



Seminario de Licenciatura

Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud  
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

**Diversidad genética y morfológica del cangrejo nativo  
*Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura, Varunidae) en el Atlántico  
Sudoccidental**



**Alumna: Florencia, Alvarez Gallego**

Directora: Dra. Berenice, Trovant

Co-Director: Dr. Federico, Márquez

Asesor: Dr. Marcelo F., Tejedor

Co-Asesora: Dra. María Eva, Góngora

Trelew, julio 2022

Along

Barrett

Fujano

1/20/11

SA



## Tabla de contenidos

<b>1.</b>	<b>Resumen</b> .....	8
<b>2.</b>	<b>Introducción</b> .....	10
<b>3.</b>	<b>Objetivo general</b> .....	13
<b>4.</b>	<b>Hipótesis/ Predicciones</b> .....	14
<b>5.</b>	<b>Metodología</b> .....	14
5.1	Obtención de muestras .....	14
5.2	Descripción de los sitios de estudio .....	17
5.3	Obtención de ADN y secuenciación .....	20
5.4	Análisis genéticos .....	21
5.5	Análisis morfométricos .....	26
5.5.1	Análisis estadísticos morfométricos .....	29
<b>6.</b>	<b>Resultados</b> .....	31
6.1	Análisis genéticos poblacionales a partir del gen ARNr 16s .....	31
6.2	Análisis genéticos poblacionales a partir del gen COXI .....	34
6.3	Análisis a nivel de género a partir del gen ARNr 16s .....	40
6.4	Morfometría geométrica .....	41
6.5	Genética y morfometría .....	49
<b>7.</b>	<b>Discusión</b> .....	50
7.1	Análisis genéticos .....	50
7.2	Análisis morfométricos .....	56
7.3	Análisis genéticos y morfométricos .....	61
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	62
<b>9.</b>	<b>Agradecimientos</b> .....	63
<b>10.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	64
<b>11.</b>	<b>Material suplementario</b> .....	74



## Índice de figuras

- Figura 1.** Localización de las muestras de *C. angulatus*. Las localidades para un mismo tipo de hábitat están representadas con un mismo color. A: Montevideo (MON); B: Mar Chiquita (MCH); C: Carmen de Patagones (CDP); D: Playa Fracasso (PFR); E: 28 de Julio (VDJ) y F: Puerto Deseado (DES).....15
- Figura 2.** Protocolo utilizado para la obtención de ADN. ....20
- Figura 3.** Fotografía que muestra la configuración de *landmarks* (puntos azules) y *semilandmarks* (puntos rojos) en dos dimensiones, las cuales se utilizaron para capturar la forma del carapacho.....28
- Figura 4.** Red de haplotipos de *C. angulatus* a partir de una región parcial del gen mitocondrial ARNr 16s. El tamaño de los círculos es proporcional a las frecuencias haplotídicas. La línea blanca que une los haplotipos indica un paso mutacional. Los colores definen las localidades de cada haplotipo. ....33
- Figura 5.** Índices de diversidad genética de una región parcial del gen mitocondrial ARNr 16s estimados para el total de especímenes y para cada localidad; Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES). S: número de sitios polimórficos, Hd: diversidad haplotídica, k: número promedio de diferencias nucleotídicas y Pi: diversidad nucleotídica. ....36
- Figura 6.** Red de haplotipos de *C. angulatus* a partir de una región parcial del gen mitocondrial COXI. El tamaño de los círculos es proporcional a las frecuencias haplotídicas. La línea gris que une los haplotipos indica un paso mutacional. Los colores definen las localidades de cada haplotipo. ....37
- Figura 7.** Diagrama de dispersión de la matriz de distancia genética y geográfica de *C. angulatus*. ....39
- Figura 8.** Red de haplotipos del género *Cyrtograpsus* a partir del gen mitocondrial ARNr 16s. El tamaño de los círculos es proporcional a las frecuencias



haplotílicas. La línea gris que une los haplotipos indica un paso mutacional. Los colores definen las localidades de cada haplotipo.....41

**Figura 9.** Componente simétrico de la forma (promedios de los lados izquierdo y derecho). Los puntos azules representan la forma consenso, mientras que los puntos más pequeños y negros representan la dispersión de los *landmarks* de cada una de las configuraciones individuales de toda la muestra. Los números de cada *landmarks* están indicados en rojo. ....42

**Figura 10.** Regresión multivariada que muestra los cambios de forma (*regression score*<sup>1</sup>) asociados al incremento de tamaño del centroide. Las elipses de igual frecuencia se graficaron al 90%. Los colores de las siglas y de las elipses indican las diferentes localidades. Los *wireframe* (estructura alámbrica) representan las formas de los individuos con un factor de escala de 90 (individuos grandes) y con un factor de -90 (individuos pequeños). El contorno color turquesa indica la forma consenso y el contorno azul indica las formas variables. Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), Playa Fracasso (PFR), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES)....43

**Figura 11.** Gráfico de barras que indica el porcentaje de variación explicado por cada componente principal. La varianza total es la suma de las varianzas explicada por cada componente principal en la totalidad del morfoespacio....44

**Figura 12.** Gráfico de componentes principales (CP), que indica los patrones de variaciones de forma simétrica para todos los individuos. A) CP1 vs CP2 con  $fc = \pm 0,06$ , B) CP3 vs CP4 con  $fc = \pm 0,03$ . El factor de escala (*fc*) indica la magnitud de cambio de la forma como una distancia de Procrustes. Las formas en los extremos opuestos del rango de variación se muestran con un gráfico de estructuras alámbricas (*wireframe*). El contorno de color turquesa indica la forma consenso y el contorno azul indica las formas variables.....45

**Figura 13.** Gráfico de componentes principales (CP), que indica los patrones de variaciones de forma simétrica para los individuos por localidad: A y C), y por hábitat: B y D). Las elipses de igual frecuencia se graficaron al 90%. Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), Playa Fracasso (PFR), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES). ....45



**Figura 14.** Análisis de variables canónicas de la variación de la forma agrupada por localidad, con elipses de confianza alrededor de la media al 95% de confianza. Los gráficos de *wireframe* indican los cambios de forma para cada grupo de localidad. Las unidades de los ejes de los diagramas de dispersión de las puntuaciones VC contienen factores de escala que indican la distancia de Procrustes, es decir, el valor predeterminado de 10,0 es un cambio de 10 unidades en la dirección positiva a lo largo del eje VC respectivo. Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), Playa Fracasso (PFR), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES). .....47

**Figura 15.** Dendrograma de distancia de formas entre localidades de *C. angulatus* construido a partir de la distancia de Mahalanobis y el método de agrupamiento UPGMA. Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), Playa Fracasso (PFR), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES).....48

**Figura 16.** Análisis discriminante de variables canónicas que agrupa las variaciones de formas en diferentes hábitats, con elipses de confianza de la media de 0,95. Los gráficos de *wireframe* indican los cambios de forma para cada grupo de hábitat y contienen el factor de escala predeterminado de 10 unidades de distancia de Procrustes. ....49

**Figura 17.** Diagramas de dispersión que indican las relaciones entre: A) distancias de Mahalanobis e índice de diferenciación genética B) distancia de Mahalanobis y distancia geográfica de *Cyrtograpsus angulatus*. .....50

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Sitios de muestreo, hábitat asociado y tamaño de la muestra para cada tipo de análisis. ....	16
<b>Tabla 2.</b> Índices de diversidad genética para <i>C. angulatus</i> a partir de una región parcial del gen mitocondrial ARNr 16s. n, número de especímenes analizados; S, número de sitios polimórficos; H, número de haplotipos; Hd, diversidad haplotípica; k, número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi, diversidad nucleotídica y D, D de Tajima.....	32
<b>Tabla 3.</b> Índices de diversidad genética para <i>C. angulatus</i> a partir de una región parcial del gen mitocondrial COXI. n, número de especímenes analizados; S, número de sitios polimórficos; H, número de haplotipos; Hd, diversidad haplotípica; k, número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi, diversidad nucleotídica y D, D de Tajima.....	35
<b>Tabla 4.</b> Prueba del estadístico análogo del Fst a partir de una región parcial del gen mitocondrial COXI. Nivel de significancia estadística: $p > 0,05$ (no significativo); (*) $p < 0,05$ , (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$ . ....	38
<b>Tabla 6.</b> Procrustes ANOVA para el componente de forma simétrica del carapacho con una variable categórica (localidad) y las interacciones entre las muestras originales (individuo) y réplica (lado). Los valores significativos se indican con (***) y corresponde a $p < 0,001$ . ....	42
<b>Tabla 7.</b> Distancias de Mahalanobis entre las localidades de estudio. Los valores significativos se indican con (***) y corresponden a $p < 0,001$ . ....	46
<b>Tabla S1.</b> Prueba de saturación de sustitución para las regiones parciales de los genes: a) <i>C. angulatus</i> ARNr 16s, b) Género <i>Cyrtograpsus</i> y b) <i>C. angulatus</i> COXI, efectuada en DAMBE. NumOTU = número de subconjunto de secuencias, Iss = índice simple de saturación de sustitución, Iss.cSym = índice crítico de saturación de sustitución suponiendo una topología de árbol simétrica, Iss.cAsym = índice crítico de saturación de sustitución suponiendo una topología de árbol asimétrica, T = valor t, DF = grados de libertad, p = p - valor.....	74



## 1. Resumen

La variabilidad genética y fenotípica poblacional de los organismos marinos y de agua dulce depende de interacciones complejas entre la historia evolutiva, la biología y el ambiente. El cangrejo *Cyrtograpsus angulatus* (Varunidae) soporta un amplio rango de temperatura y salinidad, ocupa hábitats diversos y tiene desarrollo indirecto, siendo un buen modelo para investigar el efecto de los factores ambientales y de la historia de vida en su variabilidad genética y morfométrica. El objetivo general de este seminario es estudiar la genética poblacional y los patrones de variabilidad en la forma del carapacho del cangrejo *C. angulatus* a lo largo del Atlántico Sudoccidental. Para ello, se colectaron 120 ejemplares provenientes de seis localidades. Luego, se extrajo el ADN genómico y se amplificaron regiones parciales de los genes mitocondriales, ARNr 16s (N=16 de tres localidades) y COXI (N=50, 10 ejemplares por localidad). Para los análisis morfométricos se digitalizaron 20 ejemplares por localidad utilizando una configuración de 19 *landmarks* y 21 *semilandmarks*. Las diversidades haplotídicas y nucleotídicas globales obtenidas a partir de una región parcial del gen ARNr 16s fueron bajas ( $H_d = 0,24$ ,  $P_i = 0,0005$ ) y la red de haplotipos incluyó tres haplotipos, de los cuales dos estuvieron representados una única vez. El gen 16s fue útil para diferenciar entre las dos especies del género *Cyrtograpsus*, pero no para estudiar la variabilidad poblacional. La distancia genética interespecífica entre *C. angulatus* y las otras dos especies putativas del género, *C. altimanus* y *C. affinis*, fue de 5,1 - 5,4%, correspondiendo a valores típicos de variabilidad interespecífica y entre estas últimas fue de 0,1%, dando soporte a que pertenecen a la misma especie. Las diversidades haplotídicas y nucleotídicas globales obtenidas a partir de una región parcial del gen COXI fueron altas ( $H_d = 0,92$ ,  $P_i = 0,0096$ ). La distancia genética intraespecífica, dentro de las poblaciones, estuvo en el rango de 0,2-0,8% e interespecífica, entre las poblaciones, <1,1%, correspondiendo a valores típicos de variabilidad dentro de la especie. El número de sitios polimórficos disminuyó de norte a sur, la diversidad nucleotídica y el número de diferencias nucleotídicas presentaron valores mayores en Mar Chiquita, y luego disminuyeron hacia el norte y hacia el sur, y la diversidad haplotídica fue alta y

similar en todas las localidades. En la red de haplotipos del COXI se observaron 22 haplotipos, de los cuales 17 de ellos estuvieron representados sólo una vez. Los Fst pareados indicaron una diferenciación genética significativa entre pares de localidades, excepto entre Montevideo con Mar Chiquita, y Mar Chiquita con Carmen de Patagones. No se encontró evidencia de que la diferenciación genética de *C. angulatus* utilizando el gen COXI refleje un aislamiento por distancia. Los resultados del AMOVA agrupando a las poblaciones en diferentes grupos a priori: (1) Provincia Magallánica y Argentina, (2) Río de la Plata como barrera al flujo génico y (3) Tipo de hábitat, mostraron una falta de estructura genética en esta especie. El análisis morfométrico sugirió que existe un efecto de la localidad y del hábitat de dónde provienen los individuos. Estos resultados podrían estar asociados a fenómenos oceanográficos y/o geológicos, los cuales estarían disminuyendo el flujo genético entre las poblaciones. Por otro lado, se detectó una menor varianza fenotípica entre las poblaciones de localidades marinas, que entre las de río y estuario, sugiriendo que la forma del carapacho de las poblaciones marinas estaría canalizada. No se encontró una correspondencia entre los índices de diferenciación genética y morfométrica. Asimismo, se observó una similitud tanto genética como morfométrica entre las localidades del norte, mientras que las localidades del sur fueron las más divergentes. Finalmente, se concluye que la conectividad entre las poblaciones del cangrejo de las rocas, *C. angulatus*, no se puede predecir sólo a partir de su historia de vida, sino que existen otros factores, como por ejemplo, las condiciones ambientales, oceanográficas o la historia geológica, las cuales moldearon y moldean su diferenciación genética y morfométrica. Futuros estudios que incluyan un mayor tamaño muestral, localidades más próximas y/o que incluyan otros genes de tasas de evolución más altas y reloj molecular, ayudarían a mejorar la comprensión de los factores que influyen e influyeron en la diversidad genética e historia evolutiva de esta especie.

## 2. Introducción

La variabilidad de los organismos ha sido motivo de interés para los filósofos naturalistas desde tiempos antiguos. Charles Darwin fue uno de los primeros naturalistas en cuantificar los patrones de variación de los organismos lo cual le aportó evidencia empírica para su teoría evolutiva. Posteriormente, dos de los fundadores del neodarwinismo, Ernest Mayr (1963) y Sewall Wrigth (1968), pensaron que la variación genética inter e intraespecífica era un concepto central en evolución. Los líderes de la síntesis evolutiva han sostenido que casi todas las características de los organismos son adaptativas y que han evolucionado por selección natural (Futuyma & Kirkpatrick, 2017). Pero este principio fue desafiado por la teoría neutral de la evolución molecular, desarrollada por Kimura (1983), quien argumentó que la mayor parte de la evolución de las secuencias de ADN se produce por azar (deriva genética) y no por selección natural. La teoría neutral hace un buen trabajo al explicar por qué las partes del genoma que experimentan poca o ninguna selección purificadora evolucionan tan rápido. Sin embargo, actualmente existe evidencia de que la evolución adaptativa es mucho más importante para la evolución molecular de lo que creía Kimura. Como Kimura anteriormente observó, en algunos organismos, la mitad de las diferencias de aminoácidos entre especies estrechamente relacionadas resultan de la selección positiva en lugar de la deriva génica (Charlesworth & Eyre-Walker, 2006; Keightley & Eyre-Walker, 2012). Actualmente, el estudio de la capacidad de las poblaciones de adaptarse a ambientes locales es una cuestión fundamental en el campo de la biología (Postma & Noordwijk, 2005).



Los organismos marinos y de agua dulce con una fase larvaria larga tienen una alta potencialidad de dispersión, lo que promueve el intercambio de individuos y genes entre diferentes regiones geográficas, resultando en una baja divergencia genética a lo largo de su distribución (Palumbi, 1994; Spivak & Schubart, 2003). Sin embargo, las características oceanográficas como las grandes corrientes, los frentes oceánicos, los remolinos o “*eddies*”, las barreras geográficas (Paula *et al.*, 2001), los rasgos de la historia de vida, tales como, la duración de la vida larval y la adaptación local (Riginos & Nachman, 2001), pueden afectar considerablemente el flujo génico de los organismos marinos (Neethling *et al.*, 2008). En varias especies de crustáceos decápodos con larva planctónica, se ha registrado estructura genética a lo largo de su distribución incluso entre sitios geográficamente cercanos (Fratini & Vannini, 2002; Gopurenko & Hughes, 2002). En este sentido, recientemente, estudios moleculares sugieren que puede existir cierto nivel de endemismo local en poblaciones de cangrejos, llevando a una restricción en el flujo génico y consiguiente estructura genética, incluso en especies marinas con alto potencial de dispersión (Klautau *et al.*, 1999; Fratini & Vannini, 2002). Una barrera geográfica a lo largo de la distribución, como puede ser un río, podría llevar a la acumulación de variaciones por diferentes presiones selectivas en los acervos genéticos locales, resultando en una divergencia genética significativa entre poblaciones de cangrejos que poseen larvas planctónicas (Palumbi, 1994). Por lo tanto, la distribución de la variación genética de las poblaciones en el espacio y tiempo, no dependería solamente de la capacidad de dispersión, sino que está determinada por las características del paisaje, historia de vida y los procesos microevolutivos asociados (Garrido *et al.*, 2013).

En crustáceos decápodos, la diversidad genética no siempre se ha reflejado en los patrones de diversidad morfológica (Brian *et al.*, 2006). En general, se ha sugerido que los cambios morfométricos son el resultado de una plasticidad fenotípica producto de la heterogeneidad ambiental. Por ejemplo, se ha estudiado la influencia de la latitud (Orensanz *et al.*, 2007), salinidad del agua (es decir, poblaciones de estuario frente a poblaciones de agua dulce (Mashiko, 2000), diferentes niveles de depredación, disponibilidad de alimentos (Hines, 1989) y tipo de hábitat (Idaszkin *et al.*, 2013; Márquez & Idaszkin, 2021) sobre la morfología de distintas especies. Sin embargo, la relación entre la forma del carapacho, las condiciones ambientales y los factores genéticos es poco conocida (Giri & Loy, 2008; Barría *et al.*, 2011).



