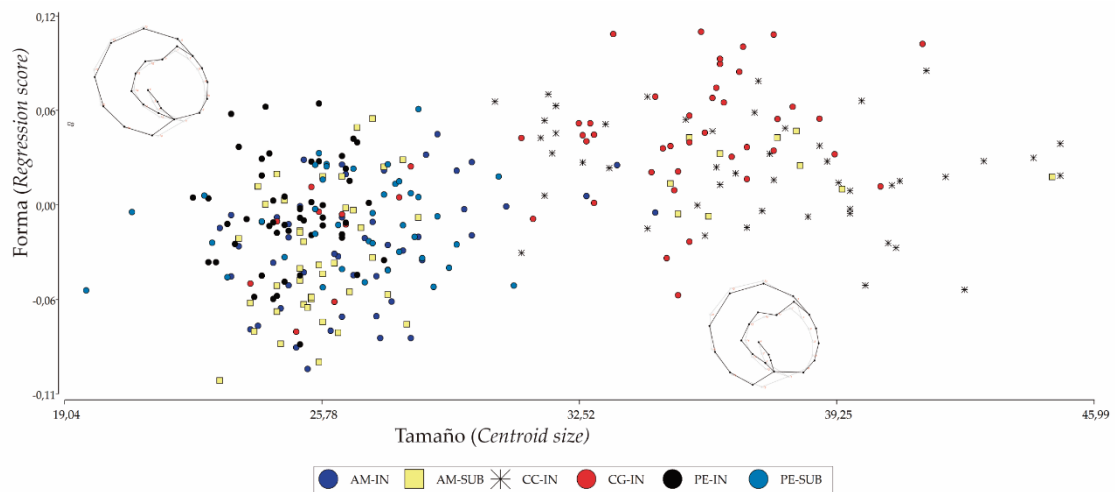


Figura 2.11: Forma en función del tamaño, que ilustran la alometría en *Tegula patagonica*. Los *wireframe* grises muestran la forma consenso y los en negro representan valores de 15 (derecha) y menos 15 valores (izquierda) de CS. Abreviaturas In: intermareal, Su: submareal, AM: Ambrossetti, CC: Caleta Carolina, CG: Cangrejales, PE: Punta Este.

En el ACP se graficó la dispersión de cada individuo en el morfoespacio, utilizando la variación explicada por CP1 y 2 y se agruparon con elipses de confianza los

individuos por sitio y nivel (Figura 2.12, gráfica inferior). Al igual que para *T. geversianus*, la variación general explicada por los restantes CP mostró un elevado solapamiento y bajos porcentajes de variación explicada, por lo que no se presentan gráficamente. A lo largo del CP1, que explicó el 23,7 % de la variación total, no se observó un patrón de separación entre los sitios y niveles. Hacia el extremo negativo se encontraron algunos ejemplares intermareales del sitio Cangrejales (RW), mientras que en el extremo positivo se encontraron ejemplares del sitio Caleta Carolina (BC). La forma que le corresponde a los individuos que se ubicaron en el extremo positivo del CP1, fue una apertura más expandida con los dientes columelares en ángulo y una concha más elongada e inclinada en sentido contrario a la apertura (figura derecha debajo el CP1, Figura 2.12). En los valores negativos del CP1 se presentan las variaciones de forma contrarias. A lo largo del CP2 (16,8%), se obtuvo una mayor dispersión entre los sitios y niveles. La forma de los individuos más cercanos al extremo negativo se caracterizó por presentar una concha con una apertura más amplia y dientes columelares en ángulo (figura inferior a la izquierda del CP2, Figura 2.12).

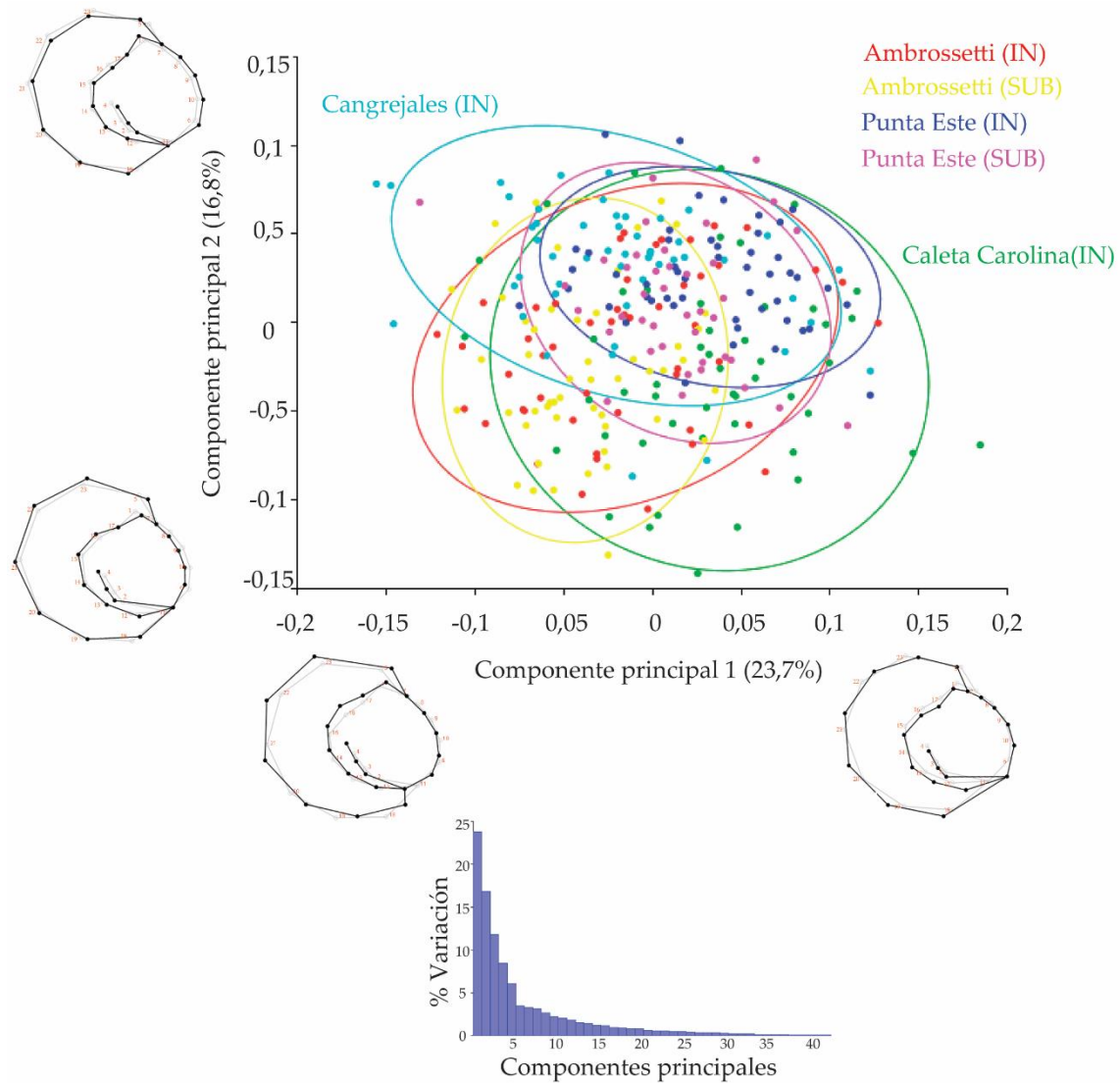


Figura 2.12: *Tegula patagonica*: Diagrama de componentes principales para cada sitio, basado en sus distancias de Procrustes con elipses de confianza del 90%. Debajo de cada eje de variación se muestran las figuras con los vectores de desviación en negro del promedio de la forma en gris. Cada figura corresponde a la variación encontrada en los valores -0,2 y 0,2 del CP1 y -0,1 y 0,1 del PC2. Abreviaturas IN: intermareal, SUB: submareal. Abajo se ven los componentes principales y la variación explicada por cada uno.

La regresión permutacional realizada entre los niveles de cada sitio dentro de GN también rechaza la independencia de la forma y la talla ( $p < 0,05$ ). En el caso de Punta Este, la alometría explicó un bajo porcentaje de variación 1,89 % y 6,11% en Ambrossetti. No se encontró diferencias significativas (T-cuadrado:  $p = 0,52$ ) entre la forma media de los niveles de Punta Este. La prueba de validación cruzada presentó un elevado número de errores de asignación entre los niveles del sitio

(Tabla 2.4). El mismo patrón en los resultados se observó para el sitio Ambrossetti (Figura 2.13).

**Tabla 2.4:** Validación cruzada, se muestra el número de individuos clasificados en cada nivel y el porcentaje de asignación correcta.

Localidad	Sitio-Nivel	IN	SUB	% Precisión
GN	PE-IN	27	23	54
	PE-SUB	22	16	42
	AM-IN	29	17	43
	AM-SUB	19	29	60

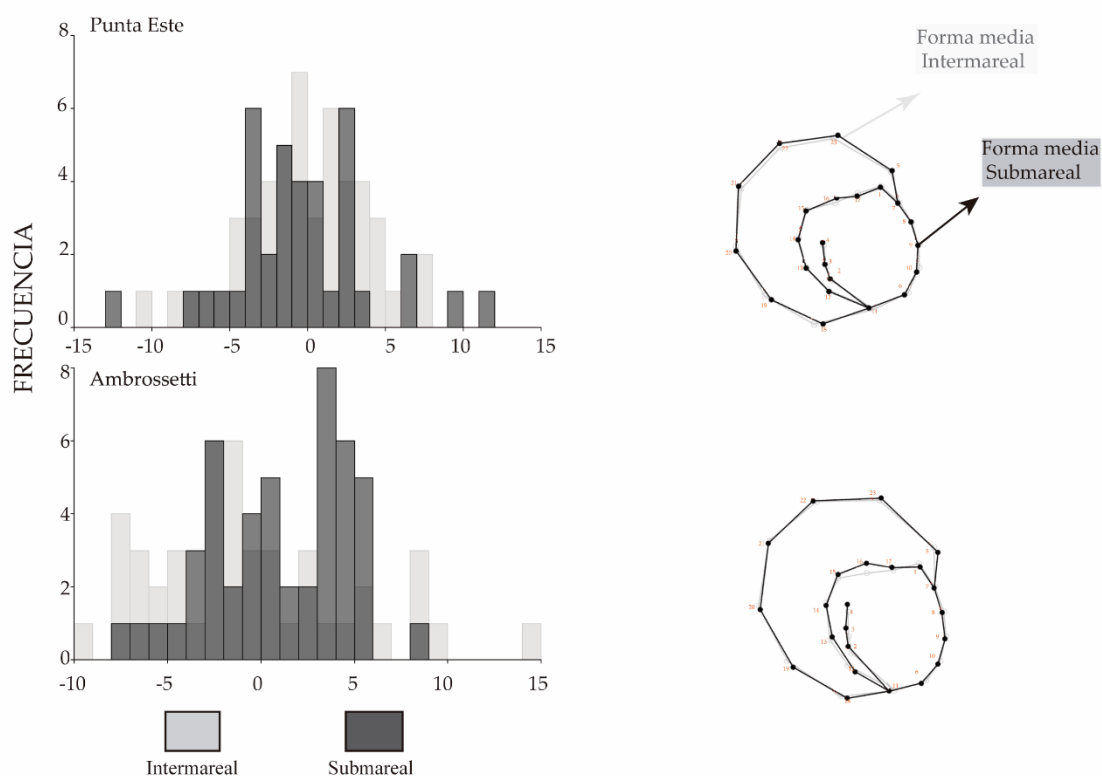


Figura 2.13: Diagrama de frecuencias correspondientes a la prueba de validación cruzada entre los niveles de cada sitio (gris intermareal y negro submareal). A la derecha se ven las formas medias de cada nivel por sitio.

Frente a la ausencia en diferencias significativas entre la forma IN y SUB se analizó solo la variación en los intermareales de todos los sitios. El análisis de conglomerados distinguió 4 grupos significativamente diferentes, correspondientes a cada uno de los sitios. No se encontró un patrón latitudinal de agrupación (Figura 2.14). Cabe destacar que las distancias entre los grupos de *T. patagonica* fueron menores a las presentadas en *T. geversianus*.

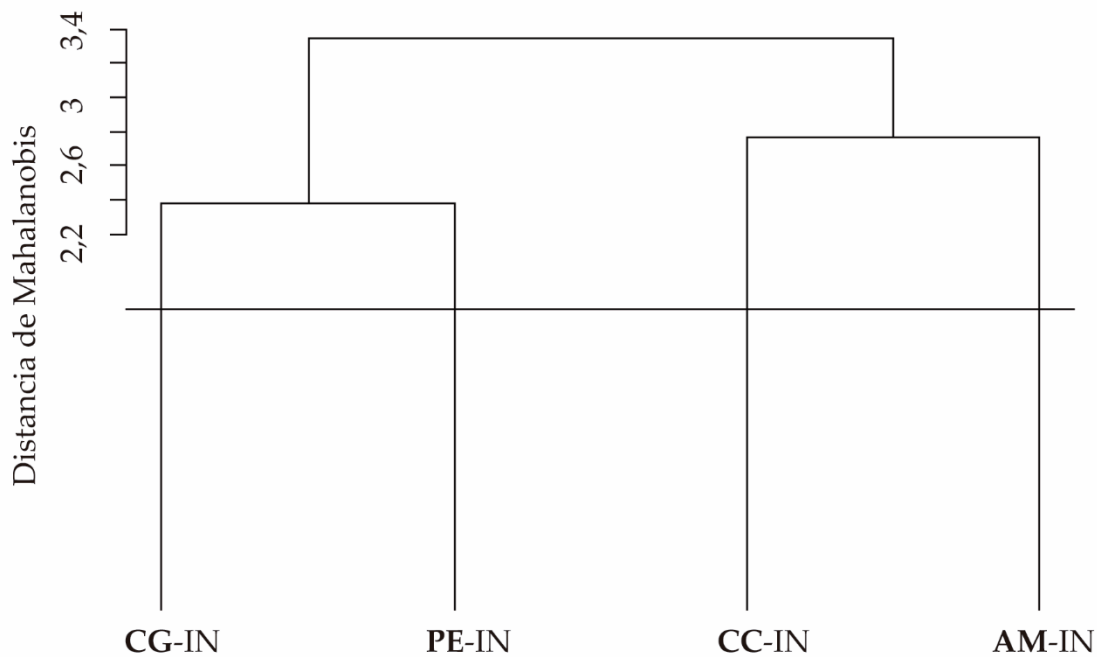


Figura 2.14: Análisis de Conglomerado Jerárquico UPGMA sobre las distancias de Mahalanobis, con los *PCscores* de todos los intermareales. El criterio de corte ( $p < 0,05$ ) fue obtenido con un MDGC y se indica con una línea horizontal. Abreviaciones: CG: Cangrejales, PE: Punta Este, CC: Caleta Carolina y AM: Ambrossetti.

## 2.7 Discusión:

Con el objetivo de describir y comparar los patrones de variación morfológica de *T. geversianus* y *T. patagonica* frente a diferentes presiones de estrés físico, se analizó la forma de la concha en una micro (IN-SUB) y macroescala (sitios) geográfica. En términos generales *T. geversianus* presentó menor variación que *T. patagonica*, pero estructurada. Es decir, en cada especie la influencia de estas escalas fue diferente. *T. geversianus* mostró una gran separación en forma dentro de la microescala, corroborando la presencia de los dos ecomorfotipos y ampliando el rango de distribución de su presencia. A macroescala, hubo un patrón de variación latitudinal, donde se observó menor variación en forma entre los submareales. Por el contrario *T. patagonica* no presentó diferencias en la forma de la concha en ninguna de las dos escalas geográficas.

La variación morfométrica de la concha de *T. geversianus* entre los niveles IN-SUB analizada con morfometría clásica, mostró mayor peso en los organismos

submareales que en los intermareales. Esto puede estar asociada a diferencias en la inversión de energía entre los niveles, el SUB al presentar un estrés físico menor que el IN, pero mayor presencia de depredadores rompedores de conchas (Rechimont *et al.* 2013; Márquez *et al.* 2015) pudo haber favorecido el desarrollo de conchas más grandes y pesadas. En cambio, el IN al ser más estresante, demandando más inversión de energía en la protección y defensa antiestrés (Hofmann 1999; Somero 2002). Latitudinalmente, no se observó para *T. geversianus* una relación de mayores pesos con el aumento de la latitud, como se hubiera esperado basándose en la ley de Bergmann (Bergmann 1848) descripta también en ectotermos (Van Voorhies 1997). En un estudio realizado por Malve y colaboradores (2016) a lo largo de 14 grados de latitud, donde se recolectaron conchas vacías (de individuos muertos) de la especie en 34 sitios, tampoco se encontró una relación entre el tamaño de la concha y el aumento de la latitud. En el caso de *T. patagonica*, se vio que los ejemplares de mayor peso fueron los que se encontraron en el intermareal de Cangrejales (RW). Los sitios dentro de la localidad de RW se caracterizaron por el elevado grado de estrés ambiental ya que en esta localidad se registraron los mayores valores de fuerza de ola y grado de exposición (ver Capítulo 1).

El estudio de la forma en *T. geversianus* nos indicó que los gasterópodos intermareales presentan una concha más globosa y abertura expandidas que el morfo submareal. Esta última característica se encontró en otros gasterópodos del género *Littorina* relacionada a la necesidad de fijarse al sustrato y resistir el embate de las olas. Aperturas más amplias se relacionan con la presencia de pies más grandes, que confieren una sujeción más efectiva (Johannesson 1986; Carvajal Rodríguez *et al.* 2005; Conde-Padín *et al.* 2007). Lo mismo fue descripto en ejemplares del género *Nucella*, donde aparte se demostró experimentalmente que el ecotipo expuesto presenta conchas más robustas que el ecotipo protegido (Guerra-Varela *et al.* 2009). Por el contrario, los individuos de *T. geversianus* del submareal mostraron una forma más elongada, angular y de abertura más estrecha, esta variación fenotípica podría estar relacionada con una defensa anti predatoria. Los gasterópodos expuestos a depredación por cangrejos presentan aperturas más

estrechas y conchas gruesas para limitar la ruptura (Vermeij 1972; Palmer 1979; Johannesson 1986; Trussell 2000; Menge y Branch 2001; Rochette *et al.* 2007; Bourdeau 2009).

La forma intermareal de *T. geversianus* mostró un patrón latitudinal (Figura 2.9), exceptuando el grupo correspondiente al sitio Sta. Isabel. Esta agrupación podría estar respondiendo a un patrón de condiciones físicas, los sitios de GN más cercanos entre sí, luego RW y BC, donde Sta. Isabel se distingue por ser una costa expuesta a condiciones más extremas (ver capítulo 1). Los ejemplares de latitudes más altas presentaron conchas más elongadas y fusiformes con el borde de la apertura más retraído, ápices más estrechos y proyectado en ángulo opuesto a la apertura (Figura 2.6). En vista lateral presentaron mayor proyección en la última vuelta, canal sifonal menos desarrollado y desplazado hacia arriba. La forma encontrada no es coincidente con la descrita para los *T. geversianus* de la provincia Magallánica (que abarca las localidades de RW y BC) según Malve y colaboradores (2018). Donde se describieron grandes conchas con espiras cortas y grandes aperturas en comparación a los ejemplares de la provincia Argentina (que abarca la localidad de GN del presente trabajo). Posiblemente estas diferencias encontradas, se deban a que Malve y colaboradores (2018) trabajaron con conchas vacías de ejemplares muertos colectados de la línea de marea. Este tipo de muestreo puede mezclar o sesgar el muestreo a uno de los ecomorfos y en última instancia generar resultados incorrectos. La variación en forma encontrada en este trabajo, estaría más relacionada con el patrón descrito para el muricido *Acanthina monodon* en Chile, donde las formas de altas latitudes presentaron espiras largas en comparación a las ubicadas al norte, asociadas a adaptaciones locales en cada punto (Sepúlveda y Ibáñez 2012). Un patrón latitudinal también se vio entre la forma de los sitios submareales (Figura 2.10), en este caso las distancias entre los grupos fueron menores, mostrando una menor diferencia en la forma. Este tipo de resultado era esperable ya que las condiciones submareales entre sitios son más estables en comparación con el intermareal.