El cangrejo de las rocas, *Cyrtograpsus angulatus* (Dana, 1851) es un buen modelo para estudiar cómo los factores ambientales y la historia de vida afectan la variabilidad genética y morfológica de las poblaciones. Esta especie es eurihalina, habita en intermareales y submareales poco profundos, marismas y estuarios, de fondos blandos y rocosos (Spivak, 1999). Su distribución se extiende de sur a norte desde Puerto Deseado (Argentina) (47° 44' 57,12" S, 65° 51' 6,77" O) hasta Río de Janeiro, Brasil (22° 54' 29,88" S – 43° 11' 49,48" O) en el Océano Atlántico (Boschi, 1964), y en el Océano Pacífico desde las costas de Chile (36° 43' S) hasta la Isla San Lorenzo, Perú (12° 4' 40,67" S, 77° 14' 3,30" O) (Retamal, 1981). Su distribución geográfica es extensa y abarca un amplio rango latitudinal, que incluye la presencia de potenciales barreras al flujo génico (e.g., Río de la Plata), así como también ambientes muy heterogéneos y con amplios rangos de temperatura. Esta especie presenta desarrollo indirecto con larva planctónica y etapa larval extendida (60-90 días, Dellatorre *et al.*, 2013). La eclosión de las larvas ocurre de forma coordinada por señales químicas en zonas con salinidades moderadas cercanas a las costas, como estuarios y migran con ayuda de las mareas altas hacia el mar abierto. Luego, la larva megalopa regresa a las zonas oligohalinas de aguas salobres o dulces como estuarios y marismas hasta completar su metamorfosis (Spivak, 1999). La formación de frentes de masas de agua con diferentes características físico-químicas (e.g. temperatura, salinidad, turbidez) funcionan como una barrera para huevos y larvas (Sinclair & Iles, 1989). El Río de la Plata, ubicado entre Uruguay y Argentina, genera un gran flujo de agua dulce desde el estuario hacia el mar costero, y constituye una barrera potencial para muchos taxones que exhiben una dispersión larvaria planctónica, como es el caso de *C. angulatus*. Sin embargo, aún no existen evidencias de que el Río de la Plata constituya una barrera al flujo génico de esta especie.

Los estudios genéticos previos en el grupo se limitan a la posición filogenética del género (Schubart *et al.*, 2001) y a la relación entre las especies putativas, *C. affinis* y *C. altimanus* (Spivak & Schubart, 2003). Asimismo, Idaszkin y colaboradores (2013) señalan diferencias en la forma del carapacho en *C. angulatus*, ya sea entre sexos o en diferentes hábitats (marismas versus costas rocosas). Sin embargo, no existe en particular ningún estudio que investigue la diversidad poblacional de *C. angulatus* asociada a distintos factores ambientales e historias de vida utilizando herramientas moleculares y morfométricas a lo largo de un gradiente latitudinal. La presente tesis de grado contribuye a completar este vacío de información a través del desarrollo del siguiente objetivo general y sus respectivos objetivos particulares:

### **3. Objetivo general**

Estudiar la genética poblacional y los patrones de variabilidad en la forma del carapacho del cangrejo *Cyrtograpsus angulatus* a lo largo de un gradiente latitudinal en el Atlántico Sudoccidental, y determinar si las diferencias morfológicas encontradas se asocian a variaciones genéticas y/o a una influencia ambiental.

#### **3.1 Objetivos particulares**

1. Estudiar la diversidad y estructura genética de *C. angulatus* utilizando regiones parciales de los marcadores mitocondriales citocromo oxidasa I (COXI) y la subunidad 16s del ARN ribosómico a lo largo de su distribución en el Atlántico Sudoccidental, y establecer cuál es su relación con las potenciales barreras al flujo génico entre sus poblaciones.
2. Estudiar el espectro de variación de la forma del carapacho de distintas localidades con ambientes contrastantes (río, estuario y mar) utilizando herramientas de morfometría geométrica.
3. Determinar si los patrones de diversidad morfológica encontrados de la forma del carapacho de *C. angulatus* se corresponden con los patrones genéticos.



#### 4. Hipótesis/ Predicciones

**Hipótesis 1:** La diferenciación genética de *C. angulatus* refleja un aislamiento por distancia.

**Predicción 1:** Las poblaciones de *C. angulatus* ubicadas a mayor distancia geográfica entre sí presentan mayor diferenciación genética.

**Hipótesis 2** El patrón de variación en la forma del carapacho refleja las diferencias entre los hábitats a los cual pertenece.

**Predicción 2:** Las distancias morfométricas entre hábitats similares son menores respecto a los hábitats contrastantes, independientemente de la distancia geográfica entre estos.

**Hipótesis 3:** La conectividad genética entre las localidades no refleja la variación morfométrica encontrada entre ellas, por lo tanto, los patrones de variación morfométrica y genéticas son independientes.

**Predicción 3:** Las distancias morfométricas y genéticas no están correlacionadas.

#### 5. Metodología

##### 5.1 Obtención de muestras

Se recolectaron 120 ejemplares machos de *C. angulatus* de seis localidades a lo largo de su distribución en el Atlántico Sudoccidental y ambientes aledaños: (1) Montevideo (Uruguay); (2) Mar Chiquita (Buenos Aires); (3) Carmen de Patagones (Río Negro); (4) Playa Fracasso (Chubut); (5) 28 de Julio (Río Chubut); (6) Puerto Deseado (Santa Cruz) (**Figura 1; Tabla 1**). Se seleccionaron únicamente individuos machos con el fin de anular diferencias debidas al dimorfismo sexual previamente señalado por Idaszkin y colaboradores (2013). La talla de los machos seleccionados se halló entre 6,63-48,90 mm de largo entre la región rostral y el borde posterior del carapacho, y entre 8,43-62,54 mm de ancho de la tercera espina. Para el muestreo se utilizó una trampa con carnada, la cual se dejó aproximadamente una hora en el sitio hasta proceder a recolectarla. En los lugares donde los cangrejos se podían recolectar manualmente del intermareal, no se utilizó la trampa. Una vez colectados,

Handwritten signatures in blue ink at the top of the page.

los ejemplares fueron conservados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . En el laboratorio se procedió a disecar el carapacho del resto del cuerpo y se tomaron fragmentos de tejido muscular de uno o dos pereiópodos, dependiendo del tamaño del animal, para realizar los análisis genéticos. El carapacho se lavó y se dejó secar, mientras que el tejido muscular fue conservado en alcohol etílico 96% hasta su posterior utilización.



**Figura 1.** Localización de las muestras de *C. angulatus*. Las localidades para un mismo tipo de hábitat están representadas con un mismo color. A: Montevideo (MON); B: Mar Chiquita (MCH); C: Carmen de Patagones (CDP); D: Playa Fracasso (PFR); E: 28 de Julio (VDJ) y F: Puerto Deseado (DES).

**Tabla 1.** Sitios de muestreo, hábitat asociado y tamaño de la muestra para cada tipo de análisis.

Localidad	ID	Latitud / Longitud	Hábitat	Secuencias (n)		
				ARNr 16s	COXI	Morfometría geométrica
Montevideo	MON	34° 54' 21" S / 56° 11' 28" O	Estuario	3	10	20
Mar Chiquita	MCH	37° 44' 46" S / 57° 25' 37" O	Estuario	-	10	20
Carmen de Patagones	CDP	40° 47' 53" S / 62° 58' 49" O	Río	-	10	21
Playa Fracasso	PFR	42° 25' 46" S / 64° 07' 19" O	Mar	-	-	20
28 de Julio	VDJ	43° 23' 26" S / 65° 50' 22" O	Río	8	10	20
Puerto Deseado	DES	47° 45' 05" S / 65° 54' 04" O	Mar	5	10	19
Total				16	50	120



## 5.2 Descripción de los sitios de estudio

### *Montevideo (Departamento de Montevideo, Uruguay)*

Las costas del departamento de Montevideo son consideradas zonas de aguas salobres. En Montevideo, la temperatura promedio superficial del agua en verano es de 26,8 °C y en invierno de 10,4 °C (Pedroza, 2017). La salinidad varía según las mareas, vientos y aportes de agua dulce de la cuenca del Río de la Plata y registra valores mínimos en otoño-invierno y máximos en verano (Nagy *et al.*, 1997). La profundidad a 1 km de las costas de la bahía de Montevideo es de 5 m, frente a la bahía existen canales de 15 m de profundidad y por fuera de la zona portuaria la profundidad no supera los 2 m (Gautreau, 2016). Los sedimentos del área estuarina de Montevideo tienen una predominancia de fracciones finas, siendo el 11% arcilla, 80% limo y 5% arena (Rodríguez *et al.*, 2002).

### *Mar Chiquita (Provincia de Buenos Aires, Argentina)*

La albufera de Mar Chiquita está situada al sudoeste de Buenos Aires. Es una laguna salobre poco profunda y está conectada al mar por un canal de 5 km de longitud y 200 m de ancho. La temperatura del agua varía entre 25,5 °C en verano y 8 °C en invierno (Fasano *et al.*, 1982). El gradiente de salinidad de la laguna varía entre 34 ups cerca de la boca, 22 ups en la zona media y 3-4 ups en la desembocadura de afluentes como arroyos y canales (De Marco *et al.*, 2014). El agua de mar ingresa a la laguna con las mareas altas semidiurnas y la mayor intensidad de los vientos es del SE (Olivier *et al.*, 1972). La profundidad media varía de los 0,8 a 1,5 m (Fasano, *et al.*, 1982).

### *Carmen de Patagones, Río Negro (Provincia de Buenos Aires)*

La cuenca del Río Negro conforma el límite natural entre la provincia de Río Negro y Buenos Aires. El río se origina por la confluencia de los Ríos Neuquén y Limay en la región occidental. La temperatura del agua superficial en la desembocadura varía entre 22,9 °C en verano y 7,9 °C en invierno (Vélez-Agudelo, 2021). La salinidad en la región del estuario varía entre 0-30 ups durante un ciclo diario, y con una profundidad de 6 m se estratifica hasta 10 ups durante la bajamar, siendo más salino

en la profundidad que en la superficie (Isla *et al.*, 2010). La cuña salina ingresa hasta aproximadamente 20 km desde la desembocadura (Perillo, 1995). Por lo que, en la localidad de Carmen de Patagones, ubicada a 30 km de la desembocadura, no presenta valores de salinidad detectables (Vélez-Agudelo, 2021). Sin embargo, se debe considerar que los efectos físicos de las mareas son transferidos aguas arriba hasta 70 km desde la desembocadura (D'Onofrio *et al.*, 2010). La desembocadura está constituida por un conjunto de islotes bajos y dos bancos de arena fina, surcados por una interconexión de canales de marea. Estos dos bancos de arena conforman un delta de reflujos invertido. La pendiente del río es de 0,023 m/km entre Viedma y la desembocadura. La desembocadura no posee cono de deyección o abanico aluvial dado que las corrientes marinas que ingresan al río a partir del régimen de las mareas son las encargadas de "barrerlo". Las regiones aguas arriba presentan una densa cobertura vegetal de juncáceas, asociadas a invertebrados marinos y sólo son cubiertas totalmente durante pleamares con sudestadas (D'Onofrio, 2010).

#### *Playa Fracasso (Provincia de Chubut, Argentina)*

Playa Fracasso es una costa abierta ubicada el sureste del Golfo San José en la Península Valdés. La temperatura superficial del agua varía entre 16,5 °C en verano y 9,8 °C en invierno, y la salinidad presenta poca variación, siendo en promedio de 33,82 ups. Esta playa presenta sedimentos compuestos por arenas de granulometría media y fina, con fondos barrocos y rocosos. Presenta marismas en los niveles altos del intermareal asociados a plantas del género *Sarcocornia perennis* conformando un humedal costero, y en los laterales se encuentra el intermareal rocoso (Schwindt *et al.*, 2009), el cual fue uno de los sitios de estudio.

#### *28 de Julio (Provincia de Chubut, Argentina)*

El Río Chubut se origina en la Cordillera de los Andes en las provincias de Chubut y Río Negro, atraviesa una estepa semiárida con importantes variaciones en temperatura y precipitación y continúa hasta su desembocadura en el Océano Atlántico. A mitad de su curso, se encuentra la represa Florentino Ameghino. A lo largo del Valle inferior del Río Chubut (VIRCH) la temperatura superficial del agua es de 18,5 °C en verano y 7,9 °C en invierno (Vélez Agudelo, 2019). En particular, 28 de



Julio presenta una temperatura media superficial del agua de 8 a 18,1 °C, con valores mínimos en mayo y máximos en febrero (Miserendino & Archangelsky, 2006). La región estuarial comprende unos 4,5 km antes de su desembocadura (Perillo *et al.*, 1989) y la influencia de las mareas puede ser detectada hasta 10 km aguas arriba de la desembocadura del río, por lo que la localidad de 28 de Julio, ubicada a 112 km de la desembocadura, no presenta niveles de salinidad detectables. En el estuario inferior la salinidad puede variar en un ciclo de mareas de 0-10 ups en condiciones fluviales, y de 25-35 ups en condiciones marinas (Santinelli *et al.*, 2005). El material del lecho del río se compone de arenas medias, mientras que las márgenes presentan arenas limosas o arcillosas y sectores de limos y arcilla (Kaless, *et al.*, 2008). Con el transcurso del tiempo, el Río Chubut fue modificando su aporte de arenas finas debido al cambio en la deposición de su cauce como consecuencia de la construcción del Dique Florentino Ameghino y de las escolleras norte y sur, en posición perpendicular a la costa, restingas cuya acción erosiva genera una barrera al transporte de sedimentos (Beltrán, 2016).

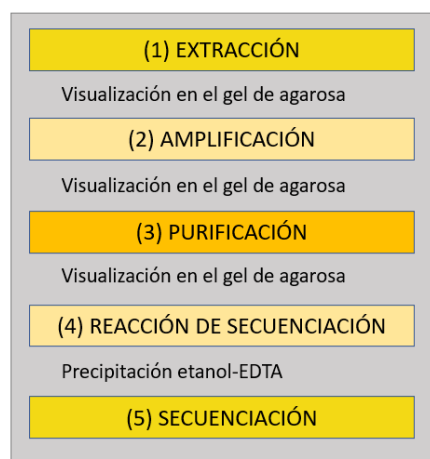
#### *Puerto Deseado (Provincia de Santa Cruz)*

El Río Deseado atraviesa la localidad de Puerto Deseado hasta su desembocadura en el Océano Atlántico. Su estuario es de tipo ría, es decir, está formado por un valle fluvial inundado sobre una costa acantilada (Perillo, 1995). El río recibe sólo bajos caudales de los Ríos Fénix y Pinturas debido a que la mayor parte se pierde por infiltración. La temperatura superficial del agua es de 13,5 °C en verano y 4,5 °C en invierno (Kuhneman, 1969). La salinidad aumenta con la profundidad, desde 33,6 a 34 ups, y es mayor en verano en el margen central de la ría (Isla *et al.*, 2004). Durante la pleamar la cuña salina puede alcanzar 40 km hacia el interior del río (Isla *et al.*, 2004). La composición granulométrica de la región supramareal son bancos de arenas gravosas, limos a arenas muy finas y de fondo y, además, se pueden observar áreas fangosas con sectores de arenas muy gruesas (Isla *et al.*, 2004).



### 5.3 Obtención de ADN y secuenciación

La secuencia de pasos para la obtención de ADN incluyó las siguientes etapas (**Figura 2**): extracción del ADN genómico y amplificación, purificación y secuenciación del fragmento mitocondrial de interés. La extracción de ADN se realizó a partir de tejido muscular de los pereiópodos, utilizando el protocolo de sales (Aljanabi & Martínez, 1997). Se amplificaron y secuenciaron regiones parciales de dos genes mitocondriales (ARNr 16s y COXI). El gen ARNr 16s se amplificó utilizando los iniciadores 16sbr-H-F y 16sar-L-R (Palumbi *et al.*, 1991) y la subunidad I del citocromo c oxidasa a partir de los iniciadores universales LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Para amplificar los genes se utilizó la enzima Taq polimerasa (Bio Básica Inc., Canadá). El protocolo incluyó una temperatura inicial de desnaturalización de 95 °C durante 5 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 45 s, una temperatura de unión (“*annealing*”) de los iniciadores de 52 °C durante 1 min para el 16s, y 45°C para el COXI, 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Luego de la extracción y de la amplificación, el ADN se visualizó mediante transiluminación UV en geles de agarosa al 1% teñidos con gel verde (“*gel green*”, BIOTUM). Las extracciones y amplificaciones de ADN de las muestras se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular (LABSA, IDEAus). La purificación y secuenciación Sanger de los fragmentos de ADN se realizaron en Macrogen Korea.



**Figura 2.** Protocolo utilizado para la obtención de ADN.



#### 5.4 Análisis genéticos

Las secuencias de ADN fueron editadas utilizando CodonCode Aligner v.2.0.4 (CodonCode Dedham, MA). Las secuencias “*forward*” y “*reverse*” de cada ejemplar en formato fasta, fueron ensambladas formando lo que se denomina “*Contig*”. Luego, los extremos de cada secuencia consenso fueron recortados para eliminar las lecturas de mala calidad. Asimismo, cada base con alguna duda fue revisada en particular observándose la calidad y altura del pico del cromatograma correspondiente, antes de decidir qué base era la correcta. Por último, se alinearon todas las secuencias con Clustal X y los parámetros por defecto (Thompson *et al.*, 1997) y ante cualquier duda en alguna base, las secuencias se compararon a nivel poblacional analizando la calidad y altura del pico de lectura en los cromatogramas.

Antes de realizar los análisis, se efectuó una prueba de saturación en la matriz de las secuencias mitocondriales (Xia & Lemey, 2009) utilizando DAMBE v5 (Xia, 2013). A pesar de que este test es utilizado comúnmente en análisis filogenéticos, es interesante igualmente comprobar, antes de realizar cualquier análisis, si las matrices utilizadas tienen un grado alto de saturación. Los marcadores mitocondriales de genes codificantes poseen tasas de evolución más rápidas en la tercera posición del codón; debido a esto, se analizó si existía mayor saturación de sustituciones y si las transversiones superaban en número a las transiciones, lo cual implicaría en un caso extremo, cuando las secuencias han experimentado una saturación completa una menor divergencia entre las secuencias (Xia, 2000). Cuando las secuencias en un alineamiento múltiple han sufrido tantas sustituciones múltiples que las distancias aparentes subestiman en gran medida las distancias genéticas reales, se dice que el alineamiento está saturado (Philippe *et al.*, 2011). Las secuencias con una alta tasa de saturación en las sustituciones son de poca utilidad para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas, porque toda la información histórica codificada en las secuencias de nucleótidos se habría sobrescrito varias veces. Es decir, se llega al grado en que dos secuencias saturadas son parecidas simplemente por azar (Xia & Lemey, 2009). Se empleó el cálculo de un índice de saturación de sustitución de nucleótidos basado en la entropía de Xia *et al.*, (2003). Este test prueba si la entropía observada en las secuencias es significativamente menor que la entropía de “saturación de sustitución total”. La relación entre la entropía observada y la entropía



de la saturación de sustitución total es el índice de saturación de sustitución (Iss). Cuando Iss se acerca a 1, las secuencias experimentaron un grado alto de saturación en las sustituciones. El índice Iss se compara con el valor crítico Iss.c, el cual es extraído de simulaciones en el que las secuencias comenzarán a fallar para recuperar su orden de nucleótidos verdadero. Iss.c depende de N (número de secuencias alineadas), L (longitud de la secuencia), y la topología del árbol filogenético. Los valores de Iss.c más grandes están asociados con topologías más simétricas de la filogenia. Luego, si Iss es mayor que Iss.c, entonces se concluiría que las secuencias han experimentado una alta saturación en sus sustituciones y no deben utilizarse para una reconstrucción filogenética (Xia & Lemey, 2009). Mientras que, si el Iss observado es significativamente menor que Iss.c, se concluye que la saturación en las sustituciones es baja.

La variación genética del ADN mitocondrial (ARNr 16s y COXI) se estimó a través de índices de diversidad tales como el número de sitios polimórficos (S, número de posiciones en un conjunto de secuencias alineadas, donde se puede observar al menos una mutación), número promedio de diferencias nucleotídicas (k), el número de haplotipos (H, dos secuencias de ADN diferentes en al menos 1 posición), la diversidad haplotídica ( $H_d$ , medida como la probabilidad de que dos secuencias/haplotipos de ADN tomadas al azar sean diferentes) y diversidad nucleotídica ( $P_i$ , calculada como el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias de ADN tomadas al azar), utilizando para ello el software DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). Se utilizó el mismo software para realizar la prueba D de Tajima (Tajima, 1989). El estimador D (Tajima, 1989) se utiliza principalmente para determinar, dentro de una especie, la existencia de selección natural en corto tiempo o expansión poblacional, bajo los supuestos de una población panmíctica y un tamaño poblacional constante. Para la construcción de este índice es necesario obtener la diferencia entre el estimador del número promedio de nucleótidos segregantes (polimórficos) por sitio ( $\theta_w$ ) y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias por sitio ( $\theta_t$ ). El modelo nulo de neutralidad está basado en una tasa de mutación constante selectivamente neutral a lo largo del tiempo (Kimura, 1983), el modelo de sitios infinitos, el modelo Fisher-Wright, la ausencia de generaciones solapantes y una población panmíctica con un equilibrio entre



mutaciones y deriva genética. En este caso, el valor del estimador es  $D=0$ . De forma alternativa, si  $D<0$ , indicaría que hay un mayor número de sitios polimórficos entre individuos probablemente debido a una selección equilibradora mantenida a largo plazo, reciente expansión poblacional o mezcla de individuos de varias subpoblaciones diferentes. Si  $D>0$ , indicaría que la diversidad de nucleótidos depende de los alelos de mayor frecuencia, es decir, está actuando la selección positiva, ocurrió una reciente disminución de la población, o la fusión de poblaciones muy distantes (Rozas *et al.*, 2017).

Los niveles de diferenciación genética entre las poblaciones fueron estimados con el análogo de  $F_{ST}$  ( $\Phi_{st}$ ; Excoffier *et al.*, 1992) en Arlequin versión 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010). El análogo del  $F_{st}$  es un índice que permite comparar el grado de variación genética entre pares de subpoblaciones, utilizando todas las combinaciones de subpoblaciones posibles, bajo el supuesto de que existe una distribución aleatoria de los individuos entre pares de poblaciones (Goudet *et al.*, 1996). Se obtiene a partir del coeficiente estimado de la varianza de las diferencias de las secuencias de nucleótidos entre las poblaciones sobre la varianza total estimada, así como la frecuencia de los haplotipos en cada población (Michalakis & Excoffier, 1996). Para poblaciones panmícticas, la población y las subpoblaciones tendrán un valor de  $\Phi_{st}$  igual o cercano a cero. En caso contrario, las poblaciones tendrán una mayor variación genética respecto a la población total, por lo que el valor de  $\Phi_{st}$  presentará valores positivos cercanos a 1, es decir, las poblaciones estarán altamente diferenciadas (Hedrick, 2005).



Se construyeron redes de haplotipos de regiones parciales de los genes ARNr 16s y COXI utilizando el método de máxima parsimonia y el algoritmo *median joining* (Bandelt *et al.*, 1999) en Network 4.6.1 (Polzin & Daneschmand, 2003), con los parámetros por defecto. Se utilizó el método MJ en lugar del método de red de mediana reducida, debido a que MJ es aplicable a caracteres multiestado (por ejemplo, secuencias de aminoácidos) y, además, requiere de menor esfuerzo computacional (Bandelt *et al.*, 1999). El método MJ permite construir redes a partir de datos genéticos poblacionales sin recombinación junto con el algoritmo heurístico de máxima parsimonia (MP), que agrega secuencialmente nuevos “vectores medianos”. Un vector mediano es una secuencia hipotética, comúnmente ancestral, necesario para conectar dentro de la red a tres secuencias mutuamente cercanas. Estos vectores medianos pueden ser biológicamente interpretados como secuencias no muestreadas posiblemente existentes o secuencias ancestrales extintas. Cada vector permite establecer la conexión más corta entre el conjunto de secuencias utilizando el parámetro  $\epsilon$ . El parámetro  $\epsilon$  especifica una distancia genética ponderada a las secuencias conocidas. A partir de esto, se obtiene una red cuasimediana que normalmente alberga todos los árboles de MP, así como numerosos árboles subóptimos (Forster, 2020). En este estudio, se estableció un valor de  $\epsilon$  cero, no se realizó un pre-procesamiento a los datos (*start contraction*) y tampoco, un post-procesamiento (cálculo de MP) debido a que la red obtenida fue relativamente sencilla.

Las redes de haplotipos son representaciones gráficas de relaciones filogenéticas entre individuos utilizando un conjunto de variaciones en el ADN que son heredadas en bloque. Estas redes permiten visualizar las relaciones de parentesco de la historia de eventos mutacionales que coalescen hacia el ancestro común más reciente, y determinar el área geográfica de una especie. En el ADN mitocondrial, un haplotipo común entre individuos, indicará que todos esos individuos están relacionados por la misma línea materna, excepto que surjan nuevos eventos mutacionales o heteroplasmias (Vázquez-Domínguez, *et al.*, 2009).



Por otro lado, se realizó un Test de Mantel para comparar las distancias genéticas (estimadas previamente con el estadístico análogo del  $F_{st}$ ), y las distancias geográficas, medidas con base en la distancia euclidiana -distancia lineal entre dos puntos, obtenidas con el programa QGIS-, para evaluar los procesos espaciales que impulsan la estructura de la población. Se probó si la diferencia entre las matrices era estadísticamente significativa utilizando simulaciones de Monte Carlo y un valor-p con un nivel de significación  $\alpha=0,05$  (Diniz-Filho *et al.*, 2013). La versión estandarizada de la prueba de Mantel corresponde a la correlación de Pearson  $r$  entre los elementos estandarizados de las matrices. Este índice se denomina coeficiente de correlación de Mantel  $r$  (Diniz-Filho *et al.*, 2013). Los valores del índice cercanos a 1 indican que un aumento en la distancia geográfica entre las poblaciones está relacionado con un aumento en las distancias genéticas entre estas. Los valores del índice cercanos a  $-1$  indican el patrón opuesto, y valores cercanos a cero indican que no existe relación entre las dos matrices.

Se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) utilizando Arlequín 3.5 para evaluar la distribución de varianza dentro y entre grupos definidos en base a potenciales barreras al flujo génico. Las hipótesis a priori fueron: (1) Provincia Biogeográfica Argentina (Montevideo, Mar Chiquita y Carmen de Patagones) versus Provincia Magallánica (28 de Julio, Puerto Deseado), (2) Montevideo versus resto de las localidades, (3) Tipo de hábitat: Montevideo y Mar Chiquita versus Carmen de Patagones y 28 de Julio versus Puerto Deseado, con el fin de determinar posibles barreras al flujo génico. Para esto, se calcularon tres índices de fijación que describen la variación genética: entre grupos (FCT), entre poblaciones dentro de los grupos (FSC) y dentro de las poblaciones (FST). La importancia de los componentes de covarianza asociados con los diferentes niveles posibles de estructura genética (dentro de las poblaciones, dentro de grupos de poblaciones, entre grupos) se probó utilizando un test de permutación no paramétrico (Excoffier *et al.*, 1992). Los niveles de significación se basaron en 1000 permutaciones para estimar el error estándar del valor-p.



Por último, con el fin de explorar las relaciones entre las especies del género *Cyrtograpsus* y las dos especies putativas: *C. affinis* y *C. altimanus*, se calcularon las distancias genéticas y se construyó una red de haplotipos a partir de la matriz de la región parcial del gen ARNr 16s utilizando el método *p-distance* con MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). La matriz de 476 pb incluyó 22 secuencias parciales del gen ARNr 16s, 17 de *C. angulatus*, 16 secuencias propias y una disponible en Genbank, 3 de *C. affinis* y 2 de *C. altimanus*. De las dos últimas especies, se utilizaron secuencias disponibles de GenBank (AJ130801, Schubart *et al.*, 2000; AJ487318, AJ487319 y AJ278836, Spivak & Schubart, 2003, respectivamente).

### 5.5 Análisis morfométricos

La morfometría geométrica puede ser definida como la unión entre la biología y la geometría y su utilización permite caracterizar la forma de los organismos, independiente de la variación en su tamaño. Una de las principales ventajas con respecto a la morfometría tradicional es que no hay pérdida de información geométrica a lo largo de los análisis estadísticos multivariantes, permitiendo por lo tanto la visualización de los resultados utilizando distintas opciones gráficas, como grillas de deformación o gráficos de polígonos (Zeldich *et al.*, 2004). Para estudiar la forma de los cangrejos, se definió una configuración de puntos morfológicos en 2D (de ahora en más se los llamará configuración de *landmarks*) sobre el carapacho. Estos puntos fueron de dos tipos, uno de ellos denominados *landmarks*, los cuales presentaron homología anatómica entre los individuos y otros denominados *semilandmarks*, en los cuales la homología fue construida mediante la utilización de un algoritmo matemático. Para la digitalización de la forma, cada carapacho fue fotografiado, junto a una escala, utilizando una cámara fotográfica montada sobre un estativo. La configuración de *landmarks* fue construida utilizando 19 *landmarks* y 21 *semilandmarks* en 2D (**Figura 3**). Para su digitalización y posterior deslizamiento de los *semilandmarks*, se utilizaron una serie de programas computacionales denominados TPS. Los *landmarks* fueron definidos como: (1) el borde anterior del carapacho, (2) borde interno de la depresión ocular izquierda, (3) extremo de la espina anterior izquierda, (4) curvatura de la primera espina izquierda, (5) extremo de la primera espina, (6) curvatura de la segunda espina lateral, (7) extremo de la segunda espina lateral, (8) curvatura de la tercera espina lateral, (9) extremo de la tercera



espina, (10) curvatura entre la región genital y región cardíaca, (11) borde del extremo posterior del carapacho, (12) extremo de la tercera espina lateral derecha, (13) curvatura de la tercera espina lateral derecha, (14) extremo de la segunda espina lateral derecha, (15) curvatura de la segunda espina lateral, (16) extremo de la primera espina lateral derecha, (17) curvatura de la primera espina anterior, (18) extremo de la espina anterior, (19) borde interno de la depresión ocular derecha. Los *semilandmarks* fueron: (20, 21, 22) a lo largo del borde externo de la máxima curvatura izquierda, (23, 24, 25) a lo largo del borde interno de la depresión ocular izquierda, (26-35) a lo largo de la cuarta espina y el borde posterior del carapacho, (36-38) a lo largo del borde interno de la depresión ocular derecha, (39-41) a lo largo del borde externo de la máxima curvatura anterior derecha (**Figura 3**). Cabe destacar que cada carapacho fue digitalizado dos veces en distintos tiempos, para calcular el error debido a la digitalización.

Considerando que los *semilandmarks* al digitalizarlos presentan un grado de libertad más que los *landmarks*, es necesario deslizarlos mediante algún criterio para hacerlos homólogos entre individuos (Klingenberg, 2011). Para esto, se utilizó el algoritmo que minimiza la energía de curvatura (*bending energy*) de una placa metálica delgada idealizada, mediante la utilización de la función de TPS en el programa computacional TPSRELW. Está comprobado que este algoritmo funciona mejor que un alineamiento equidistante ya que no produce deformaciones espurias de las grillas de deformación al superponer la forma de referencia sobre la forma *target* (Gunz *et al.*, 2005). La energía de curvatura depende de la distancia entre la configuración de *landmarks* entre el objeto de referencia y el objeto *target*, la mínima energía será aquella que implique el menor gasto de energía para deformar la placa metálica infinitamente delgada de la referencia con el objeto de ajustarla a la forma del *target*. Este es un proceso iterativo donde el individuo utilizado como referencia es un individuo teórico calculado como el individuo consenso. A su vez, se calculó un estimador insesgado del tamaño denominado tamaño del centroide (CS= la raíz cuadrada de la suma de las distancias al cuadrado desde un conjunto de *landmarks* al centroide) (Zelditch *et al.*, 2004).



**Figura 3.** Fotografía que muestra la configuración de *landmarks* (puntos azules) y *semilandmarks* (puntos rojos) en dos dimensiones, las cuales se utilizaron para capturar la forma del carapacho.

De modo secuencial con el deslizamiento de *semilandmarks*, se realizó el análisis de superposición de Procrustes (ASP), en cuyo procedimiento se realiza una superposición de las configuraciones de *landmarks* a través de la utilización de tres transformaciones. En estas transformaciones, el centroide se traslada a un origen en común para todas las configuraciones, las escala a un mismo tamaño (*centroid size*= 1) para que el tamaño no influya directamente sobre la forma de los individuos, y las rota minimizando las distancias al cuadrado entre la configuración de referencia y el *target*. Luego de este ajuste, las coordenadas cartesianas de cada configuración se encuentran en un nuevo espacio de forma denominado espacio de Kendall. El espacio contiene  $K \times M$  dimensiones, donde  $K$  es el número de *landmarks* y  $M$  es el número de coordenadas cartesianas (Zelditch *et al.*, 2004) obtenidas a partir del ajuste de las configuraciones de *landmarks*. Este espacio no es lineal, pero cuando las configuraciones de *landmarks* presentan distribuciones isotrópicas con respecto al consenso, la proyección al espacio tangente es confiable. Por esta razón, se realizó la proyección de forma ortogonal de los datos en el espacio tangente de la forma y se calcularon nuevas coordenadas de *landmarks* alineadas de Procrustes de cada individuo utilizando las variables de energía de curvatura constantes ( $\alpha=0$ ) (Rohlf & Slice, 1990; Slice *et al.*, 1996). Para esto, el algoritmo encuentra la distancia mínima posible entre las configuraciones de *landmarks* de diferentes formas con respecto a una forma consenso, definida como la distancia *full* de Procrustes (Zelditch *et al.*, 2004).



Cuando un objeto presenta simetría dentro del objeto (*Object symmetry*), como por ejemplo el carapacho de los cangrejos, el programa computacional MorphoJ (Klingenberg, 2011) realiza una cuarta transformación que es la reflexión del lado izquierdo sobre el derecho, y de esta manera la variación total de la muestra se separa en un componente simétrico y otro asimétrico de la forma. El componente de forma simétrico es medido como el valor máximo de concordancia entre el lado izquierdo y derecho del carapacho, mientras que el componente de forma asimétrico es calculado como la desviación entre los *landmarks* de la izquierda y derecha del carapacho (Klingenberg, 2011).

### 5.5.1 Análisis estadísticos morfométricos

Para estudiar el efecto de las localidades sobre el componente simétrico de la forma del carapacho y evaluar el error de digitalización, entre la muestra original y la réplica, se realizó un análisis de Procrustes ANOVA (Klingenberg & McIntyre, 1998). Con el objetivo de eliminar los componentes del tamaño que pueden estar influenciando sobre la variación en forma, se puso a prueba la presencia de alometría en la muestra original. La alometría fue evaluada mediante una regresión multivariada agrupada dentro de cada localidad, utilizando la forma (coordenadas alineadas de Procrustes de la matriz del componente simétrico de la muestra, como variable dependiente) sobre el tamaño (CS, como variable independiente) (Bookstein, 1991; Monteiro, 1999; Klingenberg, 2011). La cantidad de variación explicada fue cuantificada como el porcentaje total de la variación de la forma explicada por el modelo de regresión (Klingenberg & McIntyre, 1998). La significancia del modelo fue evaluada mediante una prueba de permutación (Good, 2000). El test permutacional asociado al análisis de regresión utiliza la hipótesis nula de independencia completa entre las variables dependientes e independientes. Simula esta hipótesis nula reasignando aleatoriamente las observaciones de las variables dependientes a las observaciones de las variables independientes. El estadístico de prueba es la suma de cuadrados de Procrustes predichos por la regresión, sumados a través de todas las variables dependientes (Klingenberg, 2011).