En el caso de *T. patagonica* no se encontraron diferencias significativas entre los niveles, la forma de los ejemplares no presentó una tendencia clara. Esta falta de

diferenciación fenotípica entre el IN y SUB, podría deberse a que los individuos IN provengan del SUB, a diferencia de lo observado en *T. geversianus*. En trabajos realizados a lo largo del inter y submareal se encontró que la mayor abundancia se encuentra dentro de los primeros 5 metros de profundidad ( $352 \pm 234$  ejemplares por  $m^2$ ) mientras que muy pocos ejemplares permanecen en el intermareal, siendo la zona baja la de mayor abundancia que se descubre escasas horas por día ( $76,8 \pm 92,8$  ejemplares por  $m^2$ ) (Rechimont *et al.* 2013). La forma típica de alimentación de *T. patagonica* es ramonear sobre la superficie de algas laminares como por ejemplo *Undaria pinnatifida* (Teso *et al.* 2009), quedando así adherida y pudiendo ser distribuidas por rafting hacia la costa. Latitudinalmente tampoco se encontró un patrón determinado, los sitios agrupados por similitud en la forma fueron los más alejados geográficamente (Figura 2.12). En trabajos realizados en congéneres de la especie encontraron que el mayor rasgo morfotípico de la concha (rugosidad) no se encuentra prefijado genéticamente (Yamazaki *et al.* 2018), indicando que la mayor influencia en el cambio del fenotipo estaría asociada al ambiente. Dada la escala del presente estudio, la falta de una estructura de variación latitudinal de la forma puede estar dada por la conectividad propiciada por la presencia de una fase larvaria. Por otro lado, teniendo en cuenta la sensibilidad del género *Tegula* a los cambios en las condiciones ambientales (Aguirre *et al.* 2013), es posible que el espectro de variación fenotípica se encuentre canalizado. Considerando que la canalización se refiere a la capacidad de un organismo de desarrollar un fenotipo que le permita desarrollarse contrarrestando las perturbaciones ambientales y genéticas (Zakharov 1992). Pero teniendo en cuenta que eso no representa la ausencia de variación, sino que se mantiene un rango de variación por respuesta ambiental y genética (Willmore *et al.* 2007).

Comparando la variación de la forma a micro y macro escala geográfica, en el caso de *T. geversianus* se encontró que la principal separación de formas fue entre niveles (IN y SUB). Indicando que la variación en esta especie estaría dada principalmente por la heterogeneidad ambiental entre el IN y el Sub, donde los intermareales son más estresantes, mientras que los submareales son más homogéneos. Dado que es una especie de desarrollo directo y las ovicápsulas de

cada nivel son ovipuestas en ambientes separados (Cumplido *et al.* 2010), la diferencia fenotípica puede estar dada por la limitada dispersión de los reclutas. La oviposición en cada nivel puede ser un indicador de que ambos ecomorfotipos podrían tener un ciclo de vida cerrado en cada uno. En el caso de *T. patagonica*, no se encontró diferencias a microescala ni un patrón claro de manera latitudinal, esto podría indicar que la especie se desarrolla en el SUB y ya como adulto se incorpore al IN. Como se vio en trabajos realizados entre especies del género *Littorina* de desarrollo directo e indirecto (ver revisión Rolán-Alvarez 2015), la variación fenotípica se encuentra determinada mayoritariamente de manera genética en especies de desarrollo directo, mientras que el ambiente cobra una importancia mayor en las especies de desarrollo indirecto. Por lo tanto, la forma más homogénea de *T. patagonica* puede ser una respuesta al ambiente submareal, más estable, donde se desarrolla principalmente. Para poder determinar si la ausencia de variación en forma para esta especie se debe realmente al origen de la misma, se debería complementar este trabajo con una ampliación del muestreo, realizar experimentos de trasplante y complementar con análisis genéticos.

---

– Capítulo 3

Respuesta fisiológica de *Trophon*  
*geversianus* y *Tegula patagonica* al  
estrés

---

### 3.1 Introducción:

El intermareal es una zona de mucho estrés para los organismos marinos, especialmente para los ectotermos (Jeno y Brokordt 2014). Son ambientes únicos, que se encuentran expuestos a condiciones terrestres y marinas. Estas condiciones tan opuestas demandan grandes adaptaciones en las comunidades que lo habitan (Bertness *et al.* 2001; Bertness *et al.* 2006). Los intermareales rocosos son ambientes muy fluctuantes, caracterizados por un amplio rango de condiciones físicas (Denny y Wethey 2001). En Norpatagonia estas condiciones se encuentran entre las más severas del mundo (Bertness *et al.* 2006).

La síntesis de proteínas de choque térmico (Hsp) constituye una de las herramientas fisiológicas más importantes que tienen los organismos para soportar los ciclos ambientales del intermareal (Lindquist 1986 ; Tomanek y Sanford 2003; Jeno y Brokordt 2014). Las Hsp, son una familia de proteínas celulares altamente conservadas durante la evolución (Feder y Hofmann 1999; Farcy *et al.* 2007; Pöhlmann *et al.* 2011). Ante las tensiones térmicas, químicas o fisiológicas que provocan alteraciones en las proteínas, las células expresan preferentemente Hsp, un proceso llamado respuesta de choque térmico (o estrés) (Coronato *et al.* 1999). Como chaperonas moleculares, las Hsp protegen a las proteínas endógenas de la desnaturalización y facilitan su correcto plegamiento en conformaciones nativas o, en el caso de proteínas irreversiblemente dañadas, su eliminación de la célula a través de la proteólisis (Parsell y Lindquist 1993). Las Hsp se agrupan y designan de acuerdo a su peso molecular, formando familias, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 y las Hsp pequeñas (Fink 1999). En las células no estresadas, hay una producción constitutiva de dichas proteínas que son necesarias en el metabolismo normal de las proteínas manteniendo la homeostasis celular (Fink 1999; Dong *et al.* 2008). La familia de las Hsp70, es considerada como una de las más importantes por su rol preponderante de chaperona frente a condiciones de estrés extremo (Fink 1999; Iwama *et al.* 2004). Entre los factores naturales que regulan la expresión de Hsp, se encuentra la temperatura, estudiada en numerosos organismos (Feder y Hofmann 1999), la radiación solar, documentado en caracoles terrestres (Di Lellis *et al.* 2012), la falta de alimentación, documentada en caracoles marinos (Tomanek

y Sanford 2003) e incluso la presión por depredación (Pauwels *et al.* 2005; Hawlena y Schmitz 2010).

La posibilidad de producir proteínas anti estrés térmico, ayuda a determinar la distribución vertical de los organismos en su ambiente (Somero 2002), y representa un indicador fisiológico de su defensa contra la desnaturalización de proteínas constitutivas (Feder y Hofmann 1999). Los límites de distribución se crean bajo temperaturas que mantengan la estabilidad de las proteínas internas de cada especie (Somero 2002). Esto demanda una gran adaptación por parte de los organismos que habitan el intermareal, dado que dentro del mismo se encuentra una marcada zonación. Las zonas que se encuentran más altas son reveladas primero, dejándolas expuestas a la desecación por más tiempo que la zona media y baja respectivamente (Bertness *et al.* 2001). Las altas temperaturas y la gran cantidad de horas de exposición a la desecación en los estratos superiores, causa una limitación en la reproducción y el crecimiento de los organismos que lo habitan (Menge *et al.* 2002; Petes *et al.* 2007). Mientras que las condiciones más homogéneas y de menor exposición a la desecación en los estratos bajos, crean un ambiente óptimo para el asentamiento de numerosos individuos (Bertness *et al.* 2001). Consecuentemente, las especies que habitan las zonas más altas, dentro del intermareal, son capaces de responder y adaptarse a los cambios de temperatura y desecación, en comparación a los organismos que habitan zonas bajas. Es por eso, que en los intermareales rocosos de la Patagonia, cada zona tiene su biota característica. En el intermareal alto se encuentra una zona de roca desnuda dominada por cirrípedos, la zona media está cubierta de una homogénea matriz de mejillines, mientras que la zona más baja está cubierta del alga coralina (Bertness *et al.* 2006; Rechimont *et al.* 2013; Mendez *et al.* 2014).

Los moluscos, dada su condición de ectotermos, son un excelente modelo de estudio de tolerancia térmica. La expresión de Hsp, bajo la acción de distintos estresores ha sido estudiado en varias especies de moluscos, como por ejemplo en *Ostrea edulis* (Piano *et al.* 2005), *Placopecten magellanicus*, *Argopecten irradians* (Brun *et al.* 2008), *Mytilus galloprovincialis* (Franzellitti y Fabbri 2005),

*Concholepas concholepas* (Roco 2010) y *Haliotis tuberculata* (Farcy *et al.* 2007), observando un incremento en la síntesis frente a condiciones de estrés térmico.

### **3.2 Objetivo:**

Evaluar la respuesta fisiológica de poblaciones de *Tegula patagonica* y *Trophon geversianus*, expuestas a diferentes presiones de estrés físico.

### **3.3 Hipótesis:**

Los diferentes niveles de estrés físico ambiental presentes en el intermareal y submareal, generan distintas respuestas fisiológicas en los organismos que los habitan, encontrándose los mayores niveles de estrés en individuos del intermareal.

### **3.4 Predicción:**

Los organismos que habiten el intermareal estarán expuestos a un mayor estrés físico, por lo tanto, tendrán una mayor tasa de síntesis de proteínas de choque térmico Hsp70 que los organismos del submareal.

### **3.5 Materiales y métodos:**

En cada localidad, se recolectaron entre 5 y 10 individuos de cada especie en ambos niveles (inter y submareal, salvo RW donde se trabajó solo en el intermareal, debido a la ausencia de visibilidad en todas las campañas realizadas) en temporada de invierno y verano. Cada muestra fue rotulada y depositada *in situ* en un termo con nitrógeno líquido, y posteriormente almacenadas en un ultrafreezer a -80 °C (Figura 3-1).



Figura 3.1: A- Detalle del termo de nitrógeno y sus *canister*. B- Rotulado y almacenado de los individuos para su traslado en el termo de nitrógeno desde el sitio de muestreo al laboratorio.

### 3.5.1 Preparación de las muestras:

Se diseccionó el cuerpo de cada individuo, separando el tejido muscular (pie) y el reproductivo (gónadas y glándulas) sobre una cama de hielo. Los tejidos fueron homogeneizados mecánicamente en hielo con un *Buffer* de extracción (Tris 50 mM pH 7,4; EDTA 7,5 mM; DTT 0.5 mM; Sacarosa 0,25 M; Glicerol 10 %), en presencia de inhibidores de proteasas (Sigma). Dependiendo de la dureza del mismo, se utilizó un embolo manual (*dounce tissue grinder* para tejidos blandos) o un homogeneizador de mano (PRO Scientific- PRO 200). Finalmente, las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 12000 rpm a 4 °C, se descartó el pellet y se almacenó el sobrenadante (extracto de proteínas totales) en el ultrafreezer a - 80 °C.

### 3.5.2 Cuantificación de proteínas totales:

Se utilizó el método Lowry (Lowry *et al.* 1951) para estimar la concentración de proteínas totales en cada muestra. Brevemente, 3  $\mu$ l de cada extracto fueron diluidos con 97  $\mu$ l de agua destilada y 0,9 ml de la solución alcalina (sulfato de

cobre 1%, tartrato de sodio y potasio 2%, carbonato de sodio 2%, hidróxido de sodio 0,1 N). Luego se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente y se le añadió 100 µl del reactivo Folin Ciocalteus diluido a la mitad en agua destilada, continuándose la incubación por 30 minutos cubiertos de la luz. Finalmente se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Hewlett Packard 8452A) y se determinó la concentración de proteína con respecto a un estándar de albumina bovina.

### 3.5.3 Ensayos de Western Blot:

Para determinar la expresión de las proteínas de interés, se realizó el ensayo de Western Blot sobre las muestras (tejido gónada, n= 3-5) de cada nivel por localidad provenientes de los muestreos de verano e invierno. Las muestras (entre 100 y 50 µg de proteínas totales) fueron hervidas durante 5 minutos en *buffer* de siembra (Tris 100 mM, pH 8, SDS 1.7%, Azul de Bromofenol 0.02%, DTT 1.5% y Glicerol 5%), y las proteínas separadas por su peso molecular en electroforesis con geles de poliacrilamida y SDS (SDS-PAGE). Luego, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron bloqueadas con leche descremada diluida al 5% en TBS-T (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1 %). Posteriormente, dichas membranas fueron incubadas con los anticuerpos (Ac) primarios específicos diluidos en TBS-T: Hsp70 (sc-33575 *rabbit* policlonal, sc-24 y sc-32239 *mouse* monoclonal), Erk1/2 (sc-94 *rabbit* policlonal), todos de Santa Cruz Biotechnology. La incubación se realizó en camas húmedas, por 24 horas a 4°C. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas tres veces con TBS-T e incubadas con los Ac secundarios (anti-*rabbit* o anti-*mouse* peroxidasa, Vector Labs.) durante una hora. Luego de los lavados, las proteínas de interés fueron detectadas por quimioluminiscencia utilizando una solución de luminol/cumárico/peróxido de hidrógeno y películas radiográficas (AGFA, ORTHO CP-GU). El análisis densitométrico se realizó usando el programa ImageJ 1.32J (NIH, EE.UU.). Los niveles de expresión de Hsp70 se relativizaron a los niveles de Erk1/2 (control de carga) en cada muestra. Luego, para poder comparar todas las muestras entre sí, minimizando las diferencias entre distintos ensayos, se preparó una muestra “estándar” (ST) con partes iguales de 18 muestras de gónadas de *T.*

*geversianus*. En cada gel se corrieron dos calles con la misma cantidad de estándar y una inicial con el Marker. Finalmente, la expresión de Hsp70 de cada muestra fue relativizada a su correspondiente Erk1/2, y dicha relación estandarizada a la muestra ST (Dong *et al.* 2008; Lima *et al.* 2016) (Figura 3.2).



Figura 3.2: Fuente de poder conectada a la cuba de electroforesis, detalle de sembrado en gel de poliacrilamida de 15 calles.

#### 3.5.4 Análisis estadísticos:

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5 (CA, EE.UU.). Las igualdades de las medias de expresión de Hsp entre los niveles (IN-SUB) se evaluaron con una prueba T-Student. En el caso de las comparaciones latitudinales, las medias se compararon con una prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$ .

### **3.6 Resultados:**

La expresión de Hsp70 en gónada de *Trophon geversianus* fue significativamente mayor en el intermareal de GN, en comparación al submareal correspondiente a la temporada de verano. No se observó un patrón significativo durante el invierno, pero la tendencia fue inversa. En BC la expresión también fue significativamente mayor en el intermareal, en comparación al submareal, durante el verano y sin diferencias significativas durante el invierno. Sin embargo, en este caso no se mostró una tendencia definida (Figura 3.3).

*Trophon geversianus*

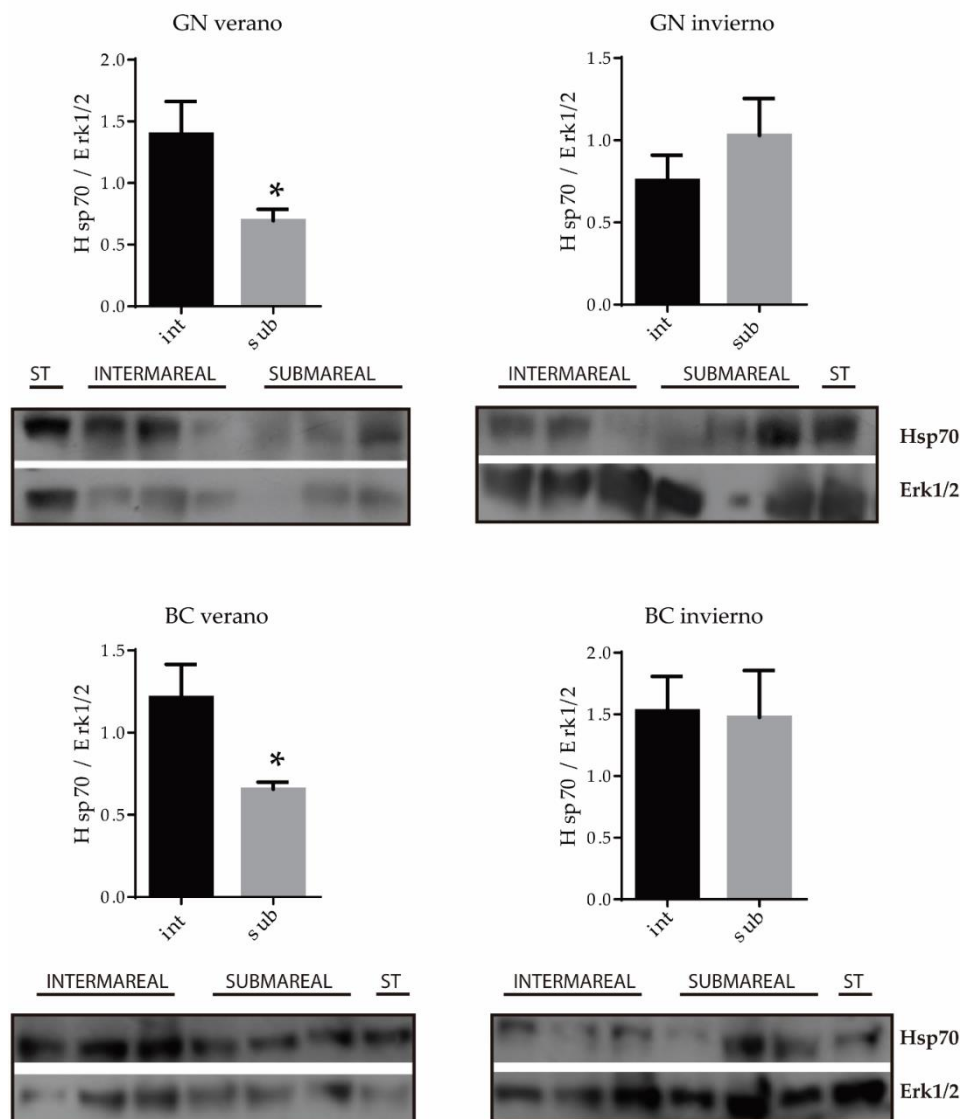


Figura 3.3: Niveles de expresión Hsp70 en gónada de *Trophon geversianus* sobre muestras recolectadas en el campo durante las temporadas de verano e invierno en GN (arriba) y BC (abajo). Los graficos resumen la expresion de Hsp70 en 3-5 muestras independientes (media±DS). El asterisco indica diferencias significativas en el nivel de expresión, basados en un T-test ( $p < 0.05$ ). Se muestran ensayos representativos de Western blot. ST: muestra estandar.

La expresión de Hsp70 en gónada de *Tegula patagonica* no mostró una diferencia significativa entre los niveles inter y submareal en ninguna de las localidades ni estaciones analizadas. La tendencia que se encontró en cada caso fue la de una mayor expresión en las muestras provenientes del intermareal, aunque sin ser significativa. Por otro lado, la media de expresión total (verano más invierno) entre

las localidades fue diferente, en BC la media ( $2,68 \pm 0,48$ ) fue significativamente mayor que la media de expresión en GN ( $1,2 \pm 0,15$ ) (Figura 3.4).