El cambio de la forma con respecto al aumento del tamaño se visualizó gráficamente proyectando los datos de forma sobre una línea vectorial de regresión, siguiendo su dirección en cada cambio en tamaño (Klingenberg, 2008) para cada



localidad de forma independiente. Si eliminamos el componente predicho del análisis y nos centramos exclusivamente en los residuales, esta nueva variable no está correlacionada con la variable independiente. El uso de los residuos de una regresión de forma sobre tamaño para análisis posteriores fue, por lo tanto, un método de corrección para obtener datos de forma libres de alometría (Klingenberg, 2011). Con el fin de determinar los principales ejes de variación en la forma del carapacho se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de la matriz de varianzas-covarianzas entre los individuos de la muestra original y de los productos residuales de la regresión. El objeto de este análisis fue explorar el morfoespacio definido por la variación encontrada de la forma para cada localidad. El ACP es una prueba estadística descriptiva que realiza un ordenamiento y una reducción de la dimensionalidad de los datos, y en el caso de la morfometría geométrica permite visualizar (en dirección e intensidad del cambio) los componentes de la forma que generan ejes de máxima variación ortogonales entre sí (Zelditch *et al.*, 2004) Previamente al cálculo del ACP, se generó una matriz de varianza-covarianzas de las coordenadas de Procrustes. Los componentes principales (CP) son conjuntos de vectores (*eigenvectors*) de igual longitud que representan las desviaciones de cada uno de los individuos muestreados respecto al consenso. Por lo tanto, cada CP explica determinado componente de variación en forma de la muestra, que será propio de cada eje y la sumatoria de cada porcentaje representará la variación total (Zelditch *et al.*, 2004). Por convención, solo se interpretaron aquellos CP que explicaron más del 5% de la variación total de la muestra (Zelditch *et al.*, 2004).

Con el objeto de determinar y visualizar ejes de máxima variación entre los grupos de hábitats y localidades, se calculó un análisis de variables canónicas (AVC) sobre los componentes principales que acumularon el 95% de la variación total. El AVC es un método que se utiliza para encontrar los componentes de forma que maximizan la separación entre varios grupos, con el supuesto de que la pertenencia a un grupo se conoce a priori (Zelditch *et al.*, 2004). Además, se calculó un método de comparación múltiple basado en el análisis de conglomerados jerárquicos (UPGMA; Valdano & Di Rienzo, 2007; Márquez & Van der Molen, 2011) para visualizar las distancias de formas entre localidades. Este método es una técnica híbrida que combina un agrupamiento jerárquico basado en las distancias de Mahalanobis (Mahalanobis, 1948) para casos multivariados. Los análisis de datos se realizaron utilizando los programas computacionales MorphoJ v1.05a (Klingenberg, 2011) e Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020). Por último, para evaluar la relación entre las distancias morfométricas, genéticas y geográficas (distancia euclídea entre localidades), se realizó una correlación de matrices de distancia utilizando 100.000 permutaciones mediante la prueba parcial de Mantel. Esta prueba se calculó mediante el uso del programa computacional ZT (Bonnet & Van de Peer, 2002).

## 6. Resultados

### 6.1 Análisis genéticos poblacionales a partir del gen ARNr 16s

Se analizaron 16 secuencias de una región parcial del gen mitocondrial de la subunidad 16s del ARN ribosomal de individuos recolectados de Montevideo (Uruguay), 28 de Julio y Puerto Deseado (Argentina). El número de haplotipos totales fue de tres. La matriz estuvo conformada por 476 pares de bases, de las cuales, 474 fueron sitios conservados y 2 sitios polimórficos, correspondiendo a mutaciones únicas, pero ningún sitio fue parsimoniosamente informativo. La diversidad haplotídica global ( $H_d = 0,24$ ) y la nucleotídica global ( $P_i = 0,0005$ ) fueron bajas (**Tabla 2**). La diversidad haplotídica, el número de diferencias nucleotídicas y la diversidad nucleotídica disminuyó de norte a sur. El índice D de Tajima no fue significativo para ninguna localidad (**Tabla 2**).

La red de haplotipos del gen mitocondrial ARNr 16s mostró una forma de semi-estrella (**Figura 4**), con un haplotipo central (H2) más frecuente representado por 14

individuos de las localidades de Puerto Deseado, 28 Julio y Montevideo; y dos haplotipos únicos, uno en 28 de Julio (H3) y otro en Montevideo (H1). Todos los haplotipos estuvieron separados entre sí por una sustitución. En la red se observó que las poblaciones no presentaron una estructura genética definida a lo largo de su distribución. En general, el gen ARNr 16s resultó no ser lo suficientemente variable para estudiar los cambios poblacionales de esta especie, es por esto, que no se continuó con la secuenciación de los individuos del resto de las localidades, y se decidió continuar los análisis genéticos poblacionales utilizando una región parcial del gen COXI. Por otro lado, estas secuencias si fueron útiles para obtener una representación gráfica de las relaciones filogenéticas entre las especies del género, las cuales se detallan al final de esta sección.

**Tabla 2.** Índices de diversidad genética para *C. angulatus* a partir de una región parcial del gen mitocondrial ARNr 16s. n, número de especímenes analizados; S, número de sitios polimórficos; H, número de haplotipos; Hd, diversidad haplotídica; k, número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi, diversidad nucleotídica y D, D de Tajima.

Localidad	n	S	H	Hd	k	Pi	D de Tajima
Montevideo	3	1	2	0,67	0,67	0,0014	-
28 de Julio	8	1	2	0,25	0,25	0,0005	-1,05 (p > 0,10)
Puerto Deseado	5	0	1	0	0	0	-
Total	16	2	3	0,24	0,25	0,0005	-1,49 (p > 0,10)

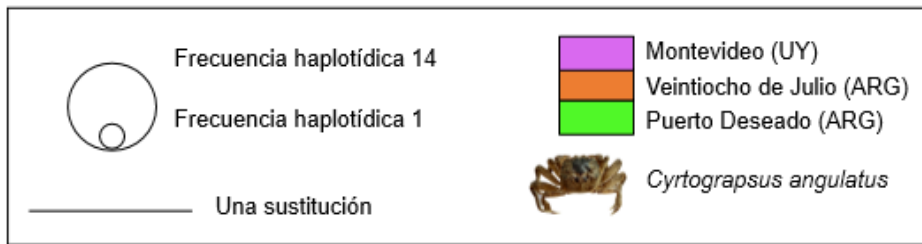
Alvarez

Bacchi

Figueroa

Imhoff

Stella



**Figura 4.** Red de haplotipos de *C. angulatus* a partir de una región parcial del gen mitocondrial ARNr 16s. El tamaño de los círculos es proporcional a las frecuencias haplotídicas. La línea blanca que une los haplotipos indica un paso mutacional. Los colores definen las localidades de cada haplotipo.

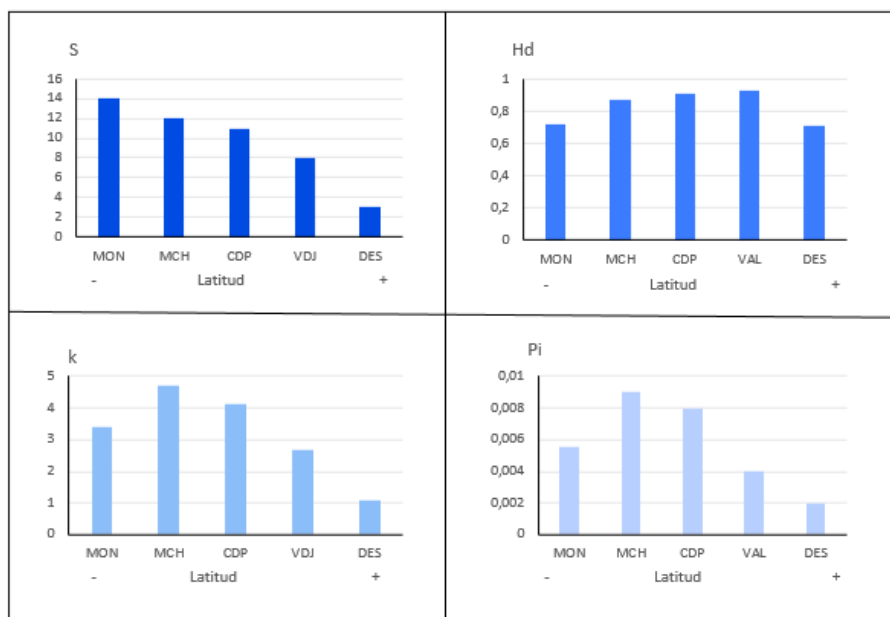


## 6.2 Análisis genéticos poblacionales a partir del gen COXI

Se secuenció una región parcial del gen COXI en 50 individuos de *C. angulatus* provenientes de 5 localidades (**Tabla 1**). En la prueba de saturación de sustituciones se obtuvo que había poca saturación en las sustituciones del tercer codón (el índice I<sub>ss</sub> fue menor que el índice I<sub>ss</sub> crítico, **Tabla S1, c**). El número de haplotipos totales fue de 22. La matriz estuvo conformada por 697 sitios de los cuales 410 fueron sitios conservados y 20 fueron sitios polimórficos, dentro de los cuales 12 fueron parsimoniosamente informativos y ocho mutaciones únicas. Las diversidades haplotídicas y nucleotídica globales fueron altas (H<sub>d</sub>= 0,91, P<sub>i</sub>= 0,00928, **Figura 5**). El número de sitios polimórficos disminuyó de norte a sur, la diversidad haplotídica fue alta y similar en todas las localidades, mientras que la diversidad nucleotídica y el número de diferencias nucleotídicas fue mayor en Mar Chiquita y luego disminuyó hacia el norte y hacia el sur de la distribución. Las localidades de Montevideo y 28 de Julio presentaron valores negativos del índice D de Tajima, y Mar Chiquita, Carmen de Patagones y Puerto Deseado valores positivos. Sin embargo, el índice no fue significativo para ninguna localidad (**Tabla 3**).

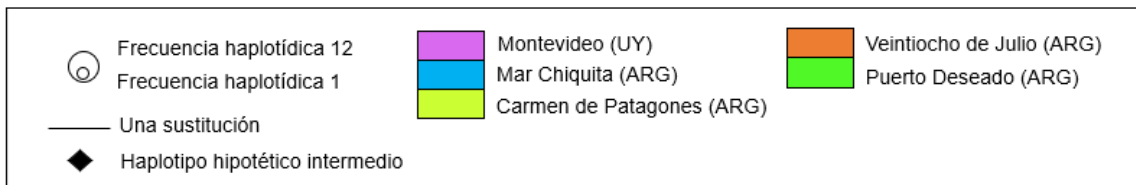
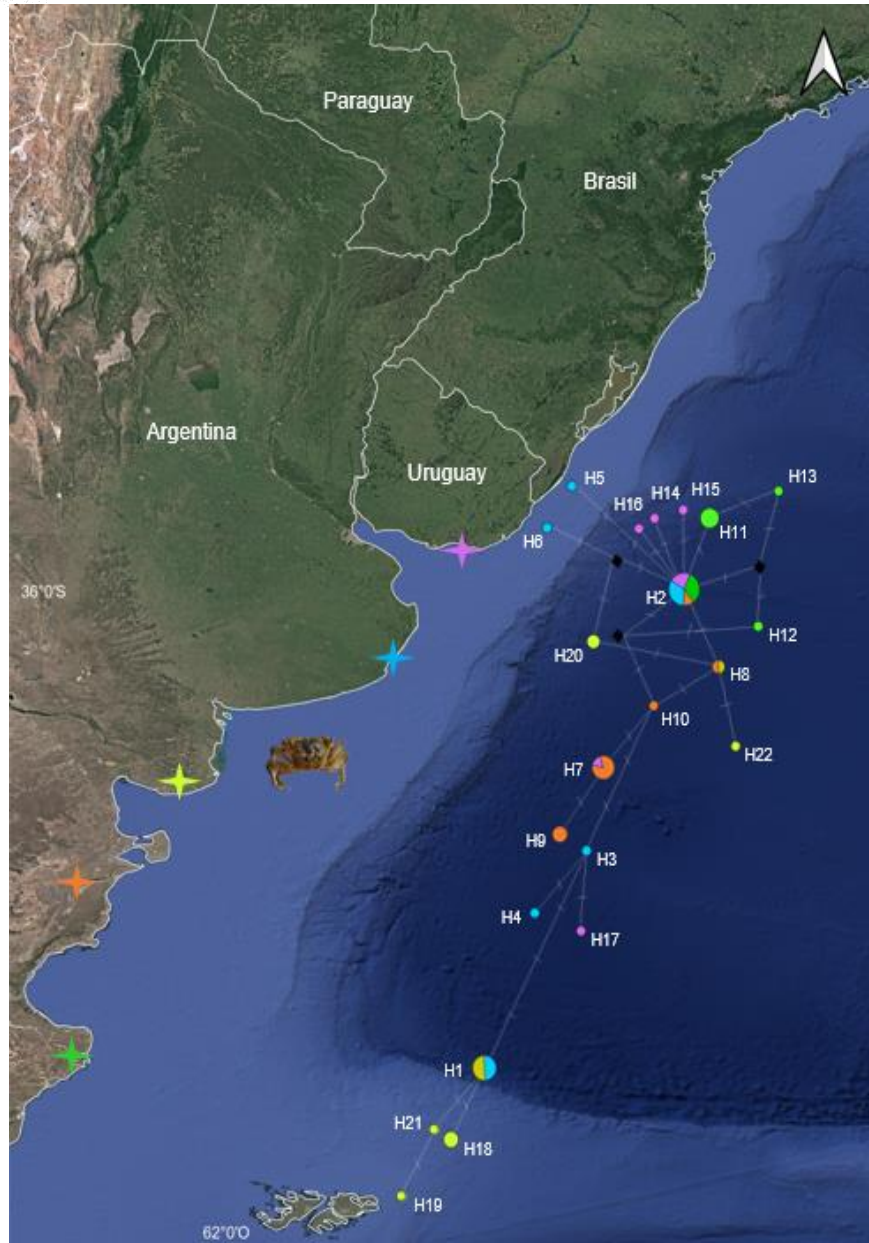
**Tabla 3.** Índices de diversidad genética para *C. angulatus* a partir de una región parcial del gen mitocondrial COXI. N, número de especímenes analizados; S, número de sitios polimórficos; H, número de haplotipos; Hd, diversidad haplotídica; k, número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi, diversidad nucleotídica y D, D de Tajima.

Localidad	n	S	H	Hd	k	Pi	D
Montevideo	10	14	6	0,778	3,378	0,00555	-1,453 (p > 0,10)
Mar Chiquita	10	12	6	0,867	4,689	0,00900	0,476 (p > 0,10)
Carmen de Patagones	10	11	7	0,911	4,111	0,00831	0,256 (p > 0,10)
28 de Julio	10	8	8	0,933	2,667	0,00415	-0,245 (p > 0,10)
Puerto Deseado	10	3	4	0,711	1,089	0,00224	0,096 (p > 0,10)
Total	50	20	22	0,911	3,991	0,00928	-0,338 (p > 0,10)



**Figura 5.** Índices de diversidad genética de una región parcial del gen mitocondrial ARNr 16s estimados para el total de especímenes y para cada localidad; Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES). S: número de sitios polimórficos, Hd: diversidad haplotídica, k: número promedio de diferencias nucleotídicas y Pi: diversidad nucleotídica.

La representación gráfica de los haplotipos de *C. angulatus* dan como resultado un ensamble complejo de haplotipos (**Figura 6**). La red de haplotipos incluyó un total de 32 sustituciones, las cuales definieron 22 haplotipos. El haplotipo H2 es el más frecuente y posee representantes en las localidades de Puerto Deseado, Veintiocho de Julio, Mar Chiquita y Montevideo, con una frecuencia de 12 individuos. Luego, se obtuvieron tres haplotipos con frecuencias de 6-5 individuos de localidades ubicadas al norte y al sur mezcladas, y 17 haplotipos únicos en su mayoría periféricos, de los cuales tres pertenecen a Pto. Deseado; dos a 28 de Julio; cuatro a individuos de Carmen de Patagones; cuatro a individuos de Mar Chiquita; cuatro a Montevideo. La localidad de 28 de Julio tuvo un mayor número de haplotipos, seguida de Carmen de Patagones y el resto de las localidades. Una semi-estructura formada por individuos de las localidades de Mar Chiquita y Carmen de Patagones se separó del resto de los haplotipos por tres pasos mutacionales. El resto de los haplotipos se encontraron separados por dos a una sustitución.