*Tegula patagonica*

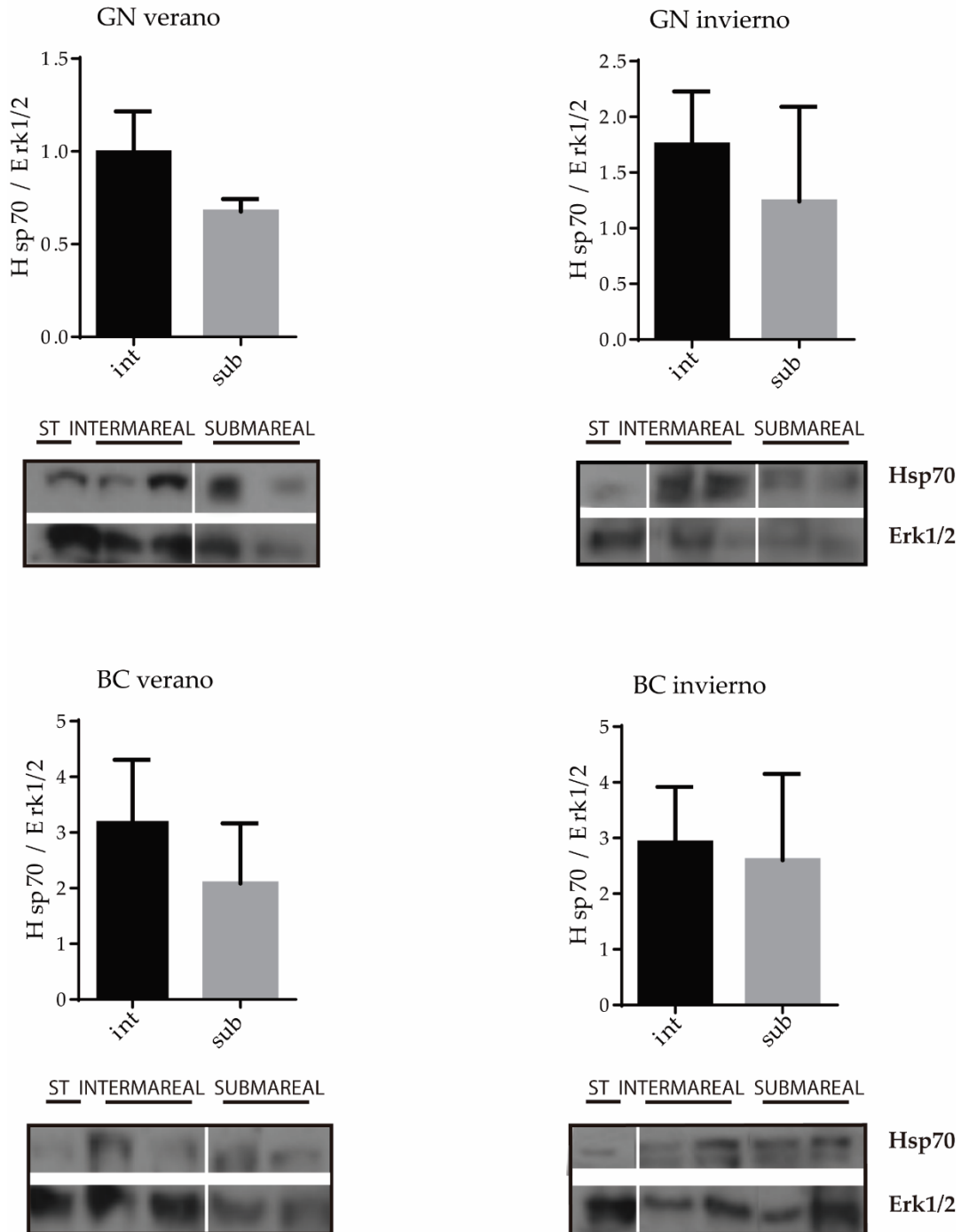


Figura 3.4: Niveles de expresión Hsp70 en gónada de *Tegula patagonica* sobre muestras recolectadas en el campo durante las temporadas de verano e invierno en GN (arriba) y BC (abajo). Los graficos resumen la expresion de Hsp70 en 3-5 muestras independientes (media±DS). Se muestran ensayos representativos de Western blot. ST: muestra estandar.

La expresión de Hsp70 en *T. geversianus*, no varió durante el verano entre los tres intermareales muestreados. En la temporada de invierno, se encontró una expresión significativamente superior en las localidades de RW y BC, en comparación a GN. En el caso de *T. patagonica*, la expresión de Hsp70 durante el verano fue significativamente superior en BC. Durante el invierno, se registró un incremento en la expresión de las localidades de RW y BC, siendo significativo entre GN y BC (Figura 3.5).

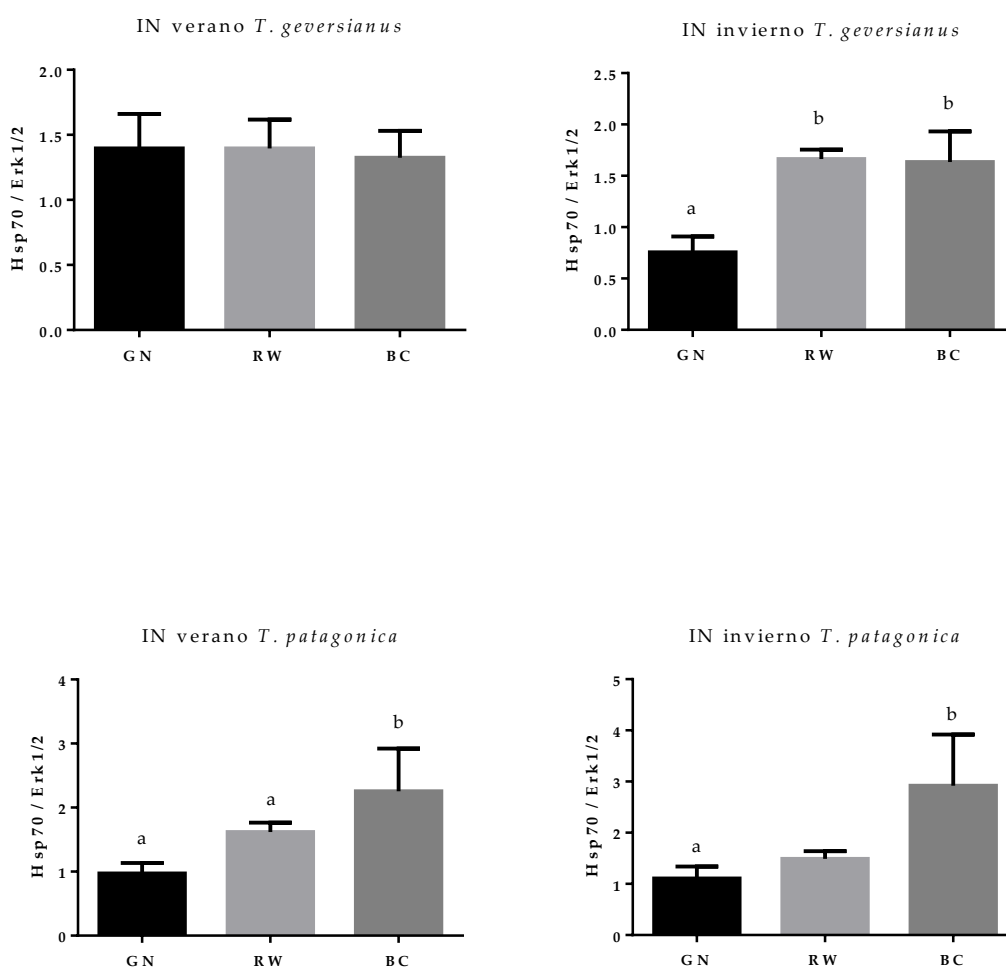


Figura 3.5: Niveles de expresión Hsp70 en gónada de *Trophon geversianus* (arriba) y *Tegula patagonica* (abajo), sobre muestras recolectadas en el intermareal (IN) durante las temporadas de verano e invierno en GN, RW y BC. Los graficos resumen la expresion de Hsp70 en 3-5 muestras independientes (media±DS). a vs b p<0,05 correspondiente a un test de comparaciones multiples de Tukey.

### 3.7 Discusión:

Tanto a micro escala, es decir entre el intermareal y submareal, como a macro escala, entre los intermareales de las distintas localidades, se encontró un perfil de expresión de Hsp70 diferente entre las dos especies estudiadas. El análisis de expresión de Hsp70 permitió comparar el grado de adaptación de estas especies al ambiente donde viven y su cuantificación facilitó la interpretación biológica.

Para *T. geversianus* el factor de estrés diferencial entre niveles fue determinante para la expresión de Hsp70, registrando los valores más elevados en el intermareal. Al comparar la expresión entre distintos intermareales en diferentes épocas del año, se observó que mantuvo un elevado grado de expresión durante el verano y en invierno en los lugares de mayor viento y oleaje (RW y BC, ver Capítulo 1). Esto podría estar relacionado con la sensibilidad en la respuesta a cada agente de estrés (Sagarin y Somero 2006). Por el contrario, en *T. patagonica* no se observaron diferencias de expresión entre los niveles. Solo respondió de manera distinta entre los intermareales en una macro escala, lo cual podría estar asociado con la diferencia entre el nivel de estrés de los sitios muestreados. Tanto en verano como en invierno, la expresión de Hsp70 fue elevada en BC, localidad de estrés intermedio superior a GN (ver Capítulo 1). El hecho de no encontrar también diferencias con RW, podría ser atribuido a las características donde habitan los organismos en dicha localidad. Los ejemplares recolectados se encontraron en una zona de rocas protegidas por una barrera natural que los cubría del oleaje y el viento (Figura 3.6). La falta de significancia en la respuesta de *T. patagonica* entre los niveles (IN-SUB), podría estar dada por la poca exposición a la desecación que experimentan los individuos que habitan el intermareal bajo, asemejándolos a las condiciones estables que experimentan los que habitan el submareal. También se debe tener en cuenta que siendo una especie de desarrollo indirecto es posible que los ejemplares del submareal e intermareal entrecrucen sus larvas, disminuyendo así el aislamiento de las poblaciones y el efecto de sus adaptaciones locales.

Si bien cada organismo en un intermareal habita una zona en la cual la tolerancia térmica y desecación le permite (Mizrahi *et al.* 2014), se demostró que, de estos dos factores de estrés, la desecación sería el mayor modulador de la expresión de

Hsp en general, y de Hsp70 en particular (Tomanek y Somero 2000). Por lo tanto, una expresión significativamente mayor de Hsp70 en individuos habitando zonas de mayor intensidad de viento como lo son RW y BC (ver Capítulo 1), podría ser atribuida al efecto de la desecación. Diferencias en las adaptaciones a condiciones de estrés en organismos que habitan distintos estratos de un mismo intermareal fueron documentados para otros caracoles (Tomanek y Somero 1999, 2000; Tomanek y Helmuth 2002; Tomanek y Somero 2002; Tomanek y Sanford 2003; Stenseng 2005; Dong *et al.* 2008; Tomanek y Zuzow 2010). Si bien en numerosos trabajos se encontró que las especies que habitan en zonas de mayores temperaturas expresan menores niveles de Hsp70, por encontrar límites de tolerancia más altos (Tomanek y Somero 1999, 2000, 2002; Tomanek y Sanford 2003), nuestros resultados indican que los ejemplares de *T. geversianus* extraídos del intermareal, expresan mayores niveles de Hsp70 que los extraídos en el submareal, es decir una respuesta opuesta. Sin embargo, dichos resultados estarían en concordancia con la premisa de que las especies que habitan nichos de mayor temperatura son más tolerantes a la misma y por lo tanto expresan mayores niveles de Hsp (Nakano y Iwama 2002; Dahlhoff y Rank 2007; Evgen'ev *et al.* 2007). Además, estaría relacionado con una defensa anti estrés diferente entre las poblaciones de *Trophon geversianus* y *Tegula patagonica*. Dado que se encontró que las poblaciones que se encuentran expuestas a condiciones más extremas tienen una defensa denominada “preparatoria”, es decir un nivel de proteínas de choque térmico que permiten lidiar con eventos de estrés (Dong *et al.* 2008). *T. geversianus*, por habitar en una zona más expuesta del intermareal, podría tener una defensa preparatoria superior, que se traduciría en una mayor capacidad de responder a situaciones de estrés térmico a través de la expresión de Hsp70 y otros mecanismos no analizados en esta tesis. Mientras que *T. patagonica*, que se encuentra expuesta de manera infrecuente, o dicho de otra manera, su hábitat es más homogéneo en términos de cambios de temperatura y desecación, presentaría una menor capacidad de respuesta, al menos en términos de expresión de Hsp70. Una mayor tasa de defensa térmica en organismos de intermareales altos fue registrado en trabajos anteriores. Por ejemplo, estudiando congéneres de *Tegula*,

se observaron diferencias en la tolerancia cardíaca al calor, correlacionadas a su distribución intermareal y submareal (Stenseng 2005). La resistencia cardíaca de las especies distribuidas en zonas altas fue superior, indicando una mayor adaptación a grandes amplitudes de temperatura (incremento del euritermalismo). Resultados similares se obtuvieron en poblaciones del cangrejo de porcelana (*Petrolisthes*) analizando diferentes respuestas fisiológicas (Stillman 2002). Incluso también en caracoles del género *Lottia* distribuidos en distintas zonas del intermareal (Dong *et al.* 2008). Donde las poblaciones del intermareal alto expresaron mayores niveles de Hsp70 que las distribuidas en el intermareal bajo.

La tolerancia térmica de las especies es un estudio que cobra importancia actual. Aquellas especies que habitan zonas medias y altas del intermareal, de mayor euritermalismo y tolerancia térmica, podrían ser más vulnerables al cambio climático que las especies menos tolerantes al calor (Harley *et al.* 2006). Debido principalmente a que habitan en los límites de tolerancia térmica que pueden soportar (Hofmann y Somero 1995; Feder y Hofmann 1999; Hofmann 1999; Somero 2002). Siendo este un patrón que también se mantiene a una escala latitudinal: las especies de latitudes bajas viven más cerca de sus límites térmicos que las especies de latitudes más altas (Stillman 2002; Tomanek y Helmuth 2002; Stillman 2003).

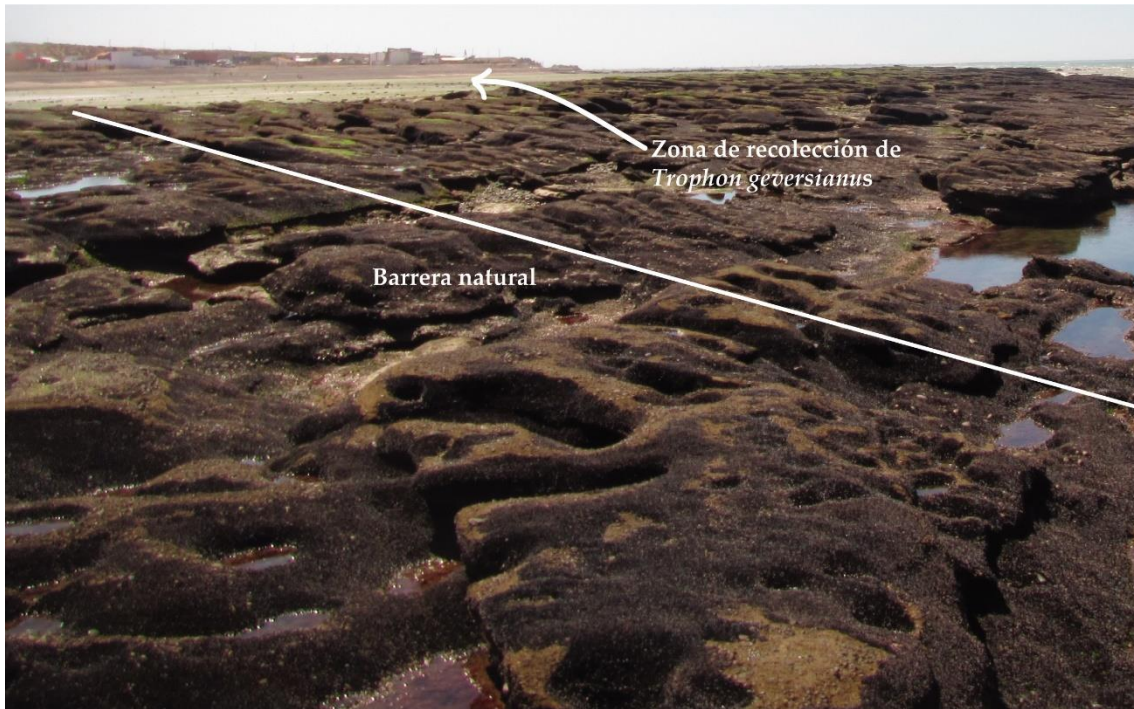


Figura 3.6: intermareal de Playa Cangrejales, localidad de RW, donde fueron recolectados los ejemplares de *T. geversianus*. Detalle de la zona de recolección de ejemplares con una barrera natural antes del contacto con el mar.

---

– Capítulo 4

Adaptaciones de *Trophon geversianus*  
ante un escenario de calentamiento  
climático global

---

## 4.1 Introducción:

El sistema climático de la Tierra varía naturalmente en un rango de escalas temporales, que incluyen ciclos estacionales, patrones interanuales como el ENSO (El fenómeno de El Niño, Oscilación Sur), ciclos inter-decenales, como las oscilaciones de la década del Atlántico norte y la década del Pacífico, y cambios de escala multi milenaria como glaciario a inter glaciares (Harley *et al.* 2006). A partir del comienzo del período industrial, las actividades humanas se han convertido en un componente adicional importante para el sistema climático (IPCC 2001; Collins *et al.* 2013), donde el forzamiento climático antropogénico está mediado principalmente por las emisiones de gases de efecto invernadero (principalmente CO<sub>2</sub>) (Feely *et al.* 2004). Se espera que el aumento de CO<sub>2</sub> y los aumentos resultantes en la temperatura media global causen una cascada de cambios físicos y químicos en los sistemas marinos (Harley *et al.* 2006).

Los gases de efecto invernadero atmosféricos atrapan parte de la energía térmica que de otro modo se irradiaría al espacio, ayudando a calentar el planeta. Esta presión antropogénica tiene efectos ambientales en los ecosistemas. Por ejemplo, las temperaturas globales del aire y de la superficie del mar han aumentado en el último siglo en 0,4 a 0,8 °C (IPCC 2001). Esto también afecta directamente a los océanos, el incremento de temperatura derrite los casquetes polares expandiendo 2 mm su nivel cada año (IPCC 2001). Particularmente en los océanos del hemisferio sur el efecto del incremento de temperatura es el más severo, en los que se registró un incremento de 1 °C en los últimos 50 años (Meredith y King 2005) y se espera el doble en el próximo siglo (Murphy y Mitchell 1995). En un meta-estudio realizado con el fin de evaluar el efecto del calentamiento climático, se encontró que la sinergia entre el rápido aumento de la temperatura y las tensiones intrínsecas de cada hábitat podrían afectar la interacción entre las especies y dar lugar a cambios en las comunidades, incluso causando extinciones (Root *et al.* 2003).

La variabilidad natural intraespecífica es un reflejo de las adaptaciones evolutivas a los cambios ambientales (Van Valen 1965). La temperatura tiene efectos tanto morfológicos como fisiológicos en organismos ectotermos. Fisiológicamente, puede

causar desde deterioro proteico hasta cambios en la fluidez de la membrana y mal funcionamiento de los órganos (Hochachka y Somero 2002). La síntesis de chaperones moleculares, como las proteínas de choque térmico Hsp70, se ve incrementada en respuesta a situaciones de estrés, por lo tanto, se consideran un indicador fiable del estrés térmico (Coronato *et al.* 1999; Tomanek y Somero 2000; Hochachka y Somero 2002; Somero 2002; Tomanek y Sanford 2003; Tomanek y Zuzow 2010). Se comprobó que, tras un shock térmico, proteínas Hsp70 se acumulan en el interior del nucléolo, confiriendo protección al centrosoma y filamentos intermedios (Liang y MacRae 1997). Como chaperonas moleculares, las Hsp protegen a las proteínas de la desnaturalización y facilitan su correcto plegamiento en conformaciones nativas o, en el caso de proteínas irreversiblemente dañadas, su eliminación de la célula a través de la proteólisis (Sherman y Goldberg 1996; Parsell y Lindquist 1993).

Por otro lado, las modificaciones antropogénicas generadas sobre la temperatura demandan respuestas plásticas en las comunidades (Pigliucci 2001; Melatunan *et al.* 2013). La temperatura es una variable ambiental clave en los procesos de biomineralización y crecimiento en las conchas calcáreas (Gazeau *et al.* 2013). Dado que la concha es la estructura anatómica que protege a la mayoría de los moluscos contra el oleaje, los depredadores, la desecación o sobrecalentamiento, su modificación tiene grandes consecuencias en los organismos (Melatunan *et al.* 2013). Por ejemplo, Olson y colaboradores (2012) demostraron que la temperatura puede alterar la microestructura de la concha, cambiando el ángulo y el grosor de las capas de aragonita. A su vez, Almada-Villela y colaboradores (1982) encontraron una relación entre los incrementos en el crecimiento de la concha en función de la temperatura en bivalvos, pero también una disminución en su dureza haciéndolos más vulnerables a la presión de depredación (Mackenzie *et al.* 2014). Cualquier modificación en la estructura calcárea de los invertebrados puede alterar su estrategia de recluirse herméticamente en sus conchas para sobrevivir a los períodos de emersión (Pöhlmann *et al.* 2011). Por lo tanto, los efectos en los cambios de temperatura predichos por el IPCC (IPCC 2001; Collins *et al.* 2013) para el 2100

pueden tener profundos efectos en la supervivencia de los organismos intermareales en general y de los moluscos en particular.

## 4.2 Objetivo:

Evaluar experimentalmente las respuestas morfométricas y fisiológicas en embriones y adultos de *Trochon geversianus*, respectivamente, expuestas a condiciones ambientales que simulen un escenario de calentamiento climático global.

## 4.3 Hipótesis:

El ambiente determina la morfología y la respuesta fisiológica de los organismos, por lo tanto, organismos que se desarrollen en ambientes diferentes responden de manera diferencial.

## 4.4 Predicción:

Los embriones que se expongan a mayores temperaturas cambiarán su forma de la concha. Los adultos que se expongan a mayores temperaturas presentarán mayores niveles de proteínas Hsp70.

## 4.5 Materiales y métodos:

### 4.5.1 Respuestas fisiológicas:

Para evaluar el efecto fisiológico de los organismos bajo un escenario de cambio climático global, se realizó un único muestreo en el mes de mayo de 2018. El área de recolección seleccionada fue el intermareal y submareal somero de playa Ambrossetti (Figura 1). Se recolectaron al azar 50 individuos de cada nivel (IN-SUB N=100) y se los mantuvo en peceras individuales durante dos semanas, alimentados con mejillines (*Perumytilus purpuratus*), en el caso de los individuos del intermareal y con mejillones (*Mytilus edulis*), en el caso de organismos del submareal. Las peceras se mantuvieron en una cámara a 14 °C de manera constante, con fotoperíodo de 12 h de luz y 12 de oscuridad. A cada individuo se le cambió de manera total el agua cada tres días. Luego de dos semanas de aclimatación, con el fin de no sumar estrés durante el experimento, se le retiró la comida y se dejó de realizar los cambios de agua durante su desarrollo.

4.5.1.1 Diseño experimental: El experimento se realizó en una cámara de temperatura controlada, donde se dispuso a cada individuo en un frasco de 200 ml con un flujo de aire suave y continuo. Se utilizaron 25 individuos de cada nivel (IN-SUB) para los tratamientos de temperatura y 25 de cada nivel para el control. Cada tratamiento fue desarrollado en bateas de 30 L de agua, las mismas contaron con un calentador y un sensor de temperatura conectado al *display* común. Este sensor activó los calentadores para mantener una temperatura homogénea y equivalente a la predeterminada, a su vez la cámara contó con un forzador de temperatura que la mantuvo a 14 °C. Los frascos, con los individuos dentro permanecieron inmersos en el agua calentada en la batea común. Se tuvo la precaución de que el nivel del baño permaneciera constante, agregando cuando fuera necesario agua con la misma temperatura del tratamiento (Figura 4.1). Para determinar la temperatura superior, se tomó el valor promedio del agua para la estación de verano 18 °C (obtenida de los valores tomados por los registradores de temperatura ubicados en Punta Loma, ver Capítulo 1) y se le incremento 4 °C en función a lo estimado por el IPCC para el 2100 en el mar (Collins *et al.* 2013). Dando una temperatura superior de 22°C. Se utilizó como temperatura control 14 °C y se fue incrementando de a 2 °C por día hasta llegar a la temperatura superior, 22 °C. Cada incremento de temperatura fue mantenido por un día completo. Al cumplirse las 24 horas se tomaron 5 individuos de cada tratamiento inter y submareal. Cada uno de ellos fue retirado y diseccionado, separando el pie de la gónada sobre una cama de hielo y posteriormente almacenado en un ultrafreezer a -80 °C. Al finalizar el quinto día se extrajeron los individuos del tratamiento control y se los procesó de igual modo. Al concluir los 5 días del experimento se realizó la determinación de las proteínas por Western blot. La extracción y cuantificación de proteínas totales, junto con los ensayos de Western blot para evaluar expresión de Hsp70, se describió previamente en el Capítulo 3.

4.5.1.2 Análisis estadísticos El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5 (CA, EE.UU.). Se analizó la cuantificación densitométrica de Hsp70 con una prueba de ANOVA de una vía y a posteriori con un test de comparaciones múltiples de Tukey. En cada caso se evaluó la diferencia de medias

de cada temperatura versus el control. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$ .

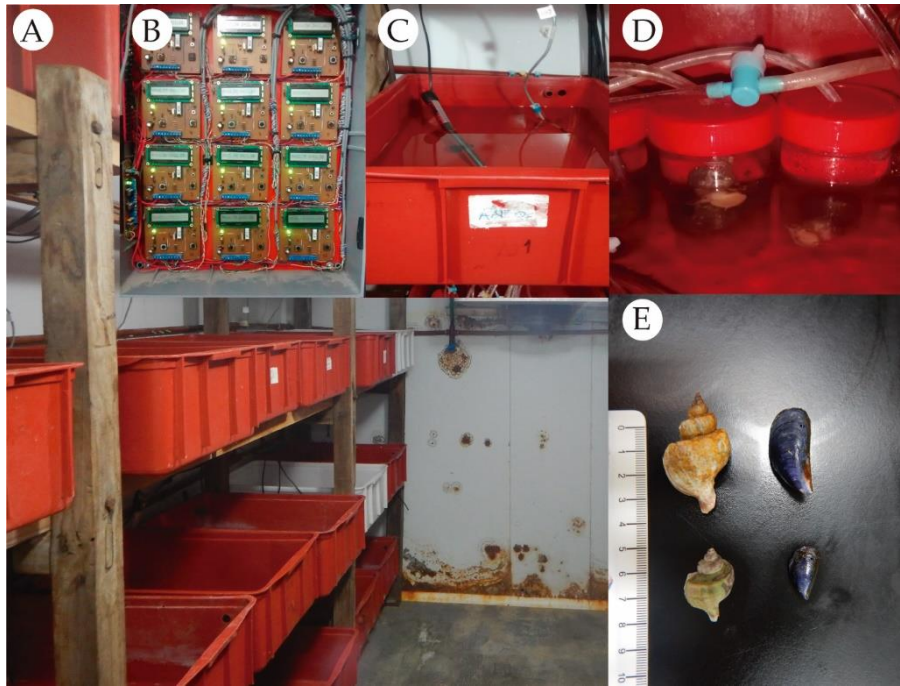


Figura 4.1: A- Detalle de la cámara de temperatura controlada con las filas de bateas. B- Controladores independientes de temperatura conectados a un sensor y un calentador. C-Bateas con calentador y sensor asociados. D- Frascos individuales con aire, regulado para que sea homogéneo. E- Detalle de individuos del submareal y su alimento, mejillón (superior) e intermareal, mejillín (inferior).

#### 4.5.2 Cambios morfométricos:

Para estudiar el efecto de la temperatura en la forma de la concha de *T. geversianus* bajo un escenario de cambio climático global, se realizó un único muestreo en el mes de septiembre del 2018. El área de recolección seleccionada fue el submareal somero de playa Paraná, sobre el naufragio del Folías (Figura 4.2). Mediante buceo autónomo se recolectaron manualmente 150 ovicápsulas recién puestas, asegurando que los individuos encapsulados estuvieran en estado de huevo (Rochette *et al.* 2007). Las cápsulas fueron trasladadas al laboratorio y separadas en función de su grado de madurez, utilizando trabajos previos de la especie (Cumplido 2008; Cumplido *et al.* 2010). Se encontraron tres estadios, uno inicial donde el contenido de las cápsulas se encontró condensado (ver Figura 18 B Cumplido 2008, Anexo), uno intermedio donde la masa se encontró condensada en pequeños huevos (ver

Figura 18 C Cumplido 2008, Anexo) y uno avanzado donde los huevos comenzaban a dividirse y ser irregulares. Posteriormente, las capsulas fueron trasladadas a una cámara de temperatura controlada donde se colocaron individualmente dentro de *cassettes* histológicos en frascos de 200 ml. Finalmente, con el objetivo de asegurar un buen estado de las mismas, fueron mantenidas durante dos semanas a 13 °C antes de asignarlas al tratamiento de temperatura.



Figura 4.2: Sitio de recolección de ovicápsulas, naufragio Folías ubicado en Playa Paraná (42°47'44"S; 64°56'47"O). Detalle de las zonas de recolección de ovicápsulas en tres puntos (las flechas y los puntos del mismo color hacen referencia a la misma zona).

4.5.2.1 Diseño experimental: Pasado el tiempo de aclimatación de 14 días, las 150 ovicápsulas fueron sometidas a tres temperaturas distintas (un control y dos niveles del tratamiento) el día 13/10/2018. La asignación de las ovicápsulas a los tratamientos fue aleatoria, pero se cuidó de tener cada uno de los estadios de madurez presentes en todos los tratamientos. Cada ovicápsula fue colocada dentro de un *cassette* histológico correctamente rotulado. La temperatura control se determinó como el promedio anual de temperatura del Golfo Nuevo: 13 °C (TC) (obtenida de los registros de temperatura ubicados en Punta Loma, ver Capítulo 1), el tratamiento 1 (T1) representó la media de verano de 18 °C y el tratamiento 2 (T2) la temperatura media del verano sumado el incremento esperado de 4 °C para

el año 2100 (Collins *et al.* 2013). Cada tratamiento fue desarrollado en bateas de 30 L de agua, ubicadas una en la fila alta y la otra en la baja de la sala (mismo sistema descrito previamente en la determinación de las respuestas fisiológicas), en cada batea se colocaron 25 frascos. Los frascos individuales con cada una de los *cassettes* de histología y su ovicápsula, permanecieron inmersos en el baño de agua con un flujo de aire suave (aproximadamente una burbuja por segundo) y continuó hasta la eclosión de los juveniles (Figura 4.3). Cada dos días se registró el pH, salinidad, oxígeno disuelto y temperatura de cada tratamiento para mantener un control del estado del agua. Semanalmente, se procedió al cambio total del agua de cada uno de los frascos y la limpieza de las ovicápsulas de forma manual con un pincel. En cada día de limpieza de las ovicápsulas se registraron los estados de las mismas, las que no mostraron división de la masa inicial de vitelo, presentaron una coloración diferente y en algunos casos manchas, se marcaron como inviables. Al finalizar el experimento se abrieron y se constató su estado.



Figura 4.3: Batea de la cámara de temperatura controlada con frascos de uno de los tratamientos, detalle de ovicápsula dentro de uno de los *cassettes* para histología.

Una vez que empezaron a eclosionar los juveniles, se trasladaron diariamente las ovicápsulas al laboratorio para ser evaluadas bajo lupa. En el caso de detectarse la apertura de la ovicápsula, se contabilizó el número de embriones viables e inviables



#### Capítulo 4: Escenario de calentamiento climático global

Por último, de cada tratamiento se fue registrando el número de ovicápsulas que se veían deterioradas y se contabilizaron el número de ovicápsulas vivas y muertas al final del experimento (12/1/2019). A su vez, de cada ovicápsula se registró el número total de embriones viables e inviables por tratamiento.

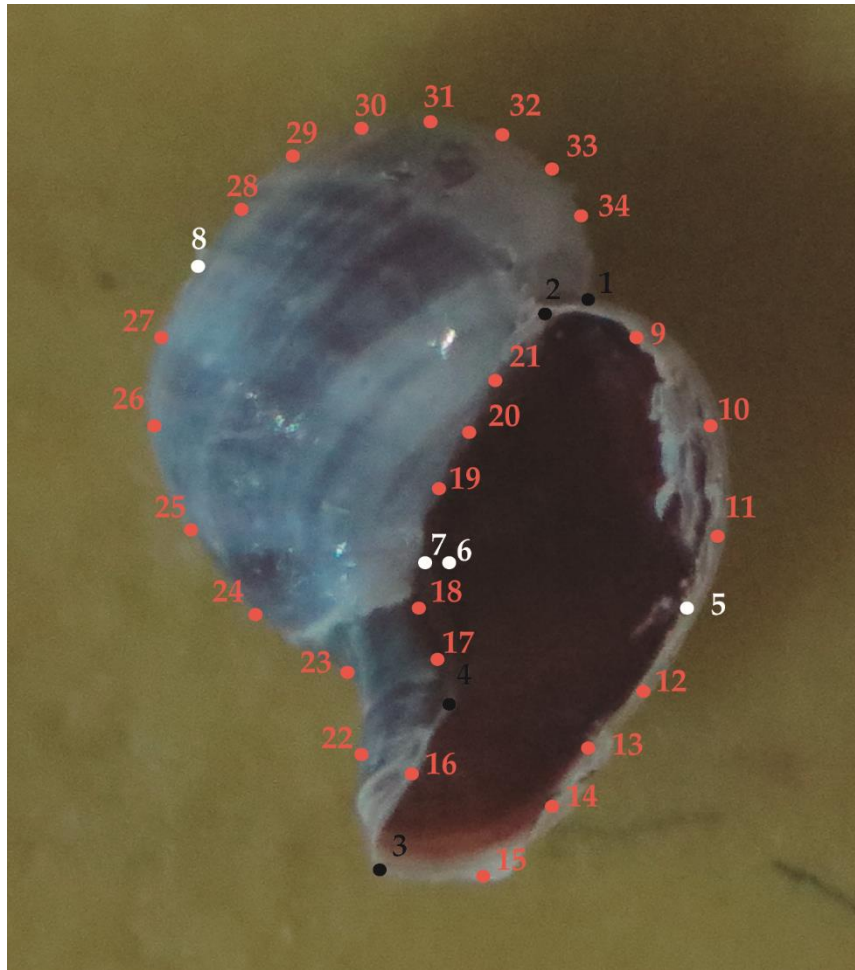


Figura 4.5: Configuración de *landmarks* (LM): en negro los de tipo 1, en blanco los de tipo 2 y en rosa los *semilandmarks*: 1- comienzo de la primera vuelta sobre el borde derecho, 2- unión de la sutura de la apertura con la primer vuelta, 3- máxima depresión del labio del sifón, 4- máxima protuberancia sobre el canal sifonal, 5- parte más externa del labio externo, 6- máxima concavidad interna de la apertura el plano x, y 7- máxima concavidad externa sobre la apertura, 8- máxima curvatura superior de la primera vuelta paralelo al LM 5, 9-11- *semilandmarks* deslizados entre LM 4 y 5, 12-15- *semilandmarks* deslizados entre LM 5 y 3, 16- *semilandmark* deslizado entre LM 3 y 4, 17-18- *semilandmarks* deslizados entre LM 4 y 7, 19-21- *semilandmarks* deslizados entre LM 7 y 2, 22-27- *semilandmarks* deslizados entre LM 3 y 8, 28-34- *semilandmarks* deslizados entre LM 8 y 1.

4.5.2.2 Análisis estadísticos: Se analizó el historial de las temperaturas registradas en cada una de las bateas cada una hora, mediante un diagrama de dispersión en el programa computacional InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011). Posteriormente, se estudió la alometría de la muestra mediante una regresión multivariada de los componentes de forma de la concha (coordenadas alineadas de Procrustes) y el *centroid size* (CS) como un estimador insesgado del tamaño (Bookstein *et al.* 1999; Monteiro 1999). Con el objeto de estudiar si existía efecto de la batea sobre la forma de la concha,

se puso a prueba la igualdad de medias de formas entre bateas dentro de cada uno de los tratamientos a través de una prueba de T cuadrado de Hotelling. Se realizó un análisis de componentes principales para estudiar el morfoespacio (magnitud y la dirección del cambio de forma) que ocupan los individuos. Se realizó un análisis discriminante con el objetivo de determinar los componentes de forma que maximizan las diferencias entre la forma media del TC vs T1. Se evaluó tal diferencia desde el punto de vista estadística mediante una prueba de T cuadrado de Hotelling. La confiabilidad en la discriminación se evaluó mediante una prueba de validación cruzada. Con el objeto de estudiar las variaciones en tamaño (CS) entre los tratamientos se realizó un gráfico de cajas (Rohlf y Slice 1990; Slice *et al.* 1996a). Para evaluar la diferencia de medias entre los CS de los tratamientos, se realizó una comparación de medias con una prueba de análisis de la varianza con el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.* 2011). Los análisis morfométricos se realizaron con el software MorphoJ versión 01.06d (Klingenberg 2008).

### 4.6 Resultados:

#### 4.6.1 Respuestas fisiológicas:

Como resultado del estudio de las respuestas fisiológicas, se registró que la expresión de Hsp70 en gónada de *Trophon geversianus* proveniente del intermareal y submareal se incrementó significativamente (ANOVA,  $F_{4,49}=8,031$ ,  $p<0,0001$ ; ANOVA,  $F_{4,49}=13,19$ ,  $p<0,0001$  respectivamente). En los organismos del intermareal, la expresión de Hsp70 en gónadas aumentó significativamente a partir de los 18 °C en comparación a la temperatura control (14 °C; Figura 4.6 superior). En contraste, las gónadas de los organismos del submareal solo presentaron un incremento significativo en la expresión de Hsp70 entre 16 °C y la temperatura control (Figura 4.6 inferior).

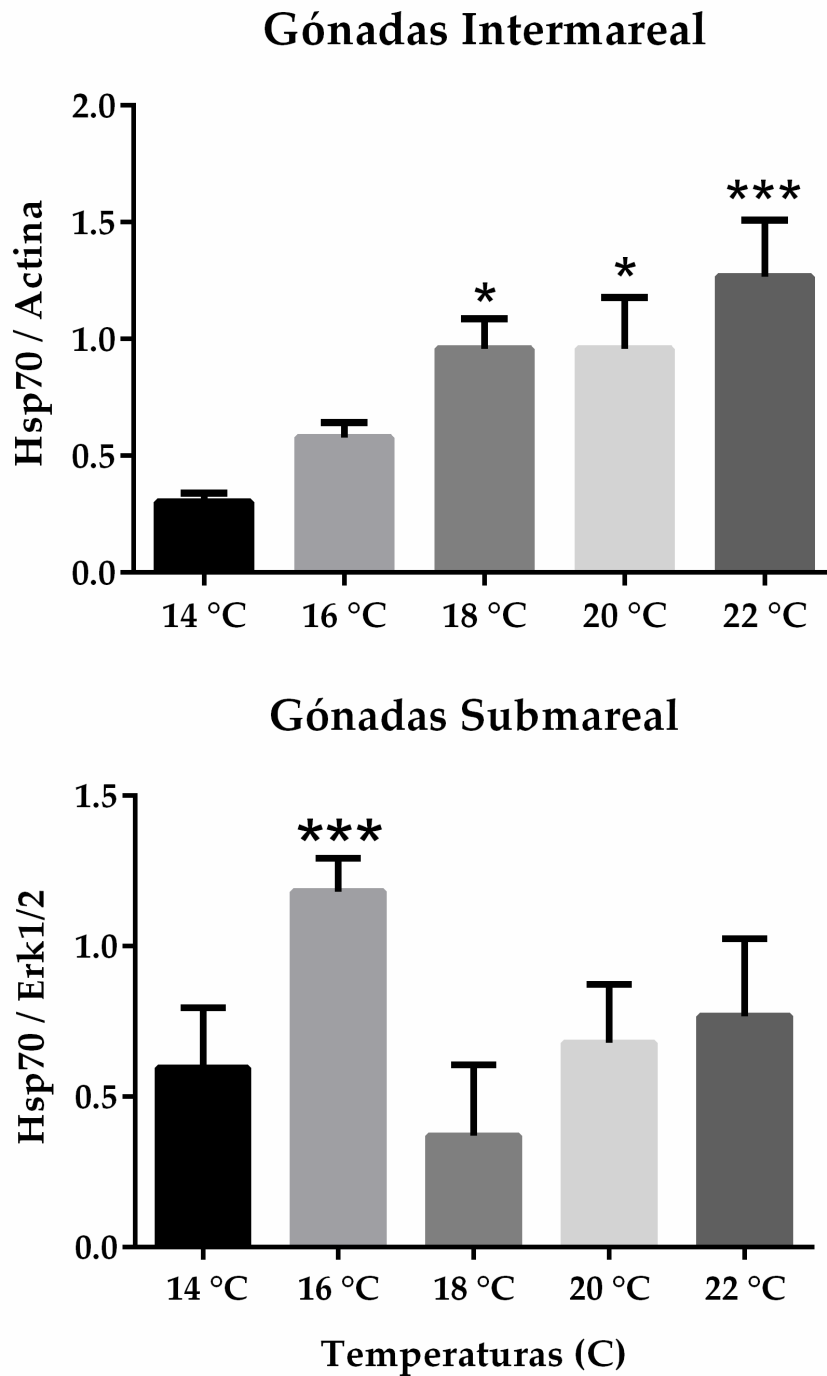


Figura 4.6: Niveles de expresión Hsp70 en gónada de *Trophon geversianus* sobre muestras extraídas diariamente de la sala de temperatura controlada, del intermareal (arriba) y submareal (abajo). Los gráficos resumen la expresión de Hsp70, en función de lo expresión de Actina (sc-47778) o Erk1/2 (control de carga) en 5 muestras independientes (media±DS). El asterisco indica diferencias significativas en el nivel de expresión, de cada temperatura vs el control (ANOVA una vía, Tukey \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Se muestran gráficos que resumen los resultados obtenidos por Western blot. 14 °C: temperatura control del agua.