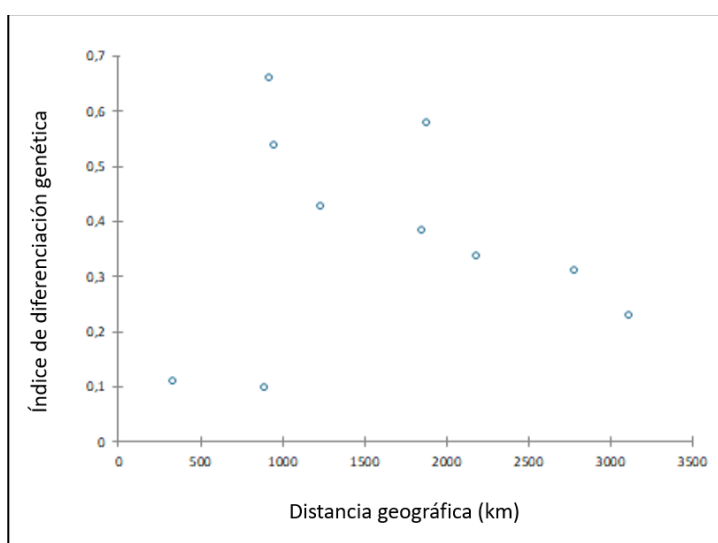
**Figura 6.** Red de haplotipos de *C. angulatus* a partir de una región parcial del gen mitocondrial COXI. El tamaño de los círculos es proporcional a las frecuencias haplotídicas. La línea gris que une los haplotipos indica un paso mutacional. Los colores definen las localidades de cada haplotipo.

El análisis del análogo del Fst basado en las diferencias nucleotídicas de a pares, mostró diferenciación genética significativa entre todas las localidades, excepto entre: Montevideo-Mar Chiquita y Mar Chiquita-Carmen de Patagones (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Prueba del estadístico análogo del Fst a partir de una región parcial del gen mitocondrial COXI. Nivel de significancia estadística:  $p > 0,05$  (no significativo); (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$  y (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Índice de diferenciación genética	Montevideo	Mar Chiquita	Carmen de Patagones	28 de Julio	Pto. Deseado
Montevideo	0				
Mar Chiquita	0,14 (ns)	0			
Carmen de Patagones	0,47 ***	0,01 (ns)	0		
28 de Julio	0,42 *	0,40 ***	0,53 ***	0	
Puerto Deseado	0,17*	0,30 ***	0,58***	0,65 ***	0

Por otro lado, puesto que el valor-p calculado en la Prueba de Mantel fue mayor que el nivel de significación (valor-p  $0,787 > 0,050$ ) y el diagrama de dispersión no mostró una correlación entre las matrices (**Figura 7**), no se puede rechazar la hipótesis nula que dice que las matrices de distancia geográfica y genética no están correlacionadas.





**Figura 7.** Diagrama de dispersión de la matriz de distancia genética y geográfica de *C. angulatus*.

Los resultados del AMOVA con las distintas agrupaciones mostraron que el mayor porcentaje de variación genética estuvo explicado para las distintas agrupaciones, entre un 56-70% por las diferencias dentro de poblaciones. El índice de fijación, FCT, no fue significativo en ningún grupo determinado a priori, por lo que no explicó ningún porcentaje de la variación genética, es decir no se encontró una diferenciación genética significativa entre grupos, incluso entre los tres últimos grupos de los cuales si se habían observado diferencias nucleotídicas de a pares en el análisis previo (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizado sobre una matriz de 50 secuencias de *C. angulatus* con 10.000 iteraciones ( $p < 0,05$ , \* significativo).

A) Provincia Biogeográfica Argentina (Montevideo, Mar Chiquita, Carmen de Patagones) versus Provincia Magallánica (28 de Julio, Pto. Deseado)

Fuente de variación	gl	Índice de fijación	% de variación
Entre GRUPOS	1	<b>0,028 (FCT) (ns)</b>	2,81
Entre poblaciones dentro de GRUPOS	3	0,389 (FSC) ***	37,85
Dentro de poblaciones	45	0,406 (FST) ***	59,34
Total	49	1	100

B) Río de la Plata como barrera al flujo génico: Montevideo versus resto de las localidades

Fuente de variación	gl	Índice de fijación	% de variación
Entre GRUPOS	1	<b>-0,215 (-FCT) (ns)</b>	-21,52
Entre poblaciones dentro de GRUPOS	3	0,442 (FSC) ***	53,75
Dentro de poblaciones	45	0,322 (FST) ***	67,76
Total	49	1	100

C) Tipo de hábitat: estuario (Montevideo, Mar Chiquita) versus río (28 de Julio, Carmen de Patagones) versus mar (Pto. Deseado)

Fuente de variación	gl	Índice de fijación	% de variación
Entre GRUPOS	2	<b>-0,039 (FCT) (ns)</b>	-3,99
Entre poblaciones dentro de GRUPOS	2	0,418 (FSC) ***	43,49
Dentro de poblaciones	45	0,395 (FST) ***	60,49
Total	49	1	100

La distancia genética intraespecífica de las poblaciones de este estudio estuvo en el rango de 0,2-0,8% e interespecífica (entre las poblaciones) <1,1%.

### 6.3 Análisis a nivel de género a partir del gen ARNr 16s

En la prueba de saturación de sustituciones se obtuvo que había poca saturación en las sustituciones del tercer codón (el índice I<sub>ss</sub> fue menor que el índice I<sub>ss</sub> crítico, **Tabla S1, b**). En la red de haplotipos construida con las especies del género *Cyrtograpsus*, se utilizaron 22 secuencias parciales del gen ARNr 16s (*C. angulatus* N= 17, *C. affinis* N= 3 y *C. altimanus* N= 2), y se detectaron 12 sustituciones nucleotídicas, de las cuales 10 pasos mutacionales separaron a *C. angulatus* de *C. affinis* + *C. altimanus*. Para la especie *C. angulatus* se observaron tres haplotipos provenientes de cuatro localidades, de los cuales el haplotipo H2 fue el más frecuente, presente en un individuo de la localidad de Mar Chiquita (número de acceso en GenBank: AJ278836, Spivak & Schubart, 2003) y 16 individuos nuevos, aportados por este estudio, provenientes de las poblaciones de Montevideo, 28 de Julio y Puerto Deseado. Además, se establecieron dos haplotipos únicos, H1 y H3, para las poblaciones de Montevideo y 28 de Julio, respectivamente. Las especies putativas *C. altimanus* y *C. affinis* estuvieron representadas por un único haplotipo (H4).



**Figura 8.** Red de haplotipos del género *Cyrtograpsus* a partir del gen mitocondrial ARNr 16s. El tamaño de los círculos es proporcional a las frecuencias haplotípicas. La línea gris que une los haplotipos indica un paso mutacional. Los colores definen las localidades de cada haplotipo.

La distancia genética **interespecífica** entre *C. angulatus* y las otras dos especies putativas del género, *C. altimanus* y *C. affinis*, fue de 5,1 – 5,4% (ES= 0.1) y entre estas últimas fue de 0,1% (ES=0.01).

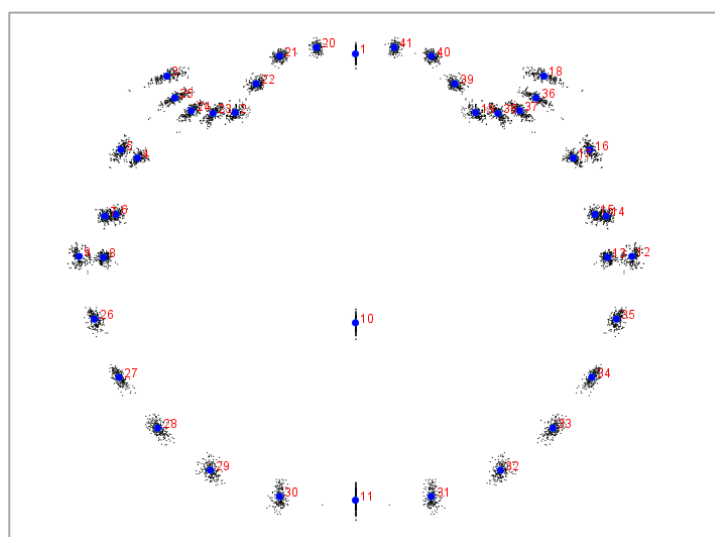
#### 6.4 Morfometría geométrica

Los datos presentaron coeficientes bajos para los valores atípicos (0,005) y se distribuyeron de forma aproximada a una curva sigmoidea en el gráfico que representa la curva esperada para una distribución normal multivariada, lo cual indicó que los datos pueden ser utilizados para realizar estadística multivariada paramétrica. En el análisis de Procrustes ANOVA, se observó que el cuadrado medio del error de digitalización (0,000001) fue menor a los cuadrados medios correspondientes a la asimetría fluctuante (0,000011), por lo que el error de digitalización se lo consideró insignificante (**Tabla 6**). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ) entre las formas de los individuos, por lo que existe variabilidad en la muestra (efecto individual). Además, existieron efectos de “individuo\*lado” y “lado” (**Figura 9**) sugiriendo presencia de asimetría fluctuante y direccional en la muestra (**Tabla 7**). La asimetría fluctuante hace referencia a variaciones al azar entre los lados izquierdo y derecho del carapacho.



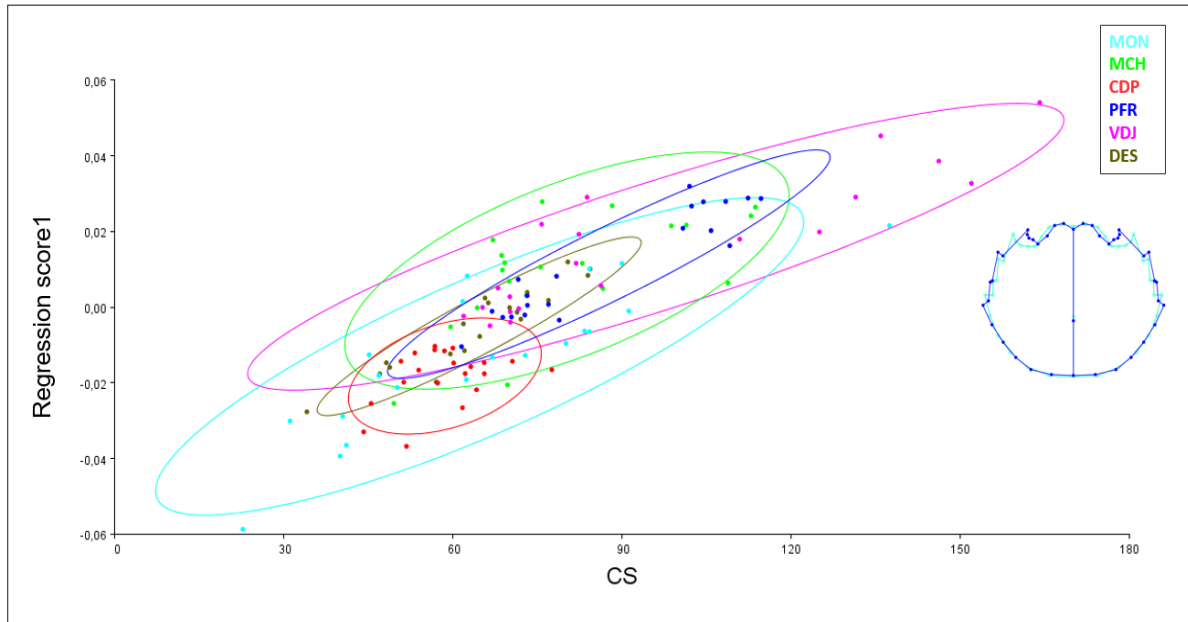
**Tabla 6.** Procrustes ANOVA para el componente de forma simétrica del carapacho con una variable categórica (localidad) y las interacciones entre las muestras originales (individuo) y réplica (lado). Los valores significativos se indican con (\*\*\*) y corresponde a  $p < 0,001$ .

Efecto	SC	CM	gl	F	p
Localidad	0,080053	0,000411	195	13,85	<0,0001
Individuo	0,131748	0,000030	4446	2,60	<0,0001
Lado	0,019860	0,000509	39	44,62	<0,0001
Individuo * Lado	0,052962	0,000011	4641	18,28	<0,0001
Error 1	0,005844	0,000001	9360		



**Figura 9.** Componente simétrico de la forma (promedios de los lados izquierdo y derecho). Los puntos azules representan la forma consenso, mientras que los puntos más pequeños y negros representan la dispersión de los *landmarks* de cada una de las configuraciones individuales de toda la muestra. Los números de cada *landmarks* están indicados en rojo.

La regresión multivariada de la forma sobre el tamaño del centroide (**Figura 10**) indicó que hay presencia de alometría en la muestra con un valor-p significativo ( $p = 0,0001$ ). El porcentaje de variación explicada por la relación entre la forma y el tamaño fue del 24% de la variación total. A medida que los individuos crecen se observó una tendencia hacia formas de carapachos con las órbitas más cerradas, la región rostral más ondulada, una expansión de la región media anterior hacia los laterales y la tercera espina presentó una rotación en dirección horizontal.

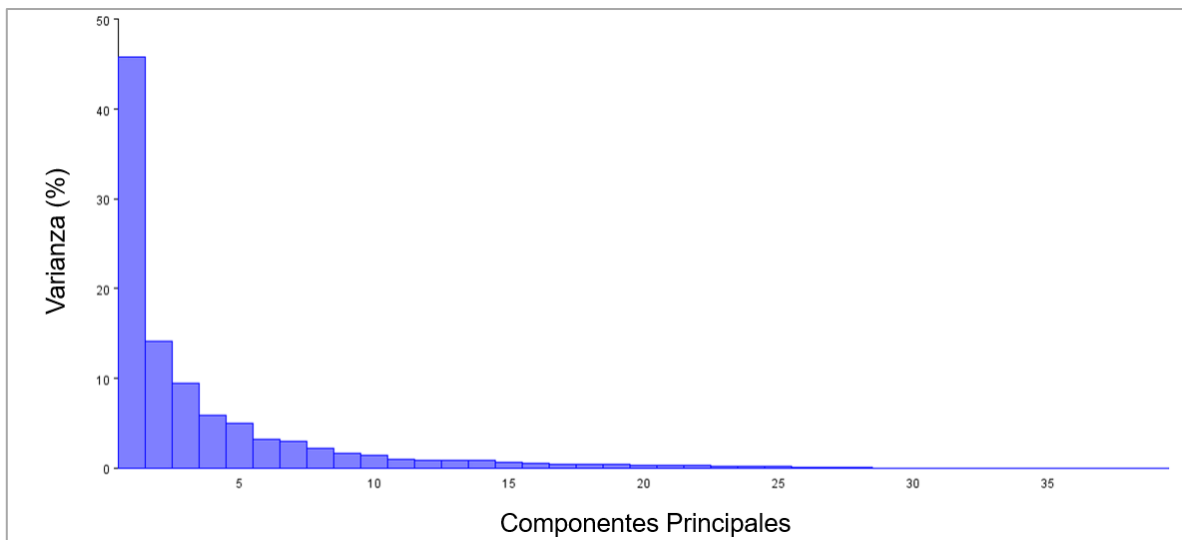


**Figura 10.** Regresión multivariada que muestra los cambios de forma (*regression score1*) asociados al incremento de tamaño del centroide. Las elipses de igual frecuencia se graficaron al 90%. Los colores de las siglas y de las elipses indican las diferentes localidades. Los *wireframe* (estructura alámbrica) representan las formas de los individuos con un factor de escala de 90 (individuos grandes) y con un factor de -90 (individuos pequeños). El contorno color turquesa indica la forma consenso y el contorno azul indica las formas variables. Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), Playa Fracasso (PFR), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES).