4.6.2 Cambios morfométricos:

Durante el desarrollo del experimento del análisis de la forma, se presentó un inconveniente en el mantenimiento de la temperatura de la cámara. Se registraron valores erráticos en las bateas del tratamiento de 18 °C y 22 °C, ubicados en la fila baja de la cámara de temperaturas (Tabla 4.1). Por lo que se decidió agregar registradores de temperatura en las bateas de la fila superior, con el objeto de poder comparar si ambas variaban y alguna de ellas tenía mal el sensor de temperatura (Figura 4.8).

Los registradores tomaron la temperatura por hora a lo largo del experimento en cada una de las bateas dando un total 2175 registros, algunos fueron guardados de manera erróneas por lo que no fueron tenidos en cuenta (Tabla 4.1). El TC, a diferencia de T1 y T2, tuvo sus dos bateas (con las 25 réplicas en cada una) en la misma fila y dado que no se registraron fluctuaciones muy abruptas durante el seguimiento diario de la temperatura, solo se utilizó un registrador para conocer el historial de temperatura de ese tratamiento.

Tabla 4.1: Registros de temperatura e individuos digitalizados por tratamiento. Abreviaciones: Trat: tratamiento, In. Di.: número total de individuos digitalizados.

Trat.	Bateas	Variable	n	Media	D.E.	Mín.	Máx.	In. Di.
T 13°C	Abajo	T °C	2175	13,51	0,22	12,81	14,06	134
T 18°C	Abajo	T °C	2175	18,61	1,24	14,31	21,72	49
T 18°C	Arriba	T °C	1535	17,87	0,40	15,00	18,75	57
T 22°C	Abajo	T °C	2175	22,85	1,54	16,31	25,56	0
T 22°C	Arriba	T °C	1534	21,69	0,73	14,79	22,75	21

De las 50 ovicápsulas colocadas en cada tratamiento se encontraron diferencias en la tasa de supervivencia (Figura 4.7). Del TC fueron viables 47 ovicápsulas, del T1 37 ovicápsulas, de las cuales 19 fueron de la fila superior y 18 de la inferior y del T2 11 todas de la fila superior. De cada una se tomaron 3 ejemplares para digitalizar, (en el caso de que tuvieran menos cantidad se digitalizaron todos los viables). En el caso del T2 los reclutas no fueron tenidos en cuenta para el análisis de forma. Dado que luego de los 90 días de experimento, luego de haber registrado la última eclosión del T1, no se registraron reclutas eclosionando de las ovicápsulas del T2 y

se dio por finalizado el experimento. Para evaluar si había algún embrión vivo se trasladaron las ovicápsulas al laboratorio y se abrieron.

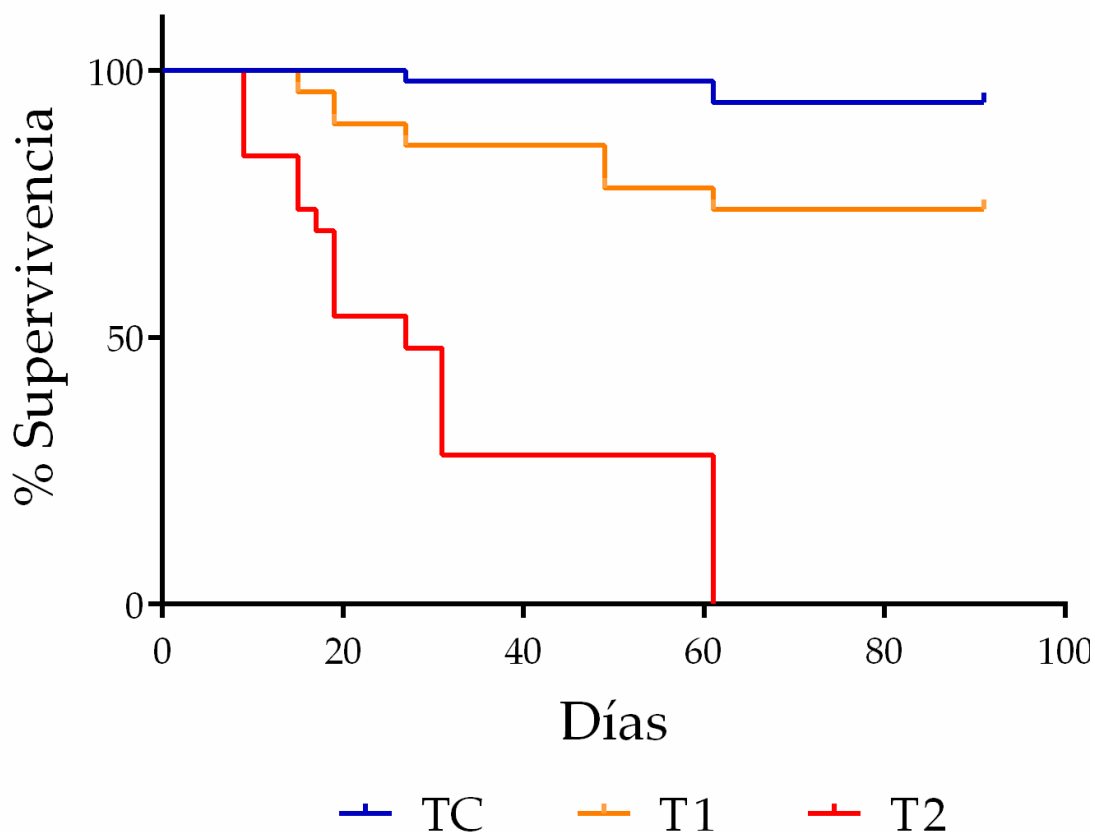


Figura 4.7: Porcentaje de supervivencia en los tres tratamientos a lo largo del experimento

Los tiempos de eclosión no fueron diferentes entre TC y T1 (ANOVA,  $F_{1,83}=0,01$ ,  $p=0,92$ ), el experimento se finalizó cuando se cumplieron los 90 días en los que las ovicápsulas permanecieron en el tratamiento. La primer ovicápsula que eclosionó fue del T1 a los 71 días de haber comenzado el experimento y las últimas a los 90 del TC y T1. El número de embriones por cápsula fue muy variante en cada caso, registrando un máximo de 35 en el T1 (Tabla 4.2). Aunque la cantidad de embriones vivos respecto al total fue menor en el T1, la supervivencia no fue significativamente diferente (ANOVA,  $F_{1,83}=0,01$ ,  $p=0,94$ ).

## Capítulo 4: Escenario de calentamiento climático global

Tabla 4.2: Media de embriones totales en los TC y T1, los máximos y mínimos encontrados en cada ovicápsula y las medias de tiempo de estadía de las ovicápsulas en cada tratamiento antes de la eclosión.

<b>Trat.</b>	<b>Embriones totales</b>	<b>Máy.</b>	<b>Min.</b>	<b>Em. vivos</b>	<b>T. total</b>	<b>T. experimento</b>
TC	7,6±3,2	17	2	7,4±3,3	100,5±3,3,	86,3±3,3
T1	8,4±5,3	35	3	7,5±5,4	100,4±4,2	86,4±4,2

En el caso del TC (13 °C) la supervivencia fue del 95%, mientras que en el T1 (18 °C) fue de 75%. La menor de todas se registró en el T2 (22 °C), siendo del 50 % antes de los 25 días de haber comenzado el experimento y del 11 % al finalizar el experimento.

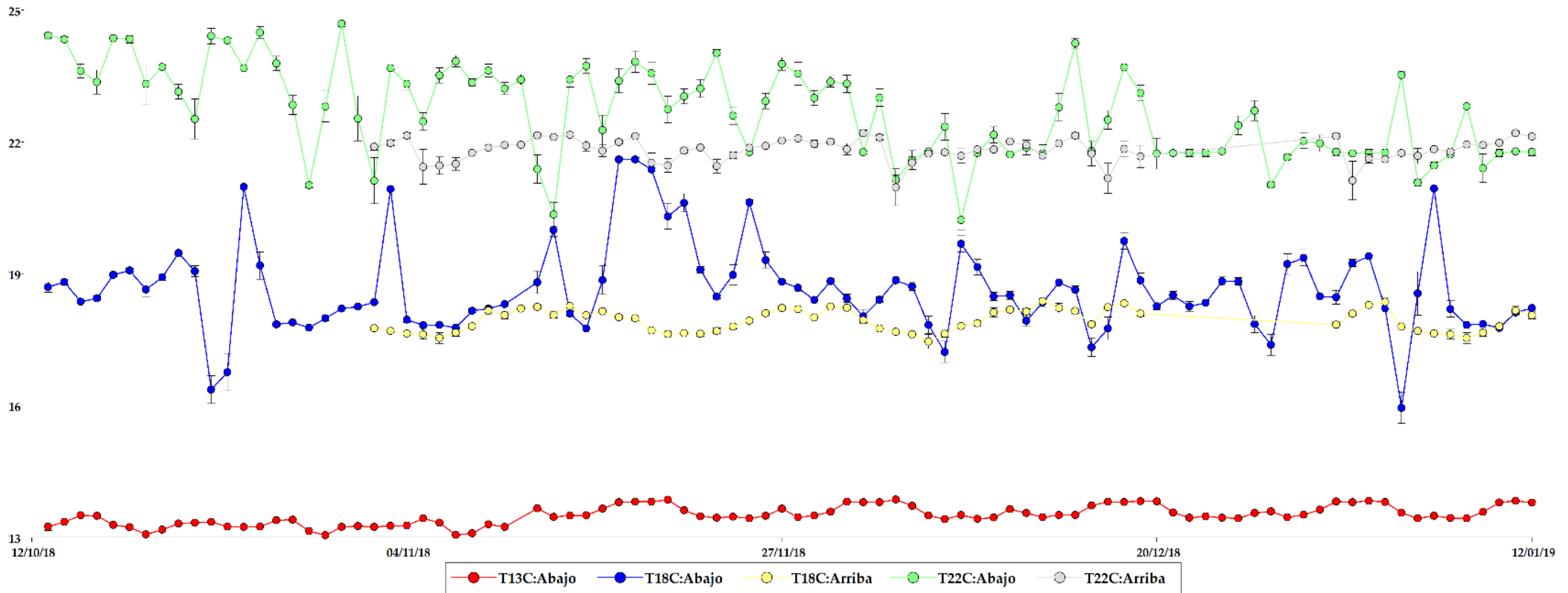


Figura 4.8: Diagrama de dispersión con medias diarias de temperaturas tomadas en cada uno de los tratamientos, las líneas sin registros corresponden a fallas en los dispositivos.

El análisis de independencia entre las bateas del T1, no indicó diferencias significativas entre la forma de la fila superior e inferior, independiente de las fluctuaciones de temperatura entre estas. Por lo tanto, en las comparaciones posteriores se trabajó con todos los registros de forma conjunta. Este análisis se realizó solamente para este tratamiento debido a que el TC se encontraba en el mismo nivel.

La prueba de regresión permutacional entre TC y T1, rechazó la independencia entre las coordenadas de Procrustes y los valores de CS ( $p < 0.0001$ ) y explicó un bajo porcentaje de asociación entre forma y tamaño (4,48 %). En los posteriores análisis estadísticos se utilizaron los residuales de dicha regresión como nuevas variables de forma libres de alometría. Las distancias de Procrustes y Mahalanobis fueron significativamente diferentes entre TC y T1 (Tabla 4.3).

Tabla 4.3: Distancia de Procrustes (Dist. Pcs.) y Mahalanobis (Mah.) entre los tratamientos control (TC) y temperatura de 18 °C (T1). La significancia en la diferencia se indica con un asterisco, es el resultado de test T de Hotelling.

Trat.	Dist. Pcs.	Dist. Mah.
C-1	0,0171*	1,458

Analizando la variación en la forma a lo largo del componente principal 1 se observa que la variación más importante en la forma (CP1) se localiza en la apertura y en el contorno de la última vuelta (Figura 4.9). En el extremo negativo se encuentran los individuos que presentaron una proyección de la apertura y un retroceso en la zona del canal sifonal. En la zona superior se ve una proyección en el lateral derecho de la última vuelta y un retroceso de la zona superior, dando en su conjunto una forma general más globosa con una apertura expandida. En el extremo positivo se registró la tendencia opuesta, dejando como resultado una forma más fusiforme.

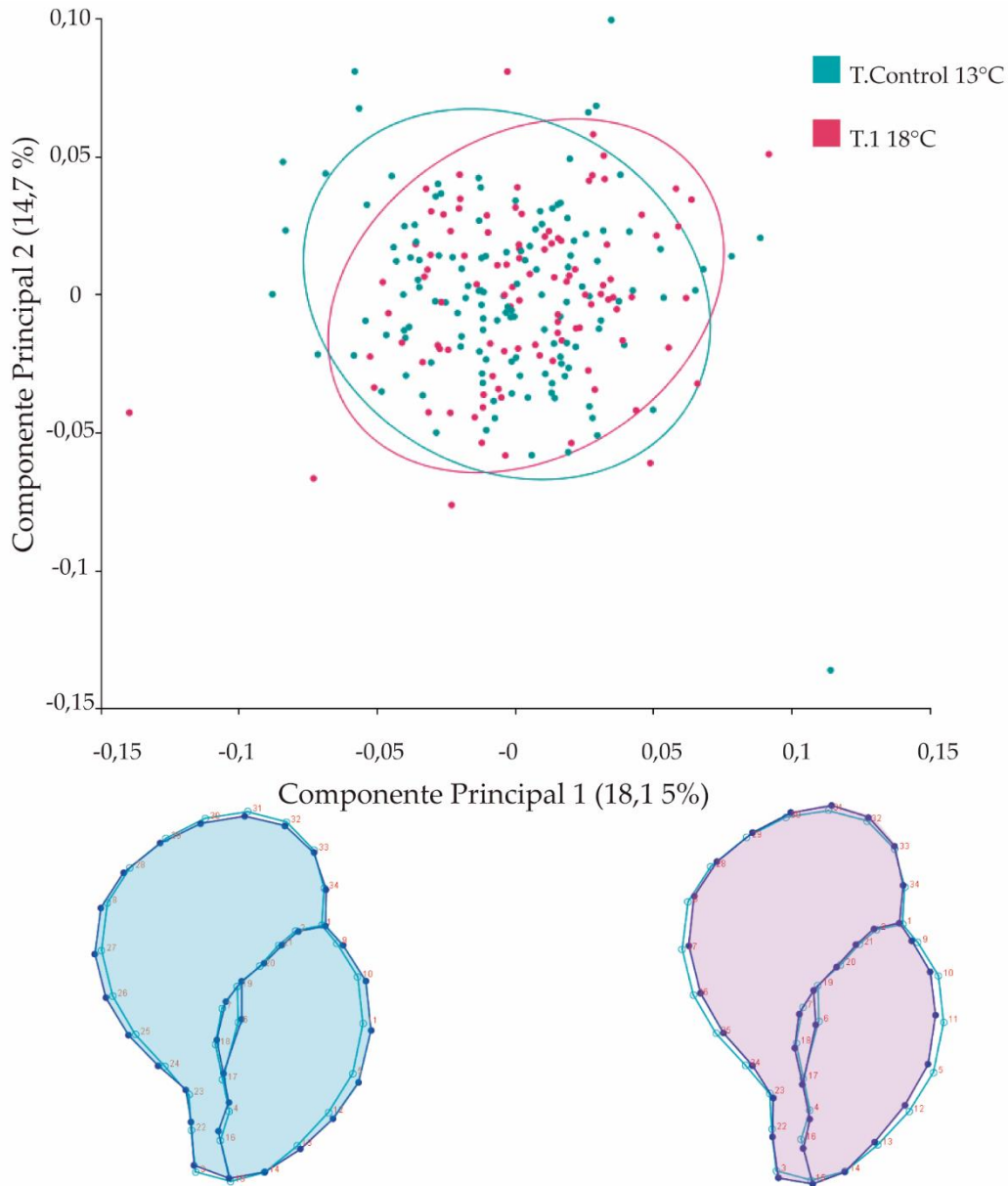


Figura 4.9: Grafico de dispersión entre los dos primeros componentes principales (CP1 vs CP2). Las elipses representan elipses el 90% de confianza alrededor de la forma media de los tratamientos. Entre paréntesis se encuentra el porcentaje de la variación explicada por cada eje. Los gráficos inferiores representan los extremos de variación con un factor de escala de -0,05 y 0,05 respectivamente. En ambos casos se muestra la deformación en color en comparación a la forma consenso líneas celestes.

El análisis discriminante entre la media de la forma del TC y T1 fue significativa (T cuadrado de Hotelling,  $p=0,036$ ). La función de validación cruzada indica que el número de errores de asignación de tratamientos es de 46 individuos del T1 al TC y 57 del TC al T1 (Figura 4.10). El aspecto general de los reclutas del T1 fue elongado, focalizando la variación en forma en el estrechamiento del contorno

opuesto a la apertura. En el caso de los reclutas del TC se encontró una forma más globosa y comprimida, donde la variación de la forma también se encontró focalizada en el lateral opuesto a la apertura.

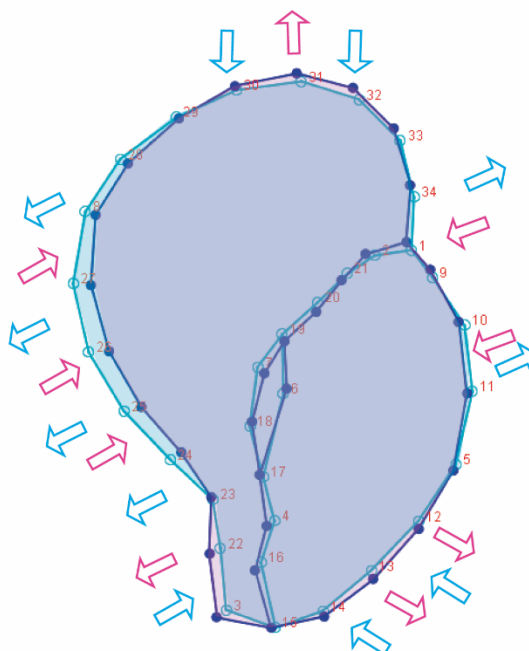
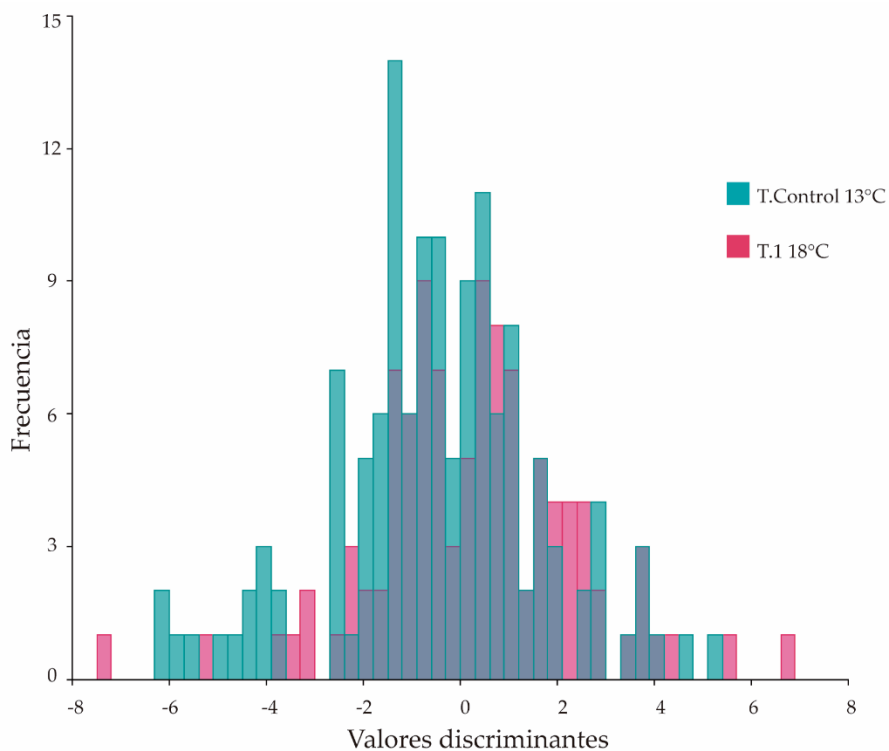


Figura 4.10: Frecuencias de los valores discriminantes predichos por la prueba de validación cruzada. La imagen debajo muestra la media de la forma de cada tratamiento, aumentando la variación tres veces. En celeste se ve la media de la forma del TC y en rosado la media del T1, las flechas indican la dirección de la variación.

En el análisis de tamaño (CS) no se encontraron diferencias significativas (ANOVA,  $F_{1,238}=10,3$ ,  $p=0,0015$ ) entre la media del TC (5,7 mm) y T1 (5,26 mm, Figura 4.11). En el T1 se observa un grupo de individuos de tamaños muy por debajo de la media (Figura 4.11).

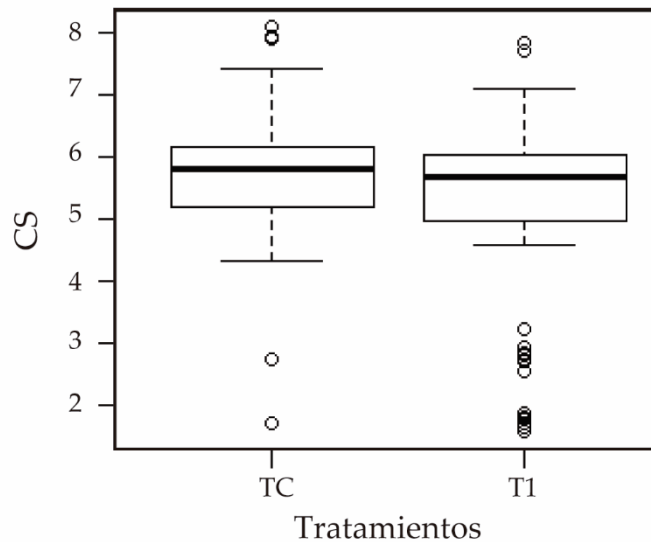


Figura 4.11: Gráfico de cajas de CS, las líneas negras representan las medias de cada tratamiento, las barras sus desvíos estándares.

#### 4.7 Discusión:

El análisis fisiológico mostró diferencias en la tasa de defensa térmica entre los ejemplares de *Trophon geversianus* del inter y submareal frente a un escenario de calentamiento climático global. Los individuos del submareal mostraron una expresión de Hsp70 más elevada a temperaturas más bajas que los individuos del intermareal, pero no fue duradera en el tiempo a diferencia de la expresión del intermareal. Diferencias en las respuestas a la temperatura fueron previamente documentadas en congéneres de *Tegula*, determinando que las diferencias en las adaptaciones estarían prefijadas genéticamente (Tomanek y Somero 1999). En este trabajo se encontró una diferencia entre los géneros de *Tegula* en la temperatura denominada de “activación”, es decir una diferencia en la temperatura que activa la síntesis de proteínas Hsp. Los congéneres de *Tegula* del submareal mostraron una temperatura de activación más alta que la de aquellas especies que habitaron el intermareal. Sin embargo, estos últimos no mostraron un incremento

significativo en su síntesis conforme aumentó la temperatura, contrario a los congéneres del submareal. Estos resultados son opuestos a los descritos en el presente trabajo, donde la respuesta más rápida fue dada por los ejemplares del submareal, la cual no fue significativamente mayor conforme aumentó la temperatura. Mientras que, en los ejemplares del intermareal, la respuesta a cambios en la temperatura del agua medida como incremento en la expresión de Hsp70, comenzó a temperaturas más elevadas con un incremento significativo de síntesis.

Esta discrepancia podría estar relacionada con el tiempo de adaptación de los ejemplares del inter y submareal al período de 24 horas en cada incremento de temperatura de nuestro trabajo. Dado que, en experimentos de exposición directa a 30 °C, con diferentes tiempos de recuperación en *Tegula*, se encontró que los ejemplares de intermareal respondieron sintetizando Hsp inmediatamente, a diferencia de sus congéneres del submareal (Tomanek y Somero 2000). También puede ser que el mayor nivel de expresión de Hsp en los ejemplares del intermareal en nuestro trabajo, este relacionado con una adaptación más elevada a condiciones de estrés térmico. Como se describió en la comparación entre 4 lapas del género *Lottia*, dos especies del intermareal alto y dos del bajo que solo quedan expuestas en mareas bajas extraordinarias. Se demostró que aquella que estaba mayor cantidad de horas expuesta a la desecación fue la que mayor expresión de Hsp70 presentó como mecanismo de adaptación (Dong *et al.* 2008). Estas experiencias indicarían que la respuesta térmica dependería de la información genética, la temperatura de exposición y el tiempo de recuperación frente a un estímulo particular. Observando entonces nuestros resultados, los organismos del submareal mostraron una temperatura de “activación” a los 16 °C, mientras que la del intermareal fue dos grados más elevada. Permitiéndonos inferir que, ya que los individuos del intermareal tendrían una temperatura que activa su defensa térmica más elevada que sus conespecíficos del submareal, frente a un incremento de temperatura su respuesta comenzaría más tarde, pero perduraría en el tiempo; resultando así en una defensa térmica más efectiva.

Sin embargo, como se mencionó en el Capítulo 3, los límites de tolerancia térmica juegan un papel muy importante en la vulnerabilidad al calentamiento climático. Los organismos que habitan en sus límites de tolerancia no se encuentran con la capacidad de responder frente a un incremento mayor de temperatura (Stillman 2003; Somero 2010). En un estudio realizado en 4 congéneres del cangrejo *Petrolisthes*, se demostró que aquellos que habitan zonas de mayor temperatura tienen una plasticidad menor a los incrementos de temperatura. Por lo tanto, su tasa de mortalidad fue mayor a la de aquellos que no viven en sus límites de tolerancia térmica, proponiendo así que serán las especies más vulnerables (Stillman 2003). Dado que la defensa térmica es una herramienta costosa energéticamente (Feder *et al.* 1992; Krebs y Loeschcke 1994; Tomanek y Somero 1999) para sobrevivir, generalmente las especies disminuyen su *fitness* e incluso sus tamaños. Por ejemplo, en el género *Nacella* se comparó la síntesis de Hsp y enzimas de estrés oxidativo, anti ROS, como defensa en dos poblaciones con distintos niveles de estrés térmico. Se demostró que aquellas sometidas a mayor presión de estrés registraron menores tamaños, debido a la necesidad de invertir energía en la defensa (Pöhlmann *et al.* 2011).

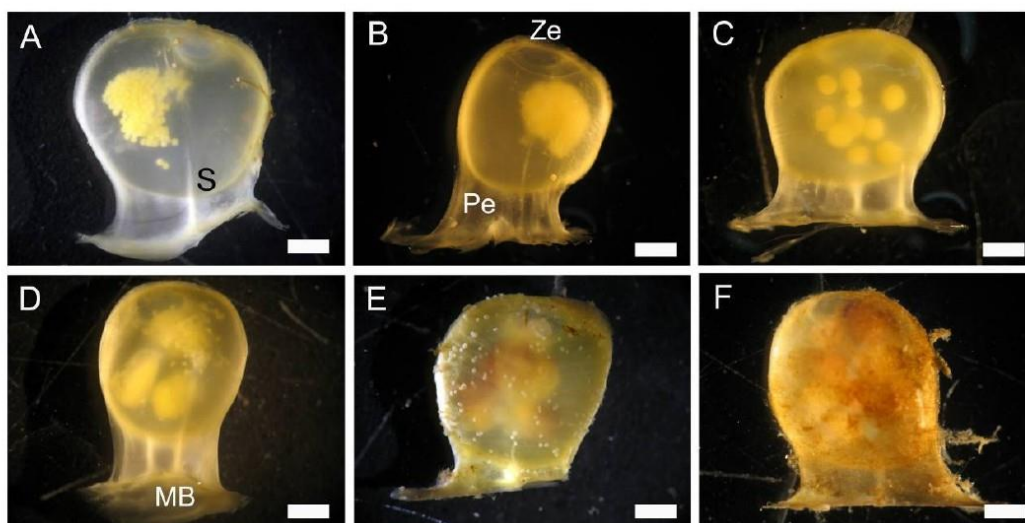
Frente a los resultados obtenidos en la experimentación con reclutas, se podría inferir que temperaturas mayores a los 18 °C son un límite de tolerancia térmica para el desarrollo de los embriones. La tasa de mortalidad a los 22 °C, 4 °C más que la media de verano, durante una exposición prolongada de 90 días fue aproximadamente del 100%. En experimentos de tolerancia a escenarios de calentamiento climático global realizados en huevos de los caracoles *Bembicium nanum*, *Siphonaria denticulata* y *Dolabrifera brazieri*, se demostró que el incremento de temperatura y salinidad fueron factores que incrementaron la tasa de mortalidad (Deschaseaux *et al.* 2010). Sin embargo, no se encontró un patrón de mortalidad ya que los autores la describieron como especie específica (ver Tabla 1 en Deschaseaux *et al.* 2010). También, en experimentos con capsulas del gasterópodo *Thais haemastoma canaliculata* se demostró que, frente a un incremento de temperatura, el consumo de oxígeno de las larvas disminuye significativamente (Roller y Stickle 1989). Posiblemente relacionado a una

disminución en su disponibilidad intracapsular. En cuanto a *T. geversianus* los resultados de este capítulo sugieren que por encima de los 18 °C se encontraría el límite de tolerancia térmica en el desarrollo de esta especie. Futuros experimentos, incorporando temperaturas en los extremos e intermedias entre 18 °C y 22 °C, nos permitirán conocer la temperatura letal media para embriones de esta especie. Incluso, para poder inferir la causa de la misma, por ejemplo, si el factor determinante es el oxígeno disponible dentro de cada cápsula, se debería sumar esa variable al diseño experimental. Por otro lado, la variación en tamaño por efecto del estrés térmico que se registró en el presente trabajo no fue significativa. El tamaño de la concha de los organismos que se expusieron a mayor temperatura fue levemente menor. Sin embargo, dado que los individuos de tamaños más pequeños tienen mayor tolerancia térmica que los más grandes (Stillman 2003), es esperable que en un experimento prolongado los reclutas de temperaturas mayores sean adultos de tallas menores. En contraposición al tamaño, la forma sí registró variaciones asociadas al incremento de temperatura. Los juveniles que se desarrollaron en un ambiente con temperatura más elevadas, presentaron formas fusiformes con conchas elongadas y aperturas estrechas, respecto a los juveniles de temperatura control. Este tipo de fenómeno fue descrito en capsulas de otra especie de murícido, *Acanthina monodon*, donde la presencia de depredadores, oleaje y su interacción mostraron que los juveniles varían su forma como respuesta, muy temprana en la ontogenia (Solas *et al.* 2015). En *Littorina littorea* se encontró que el factor de estrés más importante en los escenarios futuros es la temperatura. Su incremento alteró la forma de la apertura de la concha elongándola (Melatunan *et al.* 2013). Dado que las variaciones en la forma de la apertura de la concha pueden causar efectos en la pérdida de humedad por modificación del espacio del opérculo (Pöhlmann *et al.* 2011), *L. littorea* se categorizó como una especie vulnerable a los efectos del calentamiento climático (Melatunan *et al.* 2013). La pérdida de humedad demanda estrategias que alteran la forma de los caracoles de diversas maneras. Por ejemplo, en el gasterópodo *Thais lapillus* se demostró que los opérculos más grandes disminuyen la pérdida de humedad frente a exposición al aire, (Gibson 1970). En lapas *Patella sp.*, se describió que una disminución del tamaño de la base sería una estrategia para limitar la pérdida de humedad (Cabral

2007). Esto podría indicar que las formas más fusiformes en reclutas expuestas a una mayor temperatura encontradas en el presente trabajo, responderían a un intento por disminuir el área de la apertura y reducir el efecto de deshidratación.

Debido a que las proteínas de choque térmico se sintetizan para disminuir el daño causado por la temperatura y contribuyen con la renaturalización de proteínas (Parsell y Lindquist 1993), juegan un importante rol en la tolerancia térmica de cada individuo y por lo tanto en su supervivencia (Lindquist 1986 ; Schlesinger 1990). Es por eso que nuestros resultados sugieren que, frente a un incremento de 4 °C en la temperatura de los océanos previsto para el año 2100, los ejemplares de *T. geversianus* que habitan el intermareal tendrían menos daño celular que los que habitan en el submareal. Sin embargo, para poder determinar si esto podría traducirse en una supervivencia diferencial entre los individuos del inter y del submareal, se deberían realizar experimentos de tolerancia térmica para determinar si se encuentran cerca de sus límites de tolerancia (Stillman 2003). Por otro lado, demostramos que *T. geversianus* presenta plasticidad fenotípica en la etapa de juveniles frente a variaciones en la temperatura. Por lo tanto, en un escenario de calentamiento climático, se podría esperar una ausencia de formas más globosas y de aperturas más amplias.

## Anexo



**Figura 18.** Diferentes ovicápsulas a lo largo del desarrollo embrionario. (A-B), los huevos al inicio de la puesta y (C-F), embriones en su interior desarrollados. (E-F), se nota el “biofouling” en ovicápsulas muy desarrolladas. Escala de barras: 1 mm.

#### Capítulo 4: Escenario de calentamiento climático global

Imagen extraída de la tesis de licenciatura de Cumplido (2008). “Estacionalidad reproductiva y desarrollo embrionario del caracol *Trophon geversianus* en el intermareal de Punta Cuevas, Golfo Nuevo”.

---

–Discusión general

---

## Discusión general:

Este trabajo de tesis se centró en el estudio de las respuestas morfológicas y fisiológicas de dos especies de gasterópodos marinos que habitan diferentes zonas y niveles de las costas rocosas de Norpatagonia. Los ambientes en los que se encuentran están expuestos a distintos grados de estrés ambiental, a los cuales hacen frente para poder sobrevivir y desarrollarse. Se estudiaron las condiciones físicas de tres intermareales rocosos de la costa norpatagónica habitados tanto por *Trophon geversianus* como por *Tegula patagonica*. A lo largo de la costa estudiada se encontraron condiciones de estrés elevadas sobre las comunidades, cuya severidad fue determinada en gran medida por su topografía. En cada una de las localidades, se encontró una elevada presión de desecación por vientos predominantes del oeste y sudoeste a la que se le sumó el impacto del oleaje, el cual fue más elevado en función de la apertura de la costa al mar abierto. De las tres localidades, Bahía Camarones fue la que presentó condiciones de estrés intermedio de exposición e intensidad de olas. A su vez, dentro de esta localidad se observó un mayor número de especies sésiles, lo cual podría estar ejemplificando cómo los disturbios intermedios son un agente determinante en el modelado de las comunidades intermareales (Sousa 1979).

En el caso de *T. geversianus* en una micro escala (inter vs submareal) geográfica, se encontraron diferencias tanto en su morfología (ver Capítulo 2) como en su fisiología (ver Capítulo 3) en comparación a los ejemplares del submareal. Debido a que el tamaño corporal de los gasterópodos influye en el equilibrio térmico (Helmuth 1998), se relacionó la variación intraespecífica de las tallas con el grado de tolerancia a elevadas temperaturas. Las tallas de los ejemplares de cada nivel fueron diferentes, siendo las del intermareal menores que las del submareal, entendido como una estrategia para disminuir la exposición al sol y así el estrés térmico (Vermeij 1972). Además, la variación en la forma de las conchas de los ejemplares que habitan en los intermareales y submareales muestreados, indicaron una separación en dos ecofenotipos. Las formas dentro del intermareal se asociaron a mecanismos de mitigación de los efectos de la desecación durante las horas de exposición, descritos previamente en otras especies (Pöhlmann *et al.* 2011,

Melatunan *et al.* 2013, Livore *et. al.* 2018). Cuando se analizó la variación de la forma en una macroescala (a lo largo de un rango latitudinal), los ejemplares más cercanos geográficamente fueron los más similares entre sí. Esto fue asociado en principio a mecanismos de plasticidad fenotípica, aunque no se descarta la potencial adaptación en cada sitio, como fuera detallado en murícidos de la costa patagónica chilena (Sepúlveda e Ibáñez 2012). A su vez, analizando la respuesta fisiológica a la variación de la temperatura, también se encontraron diferencias entre los organismos del inter- y submareal. Los individuos del intermareal presentaron un nivel elevado de proteínas Hsp70, en cada sitio muestreado, independientemente de la estación, en contraste a los ejemplares del submareal. Cuando se comparó la expresión de dicha proteína en una macroescala, la diferencia dependió de la estación. Por lo tanto, el nivel donde habitan sería el factor geográfico que evidencia una diferencia en la respuesta fisiológica entre los distintos sitios. En conclusión, tanto las variaciones morfométricas como las respuestas fisiológicas, se mantienen entre los ejemplares de cada nivel latitudinalmente y a lo largo del año. Esto plantea una serie de interrogantes: ¿Cuál es el mecanismo evolutivo que está detrás del comienzo de una divergencia poblacional en *T. geversianus*?, ¿Cómo son genéticamente los individuos de *T. geversianus* que habitan distintos niveles de las costas rocosas de la Patagonia, desde una perspectiva poblacional?, ¿Cómo es la conectividad y por lo tanto el flujo de genes entre los sitios de las especies estudiadas?, ¿Cuál es el tiempo de separación entre los ecofenotipos de *T. geversianus*?

El gasterópodo *T. patagonica* no presentó variación en la forma frente a un estrés diferencial entre los niveles, así como tampoco diferencias latitudinales (ver Capítulo 2). Al encontrarse distribuida en el intermareal bajo y el submareal, la ausencia de diferenciación entre los niveles puede estar relacionada con el origen de los individuos. A diferencia de *T. geversianus* esta especie se reproduce indirectamente mediante larvas y con fecundación externa, por lo que es posible pensar que existe mayor flujo de genes entre ejemplares de los distintos niveles. Desde el punto de vista de la densidad, se sabe que en el nivel submareal somero (menor a 5 m) se encuentran las mayores densidades y por el tipo de alimentación, sobre macroalgas, son factibles de producirse arribazones cuando estas algas son

desprendidas por el oleaje. Por lo tanto, la falta de variaciones morfológicas y fisiológicas podría deberse a que los individuos del intermareal sean individuos que se desarrollan en el submareal y luego de un evento esporádico lleguen al intermareal donde sobrevivan principalmente por encontrarse en el intermareal bajo. A su vez, la expresión de las proteínas Hsp70 entre los niveles inter- y submareal no mostró diferencias, solamente el grado de estrés ambiental entre los intermareales fue el factor determinante en la expresión de dicha proteína. Esto sería un indicador, de que las pocas horas que los individuos de esta especie pasan descubiertos en el intermareal, no son suficientes para que la diferencia en el gradiente físico con el submareal demande adaptaciones morfológicas o fisiológicas. El interrogante que queda por responder a futuro, es entonces, si este patrón latitudinal se encuentra también presente entre los submareales, o si sus condiciones más homogéneas no demandan una expresión diferencial.

Dado que el calentamiento climático global, como resultado de las actividades antrópicas, es un factor de estrés en las especies marinas y en los ecosistemas (IPCC 2001); se planteó como otro objetivo de esta tesis evaluar los posibles cambios morfológicos y fisiológicos bajo un escenario de calentamiento climático global en la especie *T. geversianus*. En los experimentos realizados, se pudo determinar que los ejemplares que se encuentran expuestos frecuentemente a condiciones de estrés tienen una defensa térmica más efectiva. La respuesta fisiológica de los ejemplares del intermareal, a temperaturas que simulan condiciones de calentamiento climáticas futuras, se produjo a valores más elevados de temperatura que la de los ejemplares del submareal. Indicando que el daño celular es diferente entre los ejemplares de cada nivel, los individuos del submareal sufrirían daño celular a temperaturas inferiores que aquellos del intermareal. Además, la tasa de síntesis de Hsp70 en los ejemplares del intermareal continuó conforme se incrementó la temperatura, indicando que su tolerancia térmica es elevada. Los resultados de esta tesis demostraron que los individuos intermareales tienen un margen de reacción frente al incremento de temperatura. Sin embargo, faltaría determinar el límite de tolerancia máximo, lo que permitiría confirmar que las subpoblaciones del intermareal son más resilientes frente a eventos de incrementos de temperatura. A su vez, sería importante determinar el grado de

muerte celular por apoptosis que presentan los ejemplares de cada nivel cuando comienza la síntesis de Hsp70. Complementariamente, analizando los potenciales cambios en la forma por efectos del calentamiento climático, se encontró que *T. geversianus* presenta plasticidad fenotípica frente al incremento de temperatura. Los cambios en la concha de los reclutas fueron descritos previamente en otros trabajos y vinculados con estrategias para disminuir el daño por incremento de temperatura (Pöhlmann *et al.* 2011, Melatunan *et al.* 2013). Teniendo en cuenta la información generada en los capítulos 2 y 3 sobre la influencia latitudinal en la respuesta plástica y térmica de la especie, surge el siguiente interrogante: ¿Cómo es el patrón latitudinal con respecto a las respuestas fisiológicas y morfológicas en embriones de *T. geversianus*?