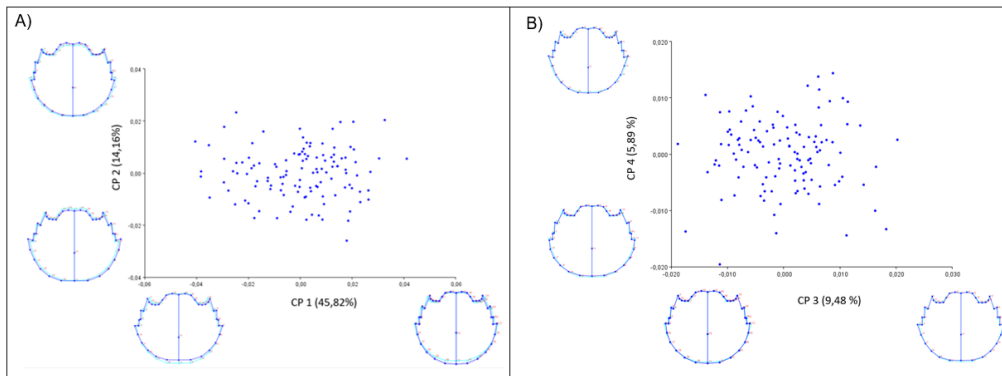
En el ACP, se decidió corregir la alometría por lo que la variable de forma que se analizó fueron los residuales de la regresión multivariada. Así, los primeros cuatro CP explicaron el 80,34% de la variación de la forma en la muestra (**Figura 11**). A lo largo del CP1 (45% de la variación total), los individuos que ocuparon los valores positivos presentaron una proyección anterior de los orbitales y una retracción de las espinas, mientras que la parte posterior presentó una expansión, generando un cambio de forma generalizado hacia una forma circular del carapacho. Del porcentaje restante, el 14,16% de la variación quedó alojado en el CP2, donde los individuos que se encontraron en los valores positivos presentaron un estrechamiento sobre la región anterior y una proyección hacia los laterales del carapacho (**Figura 12A**). El CP3 alojó el 9,48% de la variación total y hacia los positivos los individuos presentaron un cambio de forma asociada a una retracción posterior de la tercera y cuarta espina. Por último, en los valores positivos del CP4 (5,89%), los individuos presentaron una

*Alvarez* *Bonavent* *Figueroa* *Marcel* *GA*

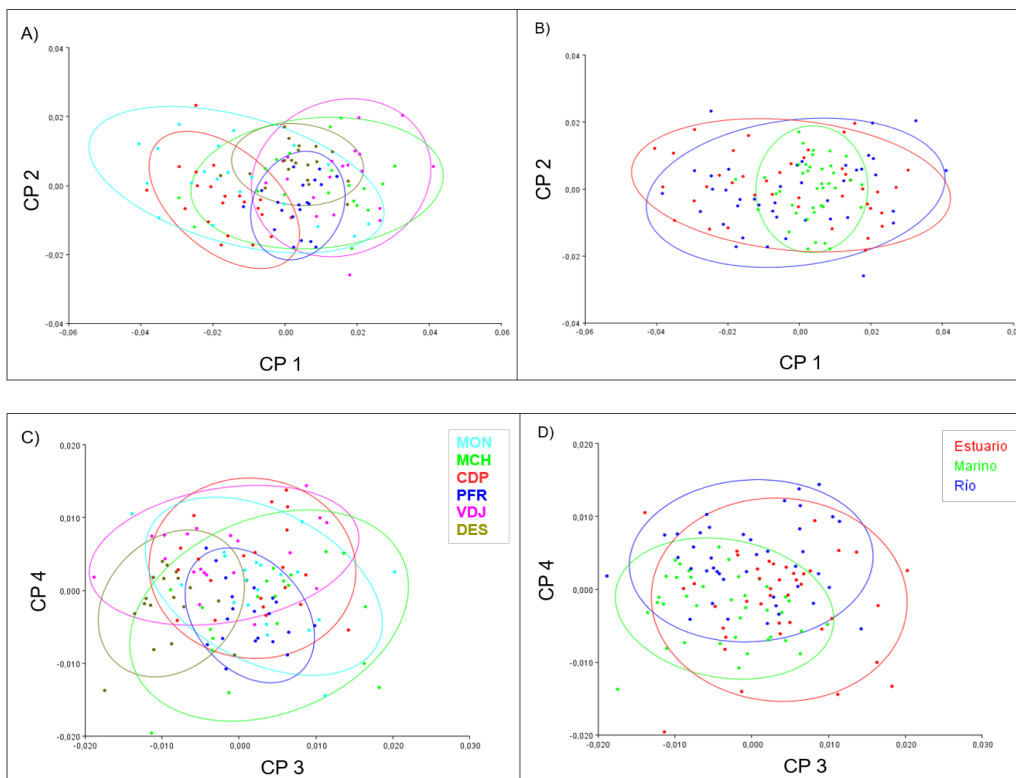
leve retracción de la región ocular y la región lateral media, y una expansión de la región posterior del carapacho (**Figura 12B**). Cabe destacar que las variaciones de forma explicitadas son relativas al consenso de forma entre todos los individuos, y que solo se explicitaron las variaciones hacia los valores positivos, ya que para los valores negativos las variaciones son las opuestas en dirección y magnitud del cambio que las de los valores positivos. La varianza fenotípica de la forma del carapacho, fue menor para las dos localidades marinas, Playa Fracaso (PFR) y Puerto Deseado (DES9, en el CP1 y CP2, en contraposición con el resto de las localidades (**Figura 13 A-C**). Esta observación surge al colorear los individuos de cada localidad en el morfoespacio y calcular las elipses de igual frecuencia al 90%.



**Figura 11.** Gráfico de barras que indica el porcentaje de variación explicado por cada componente principal. La varianza total es la suma de las varianzas explicada por cada componente principal en la totalidad del morfoespacio.



**Figura 12.** Gráfico de componentes principales (CP), que indica los patrones de variaciones de forma simétrica para todos los individuos. A) CP1 vs CP2 con  $fc = \pm 0,06$ , B) CP3 vs CP4 con  $fc = \pm 0,03$ . El factor de escala (fc) indica la magnitud de cambio de la forma como una distancia de Procrustes. Las formas en los extremos opuestos del rango de variación se muestran con un gráfico de estructuras alámbricas (*wireframe*). El contorno de color turquesa indica la forma consenso y el contorno azul indica las formas variables.



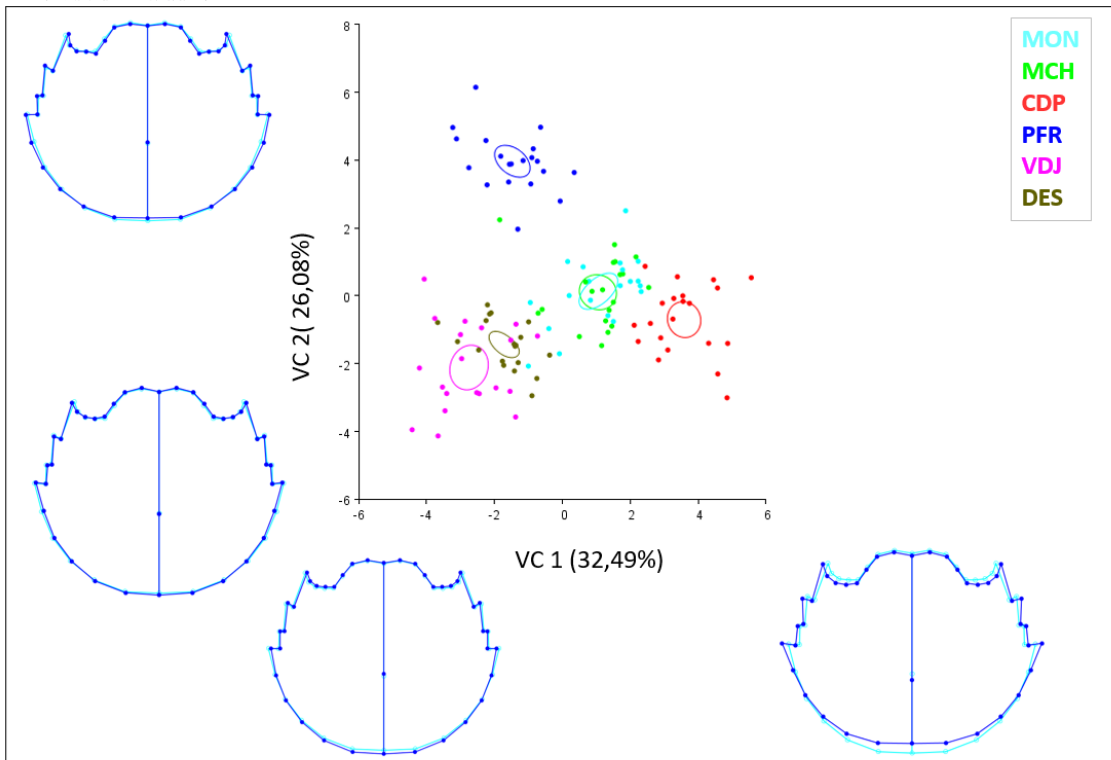
**Figura 13.** Gráfico de componentes principales (CP), que indica los patrones de variaciones de forma simétrica para los individuos por localidad: A y C), y por hábitat: B y D). Las elipses de igual frecuencia se graficaron al 90%. Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), Playa Fracasso (PFR), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES).

En cuanto al análisis de variables canónicas, los valores positivos de la primera variable canónica (VC1, 32%) se asociaron a carapachos ovoides representados por individuos de la localidad de Carmen de Patagones (CDP), mientras que hacia los valores negativos se encontraron las localidades de 28 de Julio (VDJ), Puerto Deseado (DES) y Playa Fracasso (PFR), presentando carapachos elípticos. Montevideo (MON) y Mar Chiquita (MCH) fueron las localidades más cercanas al consenso. Los valores positivos en la VC2 (26%) se asociaron a un estrechamiento de toda la región anterior, un ensanchamiento hacia los laterales del carapacho y una forma elíptica de todo el contorno para la localidad de Playa Fracasso (PFR). Mientras que las localidades de 28 de Julio y Puerto Deseado se agruparon hacia los valores negativos. Las localidades de Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), al igual que para el VC1, se encontraron cercanas al consenso (**Figura 14**).

La prueba de permutación pareada entre las distancias de Mahalanobis entre localidades determinó que todas las localidades fueron significativamente diferentes entre sí (**Tabla 7**).

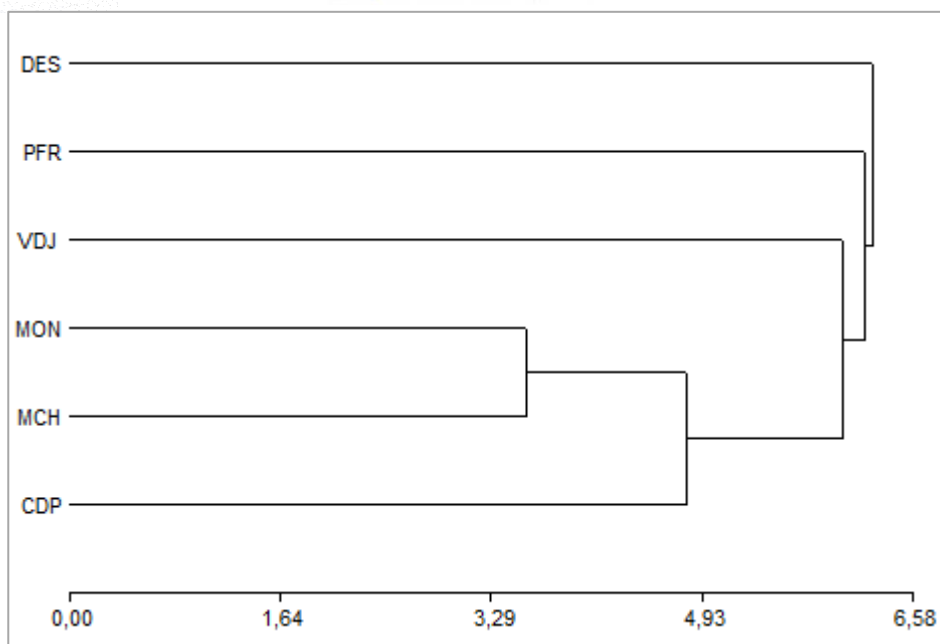
**Tabla 7.** Distancias de Mahalanobis entre las localidades de estudio. Los valores significativos se indican con (\*\*\*) y corresponden a  $p < 0,001$ .

Distancias de Mahalanobis	MON	MCH	CDP	PFR	VDJ	DES
MON	0					
MCH	3,56***	0				
CDP	4,54***	5,09***	0			
PFR	5,41***	5,76***	6,94***	0		
VDJ	5,26***	5,67***	7,15***	6,69***	0	
DES	6,04***	6,14***	6,46***	6,49***	6,17***	0



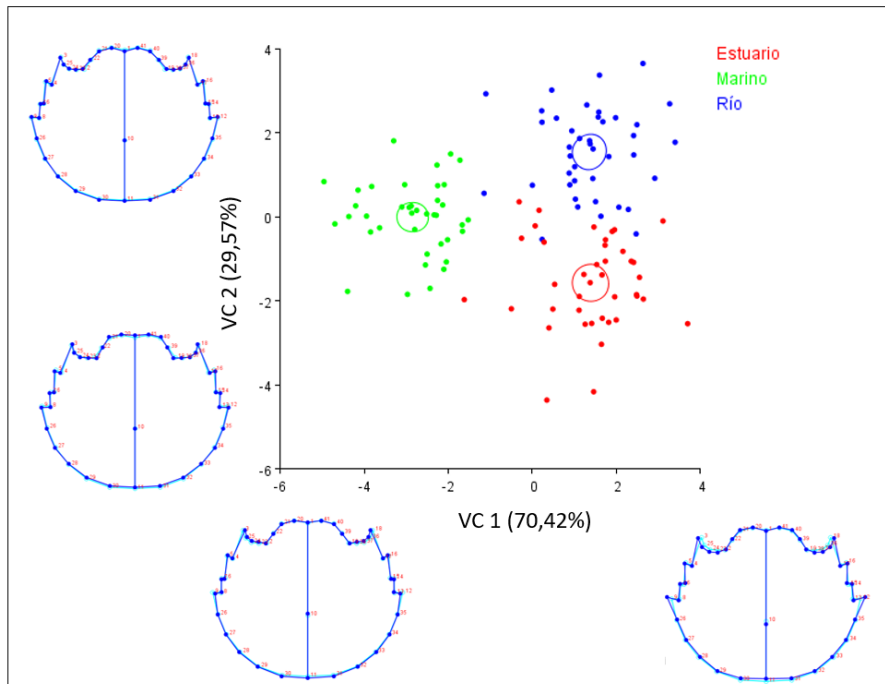
**Figura 14.** Análisis de variables canónicas de la variación de la forma agrupada por localidad, con elipses de confianza alrededor de la media al 95% de confianza. Los gráficos de *wireframe* indican los cambios de forma para cada grupo de localidad. Las unidades de los ejes de los diagramas de dispersión de las puntuaciones VC contienen factores de escala que indican la distancia de Procrustes, es decir, el valor predeterminado de 10,0 es un cambio de 10 unidades en la dirección positiva a lo largo del eje VC respectivo. Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), Playa Fracasso (PFR), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES).

El análisis de conglomerados indicó que las distancias entre las localidades de Montevideo, Mar Chiquita y Carmen de Patagones fueron menores y la localidad más distante fue Puerto Deseado, seguida de forma anidada por Playa Fracasso y 28 de Julio (**Figura 15**) con un coeficiente de correlación cofenética de 0,833.



**Figura 15.** Dendrograma de distancia de formas entre localidades de *C. angulatus* construido a partir de la distancia de Mahalanobis y el método de agrupamiento UPGMA. Montevideo (MON), Mar Chiquita (MCH), Carmen de Patagones (CDP), Playa Fracasso (PFR), 28 de Julio (VDJ) y Puerto Deseado (DES).

El análisis de variables canónicas realizado con el factor de grupo “hábitat” (**Figura 16**) determinó que la VC1, explicó el 70% y la VC2 el 29% de las máximas variaciones de forma entre los grupos. Las formas con un factor de escala teórico de 10 en el eje VC1 presentaron una proyección de todas las espinas hacia los laterales, y una proyección rostral más ondulada. Los hábitats de río y estuario presentaron este tipo de variación de forma. El hábitat marino conformó el grupo más distante y presentó una forma más redondeada con espinas menos angulosas, con la región rostral más rectangular. Para las variaciones de forma asociadas a la VC2, se observó que las formas de río con un factor de escala de 10 presentaron una región rostral en forma de dos semicírculos. Las formas estuáricas presentaron la región anterior rostral cuadrada, un estrechamiento anteroposterior y una forma cuadrada en todo el contorno del carapacho, asociándose a los valores negativos. El grupo marino se encontró en una posición cercana al consenso.

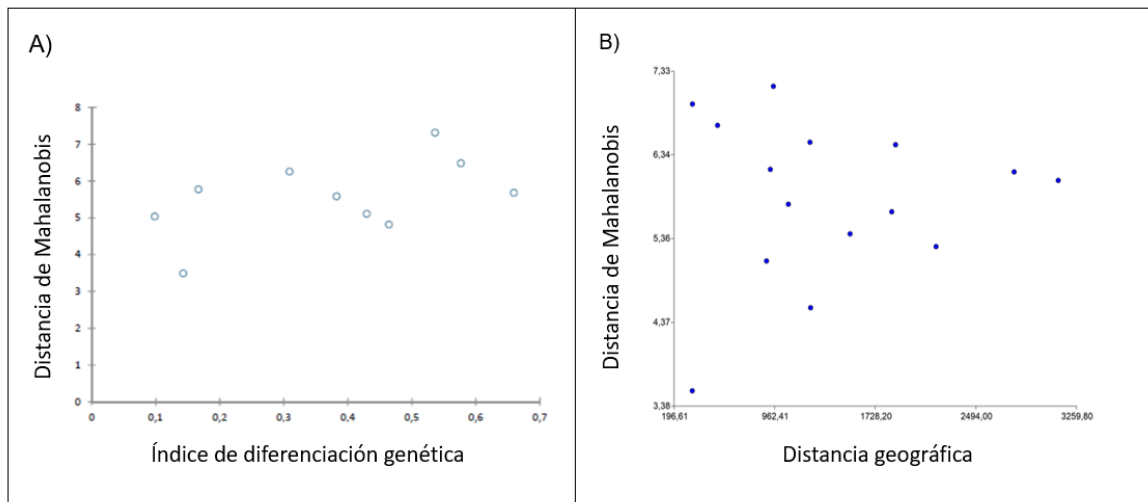


**Figura 16.** Análisis discriminante de variables canónicas que agrupa las variaciones de formas en diferentes hábitats, con elipses de confianza de la media de 0,95. Los gráficos de *wireframe* indican los cambios de forma para cada grupo de hábitat y contienen el factor de escala predeterminado de 10 unidades de distancia de Procrustes.

En el análisis de distancias de Mahalanobis entre hábitats se observó que el valor más grande estuvo presente entre los hábitats marino y estuario (0,012), mientras que el hábitat marino y de río presentaron variación intermedia (0,011). Por último, los hábitats de río y estuario presentaron menores diferencias (0,0083). La significancia entre las distancias de todos los pares posibles, fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,0001$ ).

### 6.5 Genética y morfometría

Las pruebas de correlación de matrices de Mantel no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los casos analizados. Por lo tanto, no se encontró una correlación entre la variación genética y morfométrica (valor-p  $0,118 > 0,05$ ), ni de esta última con la distancia geográfica (valor-p  $0,42 > 0,05$ ) (**Figura 17**).



**Figura 17.** Diagramas de dispersión que indican las relaciones entre: A) distancias de Mahalanobis e índice de diferenciación genética B) distancia de Mahalanobis y distancia geográfica de *Cyrtograpsus angulatus*.