El estudio de especies abundantes en ambientes de alto estrés, permite analizar las potenciales adaptaciones para sobrevivir en ambientes extremos. A su vez, nos permite inferir las respuestas fenotípicas que le serán beneficiosos para sobrevivir a condiciones futuras.

---

– Agradecimientos

---

En primer lugar, quiero agradecer a todas las instituciones de educación pública que me acompañaron en el desarrollo de mi carrera profesional. Desde mi escuela rural primaria en la cordillera: Escuela 103 Costa del Río Azul, mi multitudinaria escuela secundaria en Bariloche: Escuela Dr. Ángel Gallardo, la universidad que me entregó mi título de Licenciada en 2014 y con la que pienso recibir el de Doctora: UNPSJB y al CONICET que me otorgó una beca para el desarrollo de este proyecto. Gracias a los increíbles profesionales que me acompañaron en estos 9360 días de capacitación ininterrumpida, sus motivaciones y retos me inspiraron cada día. Orgullosa de haber caído en la escuela pública y asistir a la universidad.

Quiero agradecer al CCT-CENPAT por brindarme sus instalaciones para el desarrollo de la tesis, particularmente al IBIOMAR que me brindó el soporte para su desarrollo. Gracias a los técnicos que me acompañaron y me enseñaron el arte del muestreo. Gracias Bocha por la ayuda en el campo, por la velocidad en el análisis y colaboración en la mejora de cualquier diseño experimental. Gracias Néstor y Bebo por sus buceos ejemplares, la increíble buena onda en cada campaña y predisposición para juntar cualquier cosa en cualquier momento.

Gracias al aporte económico de los proyectos PICT3696, CIUMPAT 2015 y 2018, el premio Australis otorgado por el ICB en el 2016.

A mi equipo directivo que me acompañó durante 5 años de aventuras y exploración. A Grego que me hizo una LARBIM más, gracias por aportar puntos de vista siempre novedosos y totalmente acertados. Por enseñarme el espíritu del cardumen, eso que nos hace más fuertes si nos mantenemos juntos. A Fede por su búsqueda incansable de detalles que me impulsaron siempre a tratar de mejorar, por su entusiasmo en las campañas y buena predisposición. Gracias a Seba por aceptar un peludo de regalo que ya traía mañas de la edad con una sonrisa; por la dedicación en la enseñanza de cada nueva técnica que ampliaron mi horizonte y me impulsaron a desarrollar nuevas preguntas. Gracias por preguntar siempre “¿vos qué pensas?”, a todos gracias totales.

Quiero agradecer a los LARBIMES, un grupo de gente sabia y generosa que no tiene problemas en dejar de lado sus cosas para darte una mano. A mis

compañeros, José gracias por el acompañamiento psicológico, por sacarme de mis obsesivas dudas existenciales casi siempre haciéndome enojar y luego reír. Vere, gracias por los abrazos luego de cada logro, desde un mate bien hecho a una oración bien ensamblada, fueron siempre pequeñas victorias que fuimos conquistando. Al Gonza, mi némesis, gracias por el soporte técnico y colaboración en la estadística, espero que algo de mi estrés te motive y algo de tu paz me tranquilice. A Lore, a quien debo el 35% del desarrollo de mi materia gris en estos 5 años, gracias por enseñar siempre con una sonrisa, por acompañar pase lo que pase, por decirme basta cuando lo necesité y darme un mate de recompensa cuando lo merecía, que suerte que me toco la mejor compañera.

A mi banda de Madryn, un complejo entramado de componentes cada uno tan vital como el otro. Dicen que a lo largo de la vida uno se acerca a las personas con las que tiene más afinidad y lo confirmo cada día. Gracias por llenar cada espacio, por traer siempre nuevos desafíos, por los interminables festejos y premios consuelos que vivimos juntos. Gracias por la extrema intensidad y sobre todo por la incondicionalidad de esta gran amistad. A mis chicas, gracias por la atención y cuidado de cada detalle, por el mensajito que siempre va a estar antes y después de cada evento que consideré importante (aunque... no lo fueran realmente), por escuchar con atención cada detalle de mis, a veces demasiado largas, historias de drama y valor. A mis muchachos, gracias por las aventuras, por las charlas con birras por traer siempre propuestas a horarios y sitios descabellados.

Al coro que me acompañó y fue mi cable a tierra durante todo este período, por permitirme formar parte de proyectos soñados. Gracias Faby por sacarme de mi nube biológica y hacerme vibrar con otras mujeres. Gracias por las personas que me dio este coro, gracias compañeras a todas! Gracias Loky y Nuri por su cariño infinito! las mujeres más valientes y hermosas que pude conocer. Especialmente, gracias Jes, gracias amiga del alma por la magia, por sacarme un rato a volar cada vez que me puse demasiado terrenal.

Gracias a mi familia, los técnicos que están detrás de la escena logrando que esta obra se desarrolle. Gracias a mis viejos por la paciencia en estos 5 años de ausencias, por escuchar mis charlas sobre mi trabajo sin reclamar subtítulos. A mi

hermana que me acompaña en cada etapa y con la que no existen distancias. Por la incondicionalidad con la que siempre me brindaron con Ale un lugar de paz.  
GRACIAS

A mi compañero Mariano, con el que delineamos un camino, en el que volvemos a apostar sin miedo. Gracias por la colaboración imprescindible en el desarrollo de este trabajo, por las innumerables horas en el acuario ajustando mangueritas, por los mates a la madrugada mientras trabajé, por contar los minutos para hacer el revelado en el sótano, por festejar cada meta alcanzada. Gracias por regalarme la historia más linda que me tocó vivir, te amo.

---

– Bibliografía

---

- Aguirre, M.L., Richiano, S., Donato, M. y Farinati, E.A. (2013). *Tegula atra* (Lesson, 1830) (Mollusca, Gastropoda) in the marine quaternary of Patagonia (Argentina, SW Atlantic): Biostratigraphical tool and palaeoclimate-palaeoceanographical signal. *Quaternary International*, **305**: 163-187.
- Almada-Villela, P.C., Davenport, J. y Gruffydd, L.D. (1982). The effects of temperature on the shell growth of young *Mytilus edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **59**: 275-288.
- Aranzamendi, M.C., Bastida, R. y Gardenal, C.N. (2014). Genetic population structure in *Nacella magellanica*: Evidence of rapid range expansion throughout the entire species distribution on the Atlantic coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **460**: 53-61.
- Bell, C.E. y Denny, M.W. (1994). Quantifying "wave exposure": A simple device for recording maximum velocity and results of its use at several field sites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **181**: 9-29.
- Bergmann, C. (1848). Über die verhältnisse der wärmeökonomie der thiere zu ihrer grösse. 1<sup>ra</sup> Edición. Göttingen Studien.
- Bertness, M.D., Crain, C.M., Silliman, B.R., Bazterrica, M.C., Reyna, M.V., Hildago, F. *et al.* (2006). The community structure of western atlantic patagonian rocky shores. *Ecological Monographs*, **76**: 439-460.
- Bertness, M.D., Gaines, S.D. y Hay, M.E. (2001). *Marine community ecology*. 3<sup>ra</sup> Edición. Sinauer Associates Sunderland, Massachusetts.
- Blake, S. (2018). fetchR: Calculate Wind Fetch. En: R package version 2.1-1. <https://CRAN.R-project.org/package=fetchR>.
- Bookstein, F., Schafer, K., Prossinger, H., Seidler, H., Fieder, M., Stringer, C. *et al.* (1999). Comparing frontal cranial profiles in archaic and modern homo by morphometric analysis. *The Anatomical Record (New Anat.)*, **257**: 217-224.
- Bookstein, F.L. (1991). *Morphometric tools for landmark data*. Cambridge/New York/Port Chester. Cambridge University Press. Melbourne, Sydney.
- Bourdeau, P.E. (2009). Prioritized phenotypic responses to combined predators in a marine snail. *Ecology*, **90**: 1659-1669.
- Brun, N.T., Bricej, V.M., MacRae, T.H. y Ross, N.W. (2008). Heat shock protein responses in thermally stressed bay scallops, *Argopecten irradians*, and sea scallops, *Placopecten magellanicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **358**: 151-162.
- Burrows, M.T., Harvey, R. y Robb, L. (2008). Wave exposure indices from digital coastlines and the prediction of rocky shore community structure. *Marine Ecology Progress Series*, **353**: 1-12.
- Cabral, P.J. (2007). Shape and growth in European Atlantic *Patella* limpets (Gastropoda, Mollusca). Ecological implications for survival. *Web Ecology*, **7**: 11-21.
- Carvajal Rodríguez, P., Conde-Padin, P. y Rolán-Alvarez, E. (2005). Decomposing shell form into size and shape by geometric morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis*. *Journal of Molluscan Studies*, **71**: 313-318.
- Castellanos, Z. y Landoni, N. (1993). Catálogo descriptivo de la malacofauna marina magallánica. En: Neogastropoda *Muricidae* y *Thaisidae*. Comisión

- de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. La Plata, p. 25.
- Clarke, K.R. y Warwick, R.M. (1994). Change in marine communities: An approach to statistical analysis and interpretation. 5<sup>ta</sup> Edición. Natural Environment Research Council. Plymouth.
- Collins, M., Knutti, R., Arblaster, J., Dufresne, J.L., Fichet, T., Friedlingstein, P. *et al.* (2013). Long-term climate change: Projections, commitments and irreversibility. En: Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change ed. (eds. Stocker, TF, Qin, D, Plattner, GK, Tignor, M, Allen, SK, Boschung, J *et al.*). Cambridge University Press Cambridge, United Kingdom and New York. NY, USA, pp. 1029-1136.
- Conde-Padín, P., Grahame, J.W. y Rolán-Alvarez, E. (2007). Detecting shape differences in species of the *Littorina saxatilis* complex by morphometric analysis. *Journal of Molluscan Studies*, **73**: 147-154.
- Connell, J.H. (1961). The influence of interspecific competition and other factors on the distribution of the barnacle *Chthamalus stellatus*. *Ecology*, **42**: 710-723.
- Coronato, F.R. (1993). Wind chill factor applied to Patagonian climatology. *International Journal of Biometeorology*, **37**: 1-6.
- Coronato, S., Di Girolamo, W., Salas, M., Spinelli, O. y Laguens, G. (1999). Biology of heat shock proteins. *Medicina*, **59**: 477-486.
- Cumplido, M. (2008). Estacionalidad reproductiva y desarrollo embrionario del caracol *Trophon geversianus* en el intermareal de Punta Cuevas, Golfo Nuevo. Tesina de Grado. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco Puerto Madryn, Chubut.
- Cumplido, M., Averbuj, A. y Bigatti, G. (2010). Reproductive seasonality and oviposition induction in *Trophon geversianus* (Gastropoda: Muricidae) from Golfo Nuevo, Argentina. *Shellfish Research*, **29**: 423-428.
- Dahlhoff, E.P. y Rank, N.E. (2007). The role of stress proteins in responses of a montane willow leaf beetle to environmental temperature variation. *Journal of Biosciences*, **32**: 477-488.
- Dayton, P.K. (1971). Competition, disturbance, and community organization: The provision and subsequent utilization of space in a rocky intertidal community. *Ecological Monographs*, **41**: 351-389.
- Del Río, C.J., Santelli, M.B. y Márquez, F. (2016). Environmental control on shell-sculpture of the Miocene pectinid "*Chlamys*" *actinodes* (Sowerby, 1846) (Patagonia, Argentina). *Ameghiniana*, **53**: 645-654.
- Denny, M.W. y Wetthey, D.S. (2001). Physical processes that generate patterns in marine communities. En: *Marine Community Ecology*. (eds. Bertness, MD, Gaines, SD y Hay, ME). Sinauer Associates Inc. Sunderland, pp. 3-37.
- Deschaseaux, E.S., Taylor, A., Maher, W.A. y Davis, A. (2010). Cellular responses of encapsulated gastropod embryos to multiple stressors associated with climate change. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **383**: 130-136.

- Di Lellis, M.A., Seifan, M., Troschinski, S., Mazzia, C., Capowiez, Y., Triebkorn, R. *et al.* (2012). Solar radiation stress in climbing snails: behavioural and intrinsic features define the Hsp70 level in natural populations of *Xeropicta derbentina* (Pulmonata). *Cell Stress and Chaperones*, **17**: 717-727.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C.W. (2011). InfoStat, Epub versión 24-03-2011.
- Dong, Y., Miller, L.P., Sanders, J.G. y Somero, G.N. (2008). Heat-shock protein 70 (Hsp70) expression in four limpets of the genus *Lottia*: Interspecific variation in constitutive and inducible synthesis correlates with in situ exposure to heat stress. *The Biological Bulletin*, **215**: 173-181.
- Drake, A.G. y Klingenberg, C.P. (2007). The pace of morphological change: Historical transformation of skull shape in St Bernard dogs. *Proceedings of the Royal Society*, **275**: 71-76.
- Evgen'ev, M., Garbuz, D., Shilova, V. y Zatsepina, O. (2007). Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. *Journal of Biosciences*, **32**: 489-499.
- Farcy, E., Serpentine, A., Fiévet, B. y Lebel, J.M. (2007). Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primary culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **146**: 540-550.
- Fariña, J.M., Castilla, J.C. y Camus, P.A. (1997). Los conceptos de equilibrio y no equilibrio en la ecología de comunidades. *Revista Chilena de Historia Natural*, **70**: 321-339.
- Feder, J.H., Rossi, J.M., Solomon, J., Solomon, N. y Lindquist, S. (1992). The consequences of expressing Hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes & Development*, **6**: 1402-1413.
- Feder, M.E. y Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology*, **61**: 243-282.
- Feely, R.A., Sabine, C.L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., Fabry, V.J. *et al.* (2004). Impact of anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> system in the oceans. *Science*, **305**: 362-366.
- Fink, A.L. (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiological reviews*, **79**: 425-449.
- Franzellitti, S. y Fabbri, E. (2005). Differential HSP70 gene expression in the Mediterranean mussel exposed to various stressors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **336**: 1157-1163.
- Fuji, A. (1988). Measuring wave force on a rocky intertidal shore. *北海道大學水産學部研究彙報= Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*, **39**: 257-264.
- García-Navas, V., Noguerales, V., Cordero, P.J. y Ortego, J. (2017). Phenotypic disparity in Iberian short-horned grasshoppers (*Acrididae*): The role of ecology and phylogeny. *BMC Evolutionary Biology*, **17**: 109.
- Gazeau, F., Parker, L.M., Comeau, S., Gattuso, J.P., O'Connor, W.A., Martin, S. *et al.* (2013). Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, **160**: 2207-2245.

- Gian-Reto, W., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C. *et al.* (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature* **416**: 389.
- Gibson, J.S. (1970). The function of the operculum of *Thais lapillus* (L.) in resisting desiccation and predation. *The Journal of Animal Ecology*, **39**: 159-168.
- Grahame, J.W., Wilding, C.S. y Butlin, R.K. (2006). Adaptation to a steep environmental gradient and an associated barrier to gene exchange in *Littorina saxatilis*. *Evolution*, **60**: 268-278.
- Griffin, M. y Pastorino, G. (2005). The genus *Trophon* Monfort, 1810 (Gastropoda: Muricidae) in the tertiary of Patagonia. *Journal of Paleontology*, **79**: 296-311.
- Guerra-Varela, J., Colson, I., Backeljau, T., Breugelmans, K., Hughes, R.N. y Rolán-Alvarez, E. (2009). The evolutionary mechanism maintaining shell shape and molecular differentiation between two ecotypes of the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Evolutionary Ecology*, **23**: 261-280.
- Guinotte, J.M. y Fabry, V.J. (2008). Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1134**: 320-342.
- Haller, M.J.F., Demichelis, A.H., Cabrerros, J. y Pardo, M.I. (1990). Petrología y geoquímica del vulcanismo Triásico-Jurásico en la Patagonia Extrandina y su relación con el rifting gondwánico. En: Actas XI Congreso Geológico Argentino, San Juan.
- Haller, M.J.F., Meister, C.M., Monti, A.J.A., Weiler, N. y Ardolino, A.A. (2017). Hoja Geológica 4366-II Puerto Madryn. Servicio Geológico Minero Argentino. Instituto de Geología y Recursos Minerales.
- Harborne, A.R., Mumby, P.J., ZŻychaluk, K., Hedley, J.D. y Blackwell, P.G. (2006). Modeling the beta diversity of coral reefs. *Ecology*, **87**: 2871-2881.
- Harley, C. (2007). Zonation. *Encyclopedia of tidepools and rocky shores*. University of California Press. Berkeley, California, USA, pp 647-653.
- Harley, C.D.G., Hughes, A.R., Hultgren, K.M., Miner, B.G., Sorte, C.J.B., Thornber, C.S. *et al.* (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, **9**: 228-241.
- Haugan, P.M. (1997). Impacts on the marine environment from direct and indirect ocean storage of CO<sub>2</sub>. *Waste Management*, **17**: 323-327.
- Hawlena, D. y Schmitz, O.J. (2010). Physiological stress as a fundamental mechanism linking predation to ecosystem functioning. *The American Naturalist*, **176**: 537-556.
- Helmuth, B.S.T. (1998). Intertidal mussel microclimates: Predicting the body temperature of a sessile invertebrate. *Ecological Monographs*, **68**: 51-74.
- Hidalgo, F.J., Silliman, B.R., Bazterrica, M.C. y Bertness, M.D. (2007). Predation on the rocky shores of Patagonia, Argentina. *Estuaries and Coasts*, **30**: 886-894.
- Hochachka, P.W. y Somero, G.N. (2002). *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press. Oxford.
- Hofmann, G. (1999). Ecologically relevant variation in induction and function of heat shock proteins in marine organisms. *American Zoologist*, **39**: 889-900.

- Hofmann, G. y Somero, G. (1995). Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and Hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. *Journal of Experimental Biology*, **198**: 1509-1518.
- Ichazo, G.J. (2001). Carta de Peligrosidad Geológica 4366-IV Rawson. En: Programa Nacional de Cartas Geológicas de la República Argentina (ed. Lapido, OR). Instituto de Geología y Recursos Minerales Buenos Aires.
- IPCC (2001). Cambio climático 2001. Contribución de los grupos de trabajo I, II, y III al tercer informe de evaluación del grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.
- Iwama, G.K., Afonso, L., Todgham, A., Ackerman, P. y Nakano, K. (2004). Are hsp70s suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, **207**: 15-19.
- Jeno, K. y Brokordt, K. (2014). Nutritional status affects the capacity of the snail *Concholepas concholepas* to synthesize Hsp70 when exposed to stressors associated with tidal regimes in the intertidal zone. *Marine Biology*, **161**: 1039-1049.
- Johannesson, B. (1986). Shell morphology of *Littorina saxatilis* Olivi: The relative importance of physical factors and predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **102**: 183-195.
- Johannesson, B. (1996). Population differences in behaviour and morphology in the snail *Littorina saxatilis*: Phenotypic plasticity or genetic differentiation? *Journal of Zoology*, **240**: 475-493.
- Jones, C.G., Lawton, J.H. y Shachak, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. En: *Ecosystem management* ed. Springer, pp. 130-147.
- Kelaher, B.P., Castilla, J.C., Prado, L., York, P., Schwindt, E. y Bortolus, A. (2007). Spatial variation in molluscan assemblages from coralline turfs of Argentinean Patagonia. *Journal of Molluscan Studies*, **73**: 139-146.
- Kitching, J.A. y Lockwood, J. (1974). Observations on shell form and its ecological significance in thaisid gastropods of the genus *Lepsiella* in New Zealand. *Marine Biology*, **28**: 131-144.
- Klingenberg, C.P. (2008). MorphoJ. Faculty of Life Sciences. University of Manchester, UK.
- Klingenberg, C.P. (2011). MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, **11**: 353-357.
- Krebs, R. y Loeschke, V. (1994). Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, **8**: 730-737.
- Kruskal, J.B. y Wish, M. (1978). *Multidimensional scaling*. Sage.
- Lema, H., Busteros, A., Franchi, M., Parisi, C., Márquez, M.J. y Ardolino, A.A. (2001). Hoja Geológica 4566-II y IV Camarones. Servicio Geológico Minero Argentino. Instituto de Geología y Recursos Minerales.
- Levinton, J.S. (1995). *Marine biology: Function, biodiversity, ecology*. Oxford University Press. New York.
- Liang, P. y MacRae, T.H. (1997). Molecular chaperones and the cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, **110**: 1431-1440.