## 7. Discusión

### 7.1 Análisis genéticos

Los índices de diversidad nucleotídica y haplotídica, así como la red de haplotipos obtenida a partir de una región parcial del gen ARNr 16s, sugirieron baja diversidad genética, concluyendo que este marcador no es útil para poder analizar la genética poblacional de *C. angulatus* pero si demostró tener una gran utilidad para diferenciar las especies del género *Cyrtograpsus*. Por el contrario, la región parcial del gen COXI exhibió una alta diversidad genética en esta especie. En general, las diversidades haplotídicas y nucleotídicas globales calculadas a partir del COXI fueron altas. Sin embargo, cuando se graficó su variación a lo largo de la distribución, la diversidad nucleotídica presentó mayores valores en Mar Chiquita y luego, disminuyó hacia el norte y el sur, mientras que la diversidad haplotídica fue alta pero no varió significativamente entre las localidades. La alta diversidad haplotídica y nucleotídica hallada en Mar Chiquita sugeriría que esta población ha sido estable demográficamente por un período prolongado de tiempo (porque es una población con muchos haplotipos y con muchas mutaciones que se mantienen en el tiempo), o bien que son poblaciones separadas históricamente. Por otro lado, la localidad de Puerto Deseado exhibió una alta diversidad haplotídica y una baja diversidad nucleotídica, indicando que sus haplotipos difieren en un número reducido de

sustituciones, lo cual es característico de efectos de una expansión poblacional en tiempos recientes (Hamilton, 2009). Sin embargo, el índice  $D$  de Tajima no fue significativo en Puerto Deseado ni en ninguna de las poblaciones de *C. angulatus*. Se recomiendan futuros estudios que incluyan un mayor tamaño muestral para corroborar esta hipótesis.

La red de haplotipos obtenida a partir de la región parcial del gen COXI sugirió un ensamble complejo de haplotipos con algunas semi-estructuras por regiones (Mar Chiquita y Carmen de Patagones, Montevideo y Mar Chiquita). El haplotipo dos se podría considerar ancestral ya que tiene una posición central en la red, una alta frecuencia en la población y está representado en la mayoría de las localidades (Lanteri & Confalonieri, 2003). Además, en la red no se observaron localidades monofiléticas, todos los sitios de muestreo presentaron haplotipos compartidos y al menos un haplotipo único. Las comparaciones de  $F_{ST}$  pareados indicaron que existe una diferenciación genética significativa de moderada a alta entre las localidades, excepto entre Montevideo (ubicada al norte del Río de la Plata) y Mar Chiquita (ubicada al sur), y entre Mar Chiquita y Carmen de Patagones. Dellatorre y colaboradores (2013) encontraron que el potencial de dispersión larval de esta especie alcanzaría como mínimo 100 km de distancia entre poblaciones estuáricas. En cuanto a las localidades muestreadas en este trabajo están separadas entre 300 y 2000 km, y el menor grado de diferenciación genética lo presentan las localidades con menor distancia geográfica entre ellas (Montevideo y Mar Chiquita, y esta última con Carmen de Patagones), pudiendo así explicarse la menor diferenciación genética encontrada. Asimismo, la diferenciación genética encontrada entre las localidades de *C. angulatus* ubicadas más al sur podría estar relacionada con los cambios en el nivel del mar y la costa (Favier Dubois & Scartascini, 2012), así como los cambios en la temperatura durante los ciclos interglaciares que ocurrieron durante el Pleistoceno tardío, los cuales podrían haber generado cambios demográficos y/o adaptaciones locales a diversos hábitats. La alta diferenciación genética encontrada en el gen COXI entre las localidades sugiere que algún fenómeno demográfico y/o adaptación local podría estar ocurriendo. Existen varios trabajos que sugieren adaptaciones a partir de genes mitocondriales y en particular, del gen COXI, asociados a las presiones parciales de oxígeno y a la temperatura del agua (e.g. Cangrejos de manglar



*Perisesarma* spp., Fusi *et al.*, 2014; el gasterópodo *Radix balthica*, Quintela *et al.*, 2014; la ostra *Crassostrea ariakensis*, Li *et al.*, 2020, entre otros).

Como en muchas otras regiones del mundo, varios grupos de nuestra región se diversificaron debido a procesos alopátricos ocurridos en el Pleistoceno (e.g. Xu *et al.*, 2019; Lessa *et al.*, 2010; Sersic *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2019). Por ejemplo, Xu *et al.*, (2019) estudiaron las poblaciones de la langosta de agua dulce *Aegla alacalufi* en la Patagonia chilena utilizando ADN mitocondrial y secuencias del intrón nuclear del factor de transcripción 1 $\alpha$  para examinar los impactos glaciales del Pleistoceno en el patrón filogeográfico. Esta especie presentó estructuración genética la cual se asoció al efecto de las glaciaciones. Es importante resaltar que esta especie presenta, a diferencia de *C. angulatus*, desarrollo directo, lo que podría generar una dispersión restringida y mayor estructuración genética. En este sentido, las glaciaciones generaron diferentes patrones genéticos en diferentes grupos animales dependiendo de sus características de historia de vida y distribución. Las huellas que ha dejado el Último Máximo Glaciar (UMG) en la costa Pacífica fue mayor que en la costa Atlántica por la presencia del casquete de hielo hasta la latitud 42°S la cual desplazó las poblaciones de diferentes grupos generando mayor diversificación (e.g. el alga parda *Durvillea antartida*, Fraser *et al.*, 2009; el alga roja *Mazzaella laminarioides* Montecinos *et al.*, 2012), aunque también hay evidencia de ausencia de estructuración en algunos grupos con ciertas características de historia de vida. En el Atlántico, durante el UMG, la línea de costa se corrió cientos de kilómetros hacia el este, pero nunca fue glaciada (Rostami *et al.*, 2000). Tanto en la costa Pacífica como Atlántica, existen varios estudios que ponen en evidencia la ausencia de estructura genética utilizando el gen COXI en varios grupos animales, por ejemplo: el róbalo *Eleginops maclovinus* (Ceballos *et al.*, 2012), el gasterópodo *Nacella magellanica* (de Aranzamendi *et al.*, 2011; González-Wevar *et al.*, 2011), el mejillín *Perumytilus purpuratus* (Trovant *et al.*, 2015) y en particular, en varias especies de cangrejos con etapa larval extendida (e.g. Cangrejo topo *Emerita análoga*; Cangrejo violáceo, *Petrolisthes violaceus* Haye *et al.*, 2014), como es el caso de *C. angulatus*. La falta de estructura en estos grupos estaría asociada al potencial dispersivo de estos grupos y a que, en el caso de la costa del Atlántico Sudoccidental, esta es una costa que fue colonizada recientemente, luego del UMG y en la costa Pacífica. Futuros estudios que



incluyan otros genes de tasas de evolución más altas y reloj molecular permitiría dilucidar el efecto de las glaciaciones en la diferenciación genética encontrada al sur de la distribución del cangrejo de las rocas.

Otra de las razones que podría explicar una mayor diferenciación genética al sur que al norte de los Golfos norpatagónicos está relacionada a los procesos oceanográficos (es decir, corrientes, frentes, giros, remolinos, etc.) que varían en escalas temporales y geográficas (Dalongeville *et al.*, 2018). Estos procesos podrían actuar como un mecanismo físico que afecta la advección/retención de las primeras etapas de la vida (e.g., larvas planctónicas), definiendo vías de dispersión, barreras y zonas de retención, y dando forma a la estructura genética de las especies de invertebrados (Selkoe *et al.*, 2011). En el Océano Atlántico Sudoccidental, la plataforma continental argentina exhibe características oceanográficas costeras complejas. Mientras que la circulación general en esta área consiste en un flujo hacia el noreste (Matano *et al.*, 2010), la región del Golfo Patagónico Norte –San Matías, San José y Golfo Nuevo– se caracteriza por múltiples frentes y giros permanentes o estacionales (Acha *et al.*, 2004), los cuales podrían dar forma a la estructura genética de las especies. El frente de Valdés, un frente de marea estacional formado frente a Península Valdés y el giro del Golfo San Matías (Acha *et al.*, 2004), podría estar limitando la dispersión de larvas entre las localidades del norte (Montevideo, Mar Chiquita y Carmen de Patagones) y del sur (Río Chubut, Pto. Deseado) de *C. angulatus*. En este sentido, Getino y colaboradores (2021) utilizando microsatélites, encontraron diferencias genéticas sutiles entre los dos morfotipos de la vieira tehuelche y las asociaron a la presencia de este frente de mareas que, aunque es temporario, podría estar limitando el flujo génico entre las poblaciones del norte y del sur al igual que en *C. angulatus*. Asimismo, en el Río Chubut, la presencia de escolleras en su desembocadura podría ser un factor potencial que generaría una mayor diferenciación genética de esta población. Mientras que en el Golfo San Jorge se ha registrado un giro importante, el cual podría estar generando una retención larval en la región sur, explicando así la diferenciación genética encontrada de la población de Puerto Deseado con el resto de las localidades. En este sentido, Ciales y colaboradores (2019) realizaron modelos biofísicos de dispersión larval y encontraron que las trayectorias de las larvas de *Callinectes sapidus* mostraron una



variación interanual impulsada por la interacción de los vientos, las intrusiones de bucles de corrientes, con sus contrapartes ciclónicas, y la pluma del Río Mississippi contribuyendo a la conectividad entre las poblaciones del Golfo de México. Por el contrario, estudios genéticos realizados en el braquiuro, *Callinectes danae* (Portunidae), a lo largo de 7000 km de costa en el Atlántico Sudoccidental, encontraron una baja diferenciación genética a lo largo de su distribución, probablemente resultado del comportamiento de las hembras ovígeras, quienes migran mar adentro para liberar sus huevos, lo que puede aumentar las posibilidades de dispersión larval (Peres *et al.*, 2020). Por lo tanto, la conectividad entre las poblaciones parece depender de cada sistema biológico particular y debe ser estudiado teniendo en cuenta características de historia de vida y procesos físicos oceánicos del área en conjunto.

Los resultados del análogo del FST se reflejaron en el test de Mantel, ya que las distancias genéticas no se correlacionaron con las distancias geográficas. Por lo tanto, con la evidencia obtenida a partir del COXI no se puede dar soporte a un aislamiento por distancia en *C. angulatus*. Por el contrario, Iriarte y colaboradores (2012) investigaron la genética poblacional de una especie de cangrejo estuárico, *Neohelice granulata*, muy similar en hábitat y distribución que *C. angulatus*, y encontraron evidencia de aislamiento por distancia. Por otra parte, el análisis molecular de la varianza sugirió que las localidades no se agrupan entre sí de ningún modo en particular, ya que la mayor parte de la variabilidad genética fue observada dentro de las localidades (57-67%). Si bien se hipotetizó que el Río de la Plata, debido a su gran caudal y diferencias diarias en los niveles de salinidad, era una barrera para la larva planctónica, no se encontró evidencia de ello, ya que no existió diferenciación genética entre las poblaciones al norte y al sur del río. Similar a lo encontrado en este trabajo, Han y colaboradores (2015) estudiaron poblaciones del braquiuro de estuario asiático, *Charybdis japonica*, y no encontraron diferenciación genética significativa entre poblaciones a ambos lados de su río principal Yangtze. Por el contrario, Fang y colaboradores (2015) investigaron poblaciones de crustáceos estomatópodos de la especie *Oratosquilla oratoria* separados por el mismo río y hallaron estructura genética. Sin embargo, las localidades muestreadas en la presente tesis están separadas una distancia considerable por lo que futuros estudios que incluyan



localidades más cercanas entre sí, permitirían evaluar con mayor robustez si existe aislamiento por distancia, así como también si en el estudio se incluyeran marcadores neutrales.

En relación a la presencia de *C. angulatus* en agua dulce, hasta el momento, se ha estudiado el ciclo de vida completo en la laguna costera de Mar Chiquita (Anger *et al.*, 1994). Allí se observó que en los estuarios esta especie presenta una migración diádroma, donde la larva migra desde el estuario al mar a alimentarse y luego, retorna en su última etapa larval a asentarse en el estuario y/o río (en zonas cercanas al estuario) donde se desarrollaría hasta adulto. El hallazgo de *C. angulatus* a 112 km aguas adentro del Río Chubut y su presencia documentada desde hace como mínimo 50 años, genera preguntas acerca de su biología reproductiva. Las hipótesis posibles que se desprenden son: (1) Esta especie presenta una migración catádroma, como otras especies de la familia Vanuridae (e.g. *Paraeriocheir sinensis*), con juveniles migrando río arriba a alimentarse hasta madurar sexualmente y luego (1 a 3 años), adultos migrando río abajo para reproducirse en la zona estuárica (Ojaveer *et al.*, 2007) o, (2) Esta especie se encuentra en un proceso de adaptación local a hábitats de agua dulce. Futuros estudios incluyendo el estudio de su biología reproductiva y diversidad genética a lo largo del río podrían ayudar a dilucidar esta hipótesis.

La diversidad en la región parcial del gen COXI podría tener implicancias en el uso como código de barras, el cual permite identificar ejemplares de la misma especie y diferenciar especies cercanamente relacionadas, pero con grandes similitudes morfológicas. Para diferenciar las especies de crustáceos utilizando el COXI, Hebert y colaboradores (2003) propusieron un valor umbral del 2% de divergencia intraespecífica, siendo la divergencia interespecífica 10 veces la divergencia intraespecífica media (Hebert *et al.*, 2004). La distancia genética intraespecífica de las poblaciones de este estudio estuvo en el rango de 0,2-0,8% e interespecífica (entre las poblaciones) <1,1%, correspondiendo a valores típicos de variabilidad intraespecífica. Futuros estudios que intenten identificar un ejemplar podrán comparar las secuencias del gen COXI con las secuencias de este estudio, a partir del cálculo de la distancia inter e intraespecífica y así determinar si corresponde a la misma especie. Por otro lado, la diversidad en la región parcial del gen COXI podría tener implicancias en futuros estudios de ADN ambiental, los cuales permitirían obtener

información acerca de, entre otras cosas, identificación de ejemplares de esta especie que haya en baja densidad en el lugar no registrados previamente, sugiriendo la ampliación de su distribución geográfica (Yueyang-wu *et al.*, 2022).

Por último, a pesar de que el gen 16s no fue útil para poder analizar la genética poblacional de esta especie, sí permitió observar gráficamente la relación filogenética entre las especies del género. La red de haplotipos obtenida muestra que *C. affinis* y *C. altimanus* comparten el mismo haplotipo, dando soporte a los resultados encontrados por Spivak y Schubart (2003) y Huespe *et al.*, (2008), que a partir de datos morfométricos del caparacho, datos moleculares y de morfología de los huesecillos del molino gástrico indican que *C. affinis* es sinónimo de *C. altimanus*. Estas especies putativas corresponden a dos morfotipos distintos: uno más pequeño con una forma de carapacho cuadrada y de hábitat submareal (*C. Affinis*), y el otro de mayor tamaño y de hábitat intermareal (*C. altimanus*). Otros estudios realizados en crustáceos encontraron que también existen más de un ecomorfotipo por especie (e.g., en la langosta *Munida gregaria* de la Provincia Magallánica, Wang *et al.*, 2016; o en la centolla *Menaethius monoceros* del Mar Rojo, Amer, 2021). Asimismo, en este estudio el gen mitocondrial 16s rRNA demostró ser un buen código de barras para diferenciar especies del género *Cyrtograpsus*. Manikantan y colaboradores (2020) propusieron que las distancias genéticas interespecíficas para el gen 16s en crustáceos decápodos varía entre el 2 – 4% y el rango de distancias encontradas en este estudio entre *C. angulatus* y *C. affinis*, y entre *C. angulatus* y *C. altimanus*, fue aún superior a este (5,1- 5,4), mientras que, la distancia genética entre *C. affinis* y *C. altimanus* entre fue de 0,1%, dando soporte a los estudios citados anteriormente que indican que corresponden a la misma especie.

## 7.2 Análisis morfométricos

Dado que la muestra utilizada en esta tesis presentó individuos de distintas tallas, se evaluó la presencia de alometría. Los principales cambios en forma durante el periodo adulto en machos están asociados con cambios hacia orbitas más cerradas, la región rostral más ondulada, una expansión de la región media anterior hacia los laterales y la tercera espina con una rotación en dirección horizontal en los individuos de mayores tallas resultado respaldado por los análisis de regresión multivariada. Este tipo de variación en forma del carapacho está relacionada al patrón descrito



anteriormente para *C. angulatus* (Idaszkin *et al.*, 2013) y *C. altimanus-affinis* (Lezcano *et al.*, 2012), por lo que podría ser una característica del género. Sin embargo, el estudio alométrico no fue el objetivo de este trabajo por lo que se descartó este componente de las variables de forma (*shape*), utilizando los residuales de la regresión multivariada entre forma y tamaño. Por otra parte, la variabilidad en la forma del carapacho durante el desarrollo del cangrejo *C. altimanus*, fue documentada por Lezcano y colaboradores (2012). Dichos autores hallaron que el morfotipo más pequeño, *C. affinis*, presentó una forma del carapacho más cuadrada, mientras que la forma adulta, *C. altimanus*, fue más redondeada. Idaszkin y colaboradores (2013) describieron el crecimiento alométrico para machos y hembras de *C. angulatus*, donde los individuos de mayor tamaño fueron machos que presentaron un ensanchamiento del borde anterolateral y el acortamiento de la parte posterior, mientras que, los individuos de talla menores presentaron el sentido opuesto de cambio en forma. Además, dichos autores reportaron la presencia de dimorfismo sexual en la forma del carapacho libre de alometría.