- Lima, F.P., Gomes, F., Seabra, R., Wetthey, D.S., Seabra, M.I., Cruz, T. *et al.* (2016). Loss of thermal refugia near equatorial range limits. *Global Change Biology*, **22**: 254-263.
- Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, **55**: 1151-1191.
- Linse, K. (1999). Mollusca of the Magellan region. A checklist of the species and their distribution. *Scientia Marina*, **63**: 399-407.
- Livore, J.P., Mendez, M.M., Bigatti, G. y Márquez, F. (2018). Habitat-modulated shell shape and spatial segregation in a Patagonian false limpet (*Siphonaria lessonii*). *Marine Ecology Progress Series*, **606**: 55-63.
- Lowry, O.H., Farr, A.L., Rosebrough, N.J. y Ryall, R.J. (1951). Protein measurement of emulsifying capacity by electrical resistance. *Food Science*, **193**: 265-275.
- Mackenzie, C.L., Ormondroyd, G.A., Curling, S., Ball, R.J., Whiteley, N.M. y Malham, S.K. (2014). Ocean warming, more than acidification, reduces shell strength in a commercial shellfish species during food limitation. *PLoS ONE*, **9**: 86764.
- Malvé, M.E., Gordillo, S. y Rivadeneira, M.M. (2016). Connecting pH with body size in the marine gastropod *Trophon geversianus* in a latitudinal gradient along the south-western Atlantic coast. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **98**: 449-456.
- Malvé, M.E., Rivadeneira, M.M. y Gordillo, S. (2018). Biogeographic shell shape variation in *Trophon geversianus* (gastropoda: Muricidae) along the southwestern atlantic coast. *Palaios*, **33**: 498-507.
- Márquez, F., Adami, M.L., Trovant, B., Nieto-Vilela, R.A. y González-José, R. (2018). Allometric differences on the shell shape of two scorched mussel species along the Atlantic South American. *Coast. Evolutionary Ecology*, **32**: 43-56.
- Márquez, F., González-José, R. y Bigatti, G. (2011). Combined methods to detect pollution effects on shell shape and structure in Neogastropods. *Ecological Indicator*, **11**: 248-254.
- Márquez, F., Nieto Vilela, R.A., Lozada, M. y Bigatti, G. (2015). Morphological and behavioral differences in the gastropod *Trophon geversianus* associated to distinct environmental conditions, as revealed by a multidisciplinary approach. *Journal of Sea Research*, **95**: 239-247.
- Mayr, E. (1956). Geographical character gradients and climatic adaptation. *Evolution*, **10**: 105-108.
- Melatunan, S., Calosi, P., Rundle, S.D., Widdicombe, S. y Moody, A.J. (2013). Effects of ocean acidification and elevated temperature on shell plasticity and its energetic basis in an intertidal gastropod. *Marine Ecology Progress Series*, **472**: 155-168.
- Mendez, M.M., Sueiro, M.C., Schwindt, E. y Bortolus, A. (2014). Invasive barnacle fouling on an endemic burrowing crab mobile basibionts as vectors to invade a suboptimal habitat. *Thalassas*, **30**: 39-46.
- Menge, B.A. (1992). Community regulation: under what conditions are bottom-up factors important on rocky shores? *Ecology*, **73**: 755-765.

- Menge, B.A. y Branch, G.M. (2001). Rocky intertidal communities. En: Marine Community Ecology (eds. Bertness, MD, Gaines, SD y Hay, ME). Sinauer Associates Inc. Sunderland, pp. 211-254.
- Menge, B.A., Lubchenco, J. y Ashkenas, L.R. (1985). Diversity, heterogeneity and consumer pressure in a tropical rocky intertidal community. *Oecologia*, **65**: 394-405.
- Menge, B.A., Olson, A.M. y Dahlhoff, E.P. (2002). Environmental stress, bottom-up effects, and community dynamics: integrating molecular-physiological and ecological approaches. *Integrative and Comparative Biology*, **42**: 892-908.
- Meredith, M.P. y King, J.C. (2005). Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. *Geophysical Research Letters*, **32**: 1-5.
- Mizrahi, T., Goldenberg, S., Heller, J. y Arad, Z. (2014). Natural variation in resistance to desiccation and heat shock protein expression in the land snail *Theba pisana* along a climatic gradient. *Physiological and Biochemical Zoology*, **88**: 66-80.
- Monteiro, L.R. (1999). Multivariate regression models and geometric morphometrics: The search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology*, **48**: 192-199.
- Moreira, D., Simionato, C.G. y Dragani, W. (2011). Modeling ocean tides and their energetics in the North Patagonia Gulfs of Argentina. *Journal of Coastal Research*, **27**: 87-102.
- Murphy, J.M. y Mitchell, J.F.B. (1995). Transient response of the hadley centre coupled ocean-atmosphere model to increasing carbon dioxide. Part II: Spatial and temporal structure of response. *Journal of Climate*, **8**: 57-80.
- Nakano, K. y Iwama, G.K. (2002). The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of Hsp70 and thermal tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **133**: 79-94.
- Nieto Vilela, R.A., Cumplido, M. y Bigatti, G. (2013). Desarrollo de *biofilms* sobre distintos sustratos para experiencias de alimentación en Gasterópodos marinos. Red de Fortalecimiento para la Maricultura Costera Patagónica ([www.mariculturaenred.org](http://www.mariculturaenred.org)).
- Okoshi, K. (1996). Biomineralization in molluscan aquaculture growth and disease. *Bulletin l'Institut Océanographique*, **14**: 151-169.
- Olson, I.C., Kozdon, R., Valley, J.W. y Gilbert, P.U.P.A. (2012). Mollusk shell nacre ultrastructure correlates with environmental temperature and pressure. *Journal of the American Chemical Society*, **134**: 7351-7358.
- Palma, E.D., Matano, R.P. y Piola, A.R. (2004). A numerical study of the Southwestern Atlantic Shelf circulation: Barotropic response to tidal and wind forcing. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, **109**: 8014.
- Palmer, A.R. (1979). Fish predation and the evolution of gastropod shell sculpture: experimental and geographic evidence. *Evolution*, **33**: 697-713.
- Parsell, D.A. y Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics*, **27**: 437-496.

- Partridge, L. y Coyne, J.A. (1997). Bergmann's rule in ectotherms: is it adaptive? *Evolution*, **51**: 632-635.
- Paruelo, J.M., Beltrán, A., Jobbagy, E., Sala, O.E. y Golluscio, R.A. (1998). The climate of Patagonia: general patterns and controls on biotic processes. *Ecología Austral*, **8**: 85-101.
- Pastorino, G. (1994). Moluscos costeros recientes de Puerto Pirámide, Chubut, Argentina. *Academia Nacional de Ciencias, Córdoba*. **93**: 1-30
- Pastorino, G. (2005). A revision of the genus *Trophon montforti*, 1810 (Gastropoda: Muricidae) from southern south America. *The Nautilus* **119**: 55-82.
- Pauwels, K., Stoks, R. y De Meester, L. (2005). Coping with predator stress: interclonal differences in induction of heat-shock proteins in the water flea *Daphnia magna*. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**: 867-872.
- Pesce, A. (1979). Estratigrafía del Arroyo Perdido en su tramo medio e inferior, Provincia del Chubut. En: VII Congreso Geológico Argentino, Neuquén, Argentina, Actas, pp. 315-333.
- Petes, L.E., Menge, B.A. y Murphy, G.D. (2007). Environmental stress decreases survival, growth, and reproduction in New Zealand mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **351**: 83-91.
- Piano, A., Franzellitti, S., Tinti, F. y Fabbri, E. (2005). Sequencing and expression pattern of inducible heat shock gene products in the European flat oyster, *Ostrea edulis*. *Gene*, **361**: 119-126.
- Piersma, T. y Van Gils, J.A. (2011). *The flexible phenotype: a body-centred integration of ecology, physiology and behaviour*. Oxford University Press, New York.
- Pigliucci, M. (2001). *Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture*. JHU Press.
- Pöhlmann, K., Koenigstein, S., Alter, K., Abele, D. y Held, C. (2011). Heat-shock response and antioxidant defense during air exposure in patagonian shallow-water limpets from different climatic habitats. *Cell Stress and Chaperones*, **16**: 621-632.
- Pörtner, H.O. y Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, **315**: 95-97.
- Raffaelli, D. y Hawkins, S.J. (2012). *Intertidal ecology*. 2<sup>da</sup> Edición. Springer Science & Business Media, Londres.
- Rechimont, M.E. (2011). Patrón de distribución y abundancia de invertebrados bentónicos en costas del Golfo Nuevo. En: *Ciencias Naturales. Tesina de Grado*. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Puerto Madryn, Chubut.
- Rechimont, M.E., Galván, D., Sueiro, M.C., Casas, G., Piriz, M.L., Diez, M.E. *et al.* (2013). Benthic diversity and community structure of a north patagonian rocky shore. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **93**: 2049-2058.
- Rivas, A.L. (1990). Heat-balance and annual variation of mean temperature in the north-patagonian gulfs. *Oceanologica Acta*, **13**: 265-272.
- Rivas, A.L. y Beier, E.J. (1989). Temperature and salinity fields in the north patagonian gulfs. *Oceanologica Acta*, **13**: 15-20.

- Roco, R. (2010). Efecto del aumento de temperatura y presencia de pintura anti-incrustante sobre la supervivencia, crecimiento, alimentación y estrés en juveniles de loco *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Muricidae): Impacto potencial de termoeléctricas costeras. Tesis de Licenciatura. Universidad Católica del Norte, Coquimbo.
- Rochette, R., Doyle, S.P. y Edgell, T.C. (2007). Interaction between an invasive decapod and a native gastropod: predator foraging tactics and prey architectural defenses. *Marine Ecology Progress Series*, **330**: 179-188.
- Roessing, J.M., Woodley, C.M., Cech, J.J. y Hansen, L.J. (2005). Effects of global climate change on marine estuarine fishes and fisheries. (ed. Fund, WW). University of California Washington.
- Rohlf, F.J. y Marcus, L.F. (1993). A Revolution In Morphometrics. *Trends Ecology and Evolution*, **8**: 129-132.
- Rohlf, F.J. y Slice, D.E. (1990). Extensions of the Procrustes Method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, **39**: 40-59.
- Rolan-Alvarez, E., Austin, C. y Boulding, E.G. (2015). The contribution of the genus *Littorina* to the field of evolutionary ecology. *Oceanography and Marine Biology: an annual review*, **53**: 157-214.
- Roller, R.A. y Stickle, W.B. (1989). Temperature and salinity effects on the intracapsular development, metabolic rates, and survival to hatching of *Thais haemastoma canaliculata* (Gray) (Prosobranchia:Muricidae) under laboratory conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **125**: 235-251.
- Root, T.L., Price, J.T., Hall, K.R., Schneider, S.H., Rosenzweig, C. y Pounds, J.A. (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, **421**: 57.
- Sagarin, R.D. y Somero, G.N. (2006). Complex patterns of expression of heat-shock protein 70 across the southern biogeographical ranges of the intertidal mussel *Mytilus californianus* and snail *Nucella ostrina*. *Journal of Biogeography*, **33**: 622-630.
- Schillizzi, R., Spagnuolo, J. y Luna, L. (2014). Morfología de la costa atlántica entre Punta Ninfas y Cabo Dos Bahías, Chubut, Argentina. *Revista del Museo de La Plata*, **14**: 1-15.
- Schlesinger, M.J. (1990). Heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **265**: 12111-12114.
- Schwindt, E. (2007). The invasion of the acorn barnacle *Balanus glandula* in the south-western Atlantic 40 years later. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **87**: 1219-1225.
- Sepúlveda, R.D. y Ibáñez, C.M. (2012). Clinal variation in the shell morphology of intertidal snail *Acanthina monodon* in the Southeastern Pacific Ocean. *Marine Biology Research*, **8**: 363-372.
- Sherman, M.Y.S. y Goldberg, A.L. (1996). Involvement of molecular chaperones in intracellular protein breakdown. En: *Stress-inducible cellular responses* (ed Birkhäuser Basel). Springer, pp. 57-78.
- Silliman, B.R., Bertness, M.D., Altieri, A.H., Griffin, J.N., Bazterrica, M.C., Hidalgo, F.J. *et al.* (2011). Whole-community facilitation regulates biodiversity on Patagonian rocky shores. *PLoS ONE*, **6**: 10.

- Slice, D., Bookstein, F., Marcus, L. y Rohlf, F. (1996a). Advances in morphometrics. A glossary for geometric morphometrics. (eds. Marcus, LF, Corti, M, Loy, A, Naylor, GJP, Slice, D), **284**: 531-551.
- Slice, D.E., Bookstein, F.L., Marcus, L.F. y Rohlf, F.J. (1996b). Appendix I: A glossary for geometric morphometrics. Nato ASI Series a life sciences, **284**: 531-552.
- Solas, M.R., Hughes, R.N., Márquez, F. y Brante, A. (2015). Early plastic responses in the shell morphology of *Acanthina monodon* (Mollusca, Gastropoda) under predation risk and water turbulence. Marine Ecology Progress Series, **527**: 133-142.
- Somero, G. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: Optima, limits, and costs of living. Integrative and Comparative Biology, **42**: 780-789.
- Somero, G. (2010). The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. Journal of Experimental Biology, **213**: 912-920.
- Sousa, W.P. (1979). Disturbance in marine intertidal boulder fields: The nonequilibrium maintenance of species diversity. Ecology, **60**: 1225-1239.
- Stenseng, E. (2005). Thermal tolerance limits of heart function in *Tegula* snail congeners of the marine intertidal. Marine Biology. [http://www.stanford.edu/group/journal/cgi-bin/wordpress/wp-content/uploads/2012/09/Stenseng\\_NatSci\\_2005.pdf](http://www.stanford.edu/group/journal/cgi-bin/wordpress/wp-content/uploads/2012/09/Stenseng_NatSci_2005.pdf).
- Stephenson, T.A. y Stephenson, A. (1949). The universal features of zonation between tide-marks on rocky coasts. The Journal of Ecology, **37**: 289-305.
- Stillman, J.H. (2002). Causes and consequences of thermal tolerance limits in rocky intertidal porcelain crabs, genus *Petrolisthes*. Integrative and comparative biology, **42**: 790-796.
- Stillman, J.H. (2003). Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. Science, **301**: 65-65.
- Tarbuck, E.J. y Lutgens, F.J. (2003). Earth: An introduction to Physical Geology. Upper Saddle River: Prentice Hall, Illinois Central College.
- Team, D. (2.14.3). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <https://qgis.org>.
- Teso, S.V., Bigatti, G., Casas, G.N., Piriz, L. y Penchaszadeh, P.E. (2009). Do native grazers from Patagonia, Argentina, consume the invasive kelp *Undaria pinnatifida*? Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales, **11** 7-14.
- Tomanek, L. y Helmuth, B.T. (2002). Physiological ecology of rocky intertidal organisms: A synergy of concepts. Integrative and Comparative Biology, **42**: 771-775.
- Tomanek, L. y Sanford, E. (2003). Heat-Shock Protein 70 (Hsp70) as a biochemical stress indicator: An experimental field test in two congeneric intertidal gastropods (Genus: *Tegula*). The Biological Bulletin, **205**: 276-284.
- Tomanek, L. y Somero, G. (1999). Evolutionary and acclimation-induced variation in the heat-shock responses of congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different thermal habitats: Implications for limits of thermotolerance and biogeography. The Journal of Experimental Biology, **202**: 2925-2936.

- Tomanek, L. y Somero, G. (2000). Time course and magnitude of synthesis of heat-shock proteins in congeneric marine snails (genus *Tegula*) from different tidal heights. *Physiological and Biochemical Zoology*, **73**: 249-256.
- Tomanek, L. y Somero, G. (2002). Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): Implications for regulation of hsp gene expression. *Journal of Experimental Biology*, **205**: 677-685.
- Tomanek, L. y Zuzow, M.L. (2010). The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* to acute heat stress: Implications for thermal tolerance limits and metabolic costs of thermal stress. *Journal of Experimental Biology*, **213**: 3559-3574.
- Trovant, B., Márquez, F., del Río, C.J., Ruzzante, D.E., Martínez, S. y Orensanz, J.M. (2018). Insights on the history of the scorched mussel *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia: Mytilidae) in the Southwest Atlantic: A geometric morphometrics perspective. *Historical Biology*, **30**: 564-572.
- Trussell, G.C. (2000). Predator-induced plasticity and morphological trade-offs in latitudinally separated populations of *Littorina obtusata*. *Evolutionary Ecology Research*, **2**: 803-822.
- Tyberghein, L., Verbruggen, H., Pauly, K., Troupin, C., Mineur, F. y De Clerck, O. (2012). Bio-ORACLE: A global environmental dataset for marine species distribution modelling. *Global Ecology and Biogeography*, **21**: 272-281.
- Ugland, K.I., Gray, J.S. y Ellingsen, K.E. (2003). The species-accumulation curve and estimation of species richness. *Journal of Animal Ecology*, **72**: 888-897.
- Valdano, S.G. y Di Rienzo, J.A. (2007). Discovering meaningful groups in hierarchical cluster analysis. An extension to the multivariate case of a multiple comparison method based on cluster analysis. *InterStat*: 1-28.
- Van Valen, L. (1965). Morphological variation and width of ecological niche. *The American Naturalist*, **99**: 377-390.
- Van Voorhies, W.A. (1997). On the adaptive nature of Bergmann size clines: A reply to Mousseau, Partridge and Coyne. *Evolution*, **51**: 635-640.
- Vermeij, G.J. (1972). Intraspecific shore-level size gradients in intertidal molluscs. *Ecology*, **53**: 693-700.
- Vieira, E.A. y Bueno, M. (2019). Small spatial scale effects of wave action exposure on morphological traits of the limpet *Lottia subrugosa*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **99**: 1309-1315.
- Volvenko, I.V. (2012). Extremal principles and goal functions of biocenotic systems. *Biophysics*, **57**: 350-362.
- Wiley, D.F., Amenta, N., Alcantara, D.A., Ghosh, D., Kil, Y.J., Delson, E. *et al.* (2005). Evolutionary morphing. En: VIS 05. IEEE Visualization, 2005. IEEE, pp. 431-438.
- Willmore, K.E., Young, N.M. y Richtsmeier, J.T. (2007). Phenotypic variability: Its components, measurement and underlying developmental processes. *Evolutionary Biology*, **34**: 99-120.
- Yamazaki, D., Hirano, T., Uchida, S., Miura, O. y Chiba, S. (2018). Relationship between contrasting morphotypes and the phylogeny of the marine

- gastropod genus *Tegula* (Vetigastropoda: Tegulidae) in East Asia. *Journal of Molluscan Studies*, **85**: 24-34.
- Yorio, P., Bertellotti, M., García Borboroglu, P., Carribero, A., Giaccardi, M., Lizurume, M.E. *et al.* (1998). Distribución reproductiva y abundancia de las aves marinas de Chubut. Parte 1: de Península Valdés a Islas Blancas. En: Atlas de la distribución reproductiva de aves marinas en el litoral patagónico argentino. Fundación Patagonia Natural.
- Zakharov, V.M. (1992). Population phenogenetics: analysis of developmental stability in natural populations. *Acta Zoologica Fennica*, **191**: 7-30.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. y Fink, W.L. (2004). Simple size and shape variables: Bookstein shape coordinates. En: *Geometric Morphometrics for Biologists* (eds. Zelditch, ML, Swiderski, DL, Sheets, HD y Fink, WL). Academic Press San Diego, pp. 51-72.