El patrón de variación en la forma del carapacho a lo largo de la distribución geográfica reflejó diferencias significativas entre todas las localidades muestreadas. Si bien en este trabajo no se contó con datos ambientales específicos de los sitios de muestreo, es posible hipotetizar que distintas condiciones ambientales asociadas a microhábitats (por ejemplo, tipo de sustrato, nivel de turbiedad del agua) generan la expresión diferencial del fenotipo, lo cual quedó respaldada por las diferencias encontradas en las distancias fenotípicas (distancias de Mahalanobis) de a pares. En relación con lo planteado anteriormente, Zimmermann y colaboradores (2012) observaron que la especie de camarón *Macrobrachium australe* (Crustacea: Palaemonidae) presentó diferencias morfométricas entre dos tipos de hábitats lóticos y lénticos de la Isla Reunión en el Océano Índico. Además, en *C. angulatus*, Idaszkin y colaboradores (2013) observaron que a una microescala existen dos morfotipos, con diferencias mayormente en el borde posterior del carapacho y la parte anterior (área ocular y rostro), con una forma más elongada y proyectada anteroposteriormente en hábitats rocosos marinos y una forma más proyectada lateralmente para los hábitats de marismas de sedimento fino. Las marismas presentan condiciones físicas más similares con los ríos, que las costas rocosas, dado que en los canales principales de marea presentan corrientes y conservan agua durante la marea baja y es en este sitio

donde se encuentran los cangrejos en las marismas (Márquez com. Pers.). Por otro lado, 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). Asimismo, las localidades de Puerto Deseado y Playa Fracasso presentaron menor varianza fenotípica dentro de sus poblaciones observada en el CP1 y CP2, lo cual estaría indicando la presencia de un fenotipo más canalizado en los hábitats marinos independientemente de las diferencias ambientales dentro de los ambientes marinos. Entendiéndose a la canalización como la expresión de un mismo fenotipo por un mismo genotipo en diferentes ambientes (Willmore *et al.*, 2007), en contraposición al resto de las localidades con características opuestas que presentaron mayores niveles de plasticidad fenotípica. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis es necesario también incluir secuencias genéticas de Playa Fracasso.

A una escala latitudinal, se halló una falta de correlación entre las distancias morfométricas y geográficas, rechazándose la hipótesis de un aislamiento por distancia dada la evidencia obtenida a partir del COXI. Por otro lado, las localidades que se encontraron al norte de la distribución con menor distancia geográfica entre ellas (Montevideo, Mar Chiquita y Carmen de Patagones), presentaron menores distancias morfométricas, resultado respaldado por el análisis de conglomerados. Por lo tanto, se sugiere que los patrones morfométricos en las localidades del norte estarían asociados a factores ambientales similares entre sí o asociados a una menor diferenciación genética. Igualmente, se observó a lo largo del VC1 una tendencia a separar las localidades en el área del Golfo Nuevo en Península Valdés, área que delimita las provincias biogeográficas Argentina y Magallánica. Las localidades de la provincia biogeográfica Argentina: Montevideo, Mar Chiquita y Carmen de Patagones, presentaron valores positivos con formas más cuadradas visualizado en el VC1, mientras que, las localidades de la provincia Magallánica: Playa Fracasso, 28 de Julio y Puerto Deseado, presentaron valores negativos en el VC1 con formas circulares, con el eje anteroposterior proyectado. Por lo que, este tipo de variación posiblemente esté asociado a algunos factores ambientales diferenciales entre las dos provincias biogeográficas (Aguirre, *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados hallados en esta tesina concuerdan en que la forma del carapacho de *C. angulatus*, presenta una alta

plasticidad fenotípica a lo largo de su distribución y que cada localidad tiene una forma diferente del resto. Por el contrario, el análisis morfométrico realizado en *Neohelice granulata* no mostró un patrón geográfico de diferenciación morfológica, aunque hubo diferencias entre los sitios de muestreo (Ituarte *et al.*, 2012) a lo largo de su distribución en el Atlántico Sudoccidental.

Cuando se analizó el patrón de variaciones fenotípicas relativo al tipo de hábitat, se observó que los hábitats que se agruparon con menores distancias morfométricas fueron el río y estuario, respecto a las del ambiente marino, el cual fue el grupo más divergente. Las mayores diferencias entre las formas medias del hábitat marino se vieron reflejadas por formas más proyectadas en sentido anteroposterior y espinas menos angulosas, es decir, más cerradas a diferencia del estuario, y el río que presentan la forma opuesta. Las similitudes podrían deberse a que existen diferentes ciclos de vida para la especie donde algunas poblaciones (*e.g.*, VDJ y CDP) utilizan tanto el río como el estuario para desarrollarse (Spivak *et al.*, 2016), mientras que otras son completamente marinas (*e.g.*, DES y PFR). Cabe destacar que, como fuera enunciado anteriormente, los intermareales de Patagonia son unos de los ambientes más estresantes del mundo, por lo tanto, las formas divergentes del hábitat marino estarían reflejando dicha restricción (*constraint*) ambiental y esto queda evidenciado a lo largo de la VC1 (**Figura 16**). Entre los hábitats de río y estuario los principales factores ambientales que pueden estar asociados a las diferencias morfológicas son los parámetros de salinidad, niveles de oxígeno relacionados a condiciones de estrés en el VC1, y a factores hidrodinámicos en el VC2 (Spaargaren, 1999). Entre los crustáceos de río de la Familia Aeglidae, se demostró que los especímenes que viven en Río Negro presentan mayores tamaños y formas delgadas que aquellos que viven en diferentes lagos cordilleranos de la provincia de Neuquén (Giri & Loy, 2008). A su vez, las poblaciones de hábitats de río presentaron mayor variabilidad intra-poblacional que el hábitat lótico. Asimismo, Ringuelet (1949) agrega que *Aegla* sp. Presentó una tendencia al acortamiento del largo del rostro, es decir una reducción de la ornamentación, y al ancho de la parte lateral anterior del cefalotórax en los hábitats de rocas o estrato de arena en ríos y arroyos. Probablemente, estas diferencias morfológicas sean debidas a las diferencias hidrodinámicas de ambos sistemas, en relación con la velocidad de las corrientes de



agua. Parte de este tipo de variación se observa en el carapacho de *C. Angulatus* a lo largo de la VC2, donde el hábitat de estuario con menor energía hidrodinámica se ubica hacia los valores más negativos y presenta un rostro menos desarrollado (recto), comparado con el río y el mar con un rostro más cóncavo.

En aguas menos profundas, la fuerza de estas corrientes aumenta (Howard, 1983), como se observó en las localidades de 28 de Julio y Carmen de Patagones, por lo que las propiedades hidrodinámicas pueden ser cruciales en la supervivencia de una especie. Para cangrejos no nadadores, como *C. angulatus*, estos deben mantener contacto con el sustrato durante su locomoción ya que las fuerzas hidrodinámicas pueden desestabilizar sus posturas y velocidades, incluso cuando se movilizan en contra de las corrientes río arriba. Por lo tanto, las implicancias biológicas funcionales para los diferentes ángulos de orientación de las espinas serían diferentes, ya que aquellas espinas más angulosas aumentarían la capa límite, es decir, la zona de contacto entre el agua y el cuerpo del animal en donde hay mayores pérdidas de velocidad del fluido, en este caso debido a las ornamentaciones. Esta condición permitiría soportar la fuerza de arrastre de las corrientes de agua dulce en estas poblaciones eurihalinas y de río cuando están alimentándose en estos sitios y mientras utilizan sus pereiópodos como modo de fijación al sustrato. También, las diferencias de forma podrían deberse a fluctuaciones en los niveles de oxígeno entre aguas tranquilas y turbulentas. Sin embargo, se requieren realizar estudios a futuro para poner a prueba dichas hipótesis morfo-funcionales. Aunque las formas nadadoras son adaptaciones muy extendidas en Brachyura (Hartnoll, 1971), la mayor parte de los trabajos se han centrado en especies bentónicas caminadoras. El caso de mayor grado de adaptación morfológica hacia la natación se presenta en los Portunidae, donde las modificaciones afectan los pereiópodos y el carapacho. Se necesitarían realizar modelos hidrodinámicos como los expuestos por Blake (1985) en el cual midieron las velocidades críticas, la velocidad de deslizamiento y la velocidad de despegue con relación a las propiedades hidrodinámicas del carapacho en cangrejos Portunidos como *Callinectes sapidus*, *Cancer productus* y *Lopholithodes mandtii*. Este último posee una forma no hidrodinámica con múltiples ornamentaciones y presentó mayor resistencia activa al flujo de agua aferrándose al sustrato, caso que sería similar a nuestro objeto de estudio, mientras que, *C. sapidus* y *C. productus*, estaban adaptados a maximizar sus velocidades de desplazamiento



debido a que presentan una resistencia mínima que es compensada con altas velocidades de desplazamiento mayormente en posiciones laterales paralelas a la dirección del flujo de agua, aunque también pueden desplazarse más lentamente en posición perpendicular al flujo donde implica una mayor fuerza de fricción sobre la superficie del carapacho. En efecto, el aumento exitoso del tamaño del cuerpo y la disminución de la resistencia friccional, se presenta en cangrejos braquiuros que poseen una forma corporal aplanada y alargada, la cual es más aerodinámica y permitiría realizar movimientos horizontales del agua (Spaargaren, 1999).

### 7.3 Análisis genéticos y morfométricos

El análisis de correlación de Mantel reveló que no existe una correlación entre los patrones de diferenciación morfométrica y genética en *C. angulatus*, lo que sugiere que la variabilidad fenotípica observada en este trabajo de tesina podría ser producto de la variabilidad ambiental entre sitios y la plasticidad fenotípica de esta especie, o bien, que este gen no estaría asociado o no reflejaría la variabilidad encontrada en los caracteres morfométricos estudiados. Por el contrario, se encontró una correlación entre las distancias morfométricas y genéticas en *Carcinus maenas* distribuido en las costas de Reino Unido (Brian *et al.*, 2006). Asimismo, Marchiori y colaboradores (2014) estudiaron diferentes poblaciones de la langosta de río, *Aegla longirostri* (Decapoda: Anomura), del sur de Brasil y observaron una asociación entre diferencias genéticas y morfométricas. Los autores sugirieron que estas se hallan en un proceso de especiación o que se trataría de especies crípticas. Mientras que, Silva y colaboradores (2010) estudiaron la especie de cangrejo *Perisesarma guttatum* (Brachyura: Sesarmidae) de las costas del SE africano, donde las poblaciones no presentaron diferenciación genética ni tampoco diferencias morfométricas a lo largo de varios cientos de kilómetros de costa. Finalmente, en relación a la asociación entre los patrones de variación morfométrica y genética no parece haber una regla general para los crustáceos decápodos, por el contrario, parecen depender de su historia evolutiva, características de historia de vida y ambiente.

Finalmente, en un muestreo de una clina latitudinal considerando solo un tipo de hábitat, podría haberse observado un aislamiento por distancia y que este, posiblemente no se detecte producto de que en esta tesis se incorporaron sitios que presentan mucha variación. Sin embargo, la utilización de ambientes contrastantes



fue parte del objetivo de esta tesis para evaluar las diferencias fenotípicas y genéticas en *C. angulatus*. Si se hubieran encontrado diferencias muy marcadas entre cada tipo de ambiente, sería la señal para luego realizar estudios en cada ambiente por separado. En este caso, los resultados de la parte genética no mostraron diferencias entre tipos de ambientes, y en la parte morfométrica solo en la marina se vieron diferencias marcadas, mientras que, en el río y estuario, se vieron mayores similitudes. Por otro lado, esta especie tiene larva planctónica marina por lo que independientemente de su presencia en el río o en el estuario, la evidencia del grupo sugiere que para completar su ciclo de vida (etapa dispersiva) dependen del mar. Los resultados de este estudio son evidencia de eso, ya que muestran que no hay clados diferenciados, sino que es la misma especie a lo largo de toda la distribución. Por otra parte, las localidades muestreadas están separadas una distancia considerable por lo que futuros estudios que incluyan localidades más cercanas entre sí, permitirían evaluar con mayor robustez si existe aislamiento por distancia, así como también si en el estudio se incluyeran marcadores neutrales.

## 8. Conclusiones

Las principales contribuciones de este trabajo fueron comprender los patrones de diversidad genética y morfométrica del cangrejo de las rocas a lo largo de su distribución en el Atlántico Sudoccidental y dilucidar los factores que contribuyen a la variación de la forma y condicionan la conectividad entre las poblaciones. A pesar de que las características de la historia de vida (e.g. etapa larval planctónica extendida) y el amplio rango de condiciones ambientales a las cuales está adaptado *C. angulatus* sugerían que entre sus poblaciones existiría una alta conectividad, por el contrario, se encontró una alta a moderada diferenciación genética entre sus poblaciones indicando flujo génico bajo y posibles fenómenos demográficos y/o adaptaciones locales. La historia geológica y las condiciones oceanográficas (e.g. frente Valdés, escolleras) podrían estar relacionadas. Se encontró evidencia de disminución de diversidad genética de norte a sur, sugiriendo que las poblaciones ubicadas más al norte han sido más grandes y estables en el tiempo que las ubicadas al sur, las cuales posiblemente hayan sufrido más los efectos del Último Máximo Glacial. Futuros estudios que incluyan un mayor tamaño muestral, localidades más cercanas y/o que



incluyan otros genes de tasas de evolución más altas y reloj molecular, ayudarían a mejorar la comprensión del efecto que habrían tenido ciertos eventos geológicos o ciclos glaciares pasados en la historia evolutiva de esta especie y a comprender si fenómenos demográficos y/o adaptaciones locales son las responsables de la diferenciación genética hallada.

El análisis morfométrico permitió determinar, mediante evidencias gráficas y analíticas, que existe un efecto de la localidad de donde provienen los individuos sobre la forma de estos. Asimismo, se corroboró la existencia de alometría en el crecimiento, pero extendiéndola a una macroescala geográfica. La falta de correlación entre matrices de distancias implicó que, el cangrejo de las rocas no presentó un patrón de variación en forma asociado a un gradiente latitudinal, ni tampoco una asociación con los índices de diferenciación genética. Se detectó una menor varianza fenotípica entre las poblaciones de localidades marinas que entre las de río y estuario. A partir de este resultado, se puede sugerir que la forma del caparacho de las poblaciones marinas estaría canalizada. En particular, se observó que la forma del caparacho en el hábitat marino fue la más diferente, siendo la forma del caparacho de los estuarios y ríos más parecidos entre sí.

Este estudio a macroescala es novedoso para *C. angulatus* y sirve de base para generar nuevas hipótesis y desarrollar futuros estudios enfocados en variaciones morfométricas de otros caracteres y en la conectividad utilizando otros marcadores a lo largo de la distribución de la especie. Esta tesis también demostró que los genes 16s y COXI podrían tener implicancias en el uso como código de barras ya que permitieron diferenciar entre las dos especies del género e identificar ejemplares de la misma especie, respectivamente. Además, el gen COXI podría ser útil en estudios de ADN ambiental para la identificación de ejemplares en áreas con baja densidad permitiendo ampliar el rango geográfico de la especie.

## 9. Agradecimientos

**A mis directores, Berenice y Federico por confiar en mí, su acompañamiento y enriquecerme de nuevos conocimientos.** A la Dra. Ivanna Tomasco (Universidad de la República) y Melina Trovant, quien ayudaron con la recolección de las muestras



de Montevideo, Uruguay. A la Dra. Andrea Gavio (Universidad de Mar del Plata), quien ayudó a la recolección de las muestras de Mar Chiquita. Al Dr. Néstor Basso (IDEAus-CONICET) y Lic. Luciano Real (IDEAus-CONICET) quienes nos ayudaron con la obtención del ADN y el procesamiento de las muestras. Al Dr. Daniel Ruzzante (Dalhousie University) quien brindó su ayuda para el secuenciamiento de parte de las secuencias de ADN. A Celia Beloso y la Dra. Ana Liberoff (IPEEC-CONICET) quienes ayudaron con la recolección de la muestra en el Río Chubut. Por último, a Víctor López, quien colaboró con el muestreo de Pto. Deseado.

A los docentes de Trelew y Puerto Madryn, quienes me motivaron a tomar el camino de la ciencia.

A Familiares, mamá y papá por bancarme en su casa. A mis amigxs que conocí hace diez años en la universidad, y por alentarme a no dejar la carrera. A los chicos de ingeniería, por la ayuda técnica. A mis amigxs que no son de la facu, yoguis, de bardas team. A Alfredo, Yoko, Rodinia y Ruffa del reino animalia, quienes me acompañaron en los tiempos libres.

## 10. Bibliografía

- Acha, E. M., Mianzan, H. W., Guerrero, R. A., Favero, M., & Bava, J. (2004). Marine fronts at the continental shelves of austral South America: physical and ecological processes. *Journal of Marine systems*, 44(1-2), 83-105.
- Aguirre, M. L., Perez, S. I., & Sirch, Y. N. (2006). Morphological variability of *Brachidontes swainson* (Bivalvia, Mytilidae) in the marine Quaternary of Argentina (SW Atlantic). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 239(1-2), 100-125.
- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692-4693.
- Amer, M.A. (2021). DNA barcoding of the spider crab *Menaethius monoceros* (Latreille, 1825) from the Red Sea, Egypt. *J Genet Eng Biotechnol*, 19, 42.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Barría, E., Sepúlveda, R., Jara, C. (2011). Morphologic variation in *Aegla* (Decapoda: Reptantia: Aeglidae) from central-southern Chile: Interspecific differences, sexual dimorphism, and spatial segregation. *J. Crustac. Biol*, 31(2), 231-239.
- Bertness, M.D., Crain, C.M., Silliman, B.R., Bazterrica, M.C., Reyna, M.V. & Hildago, F. (2006). The community structure of western atlantic patagonian rocky shores. *Ecological Monographs*, 76, 439-460.
- Beltrán, V. J., & Granada, J. C. (2016) Erosión marina en Playa Unión (Chubut-

- República Argentina): Análisis geohistórico y respuestas orientadas a su estabilización. *Párrafos Geográficos*, ISSN 1853-9424 15(2), 19.
- Blake, R. W. (1985). Crab carapace hydrodynamics. *Journal of Zoology*. 207(3), 407-423.
- Bonnet, E., & Van de Peer, Y. (2002). zt: A software tool for simple and partial mantel tests. *Journal of Statistical software*, 7(10), 1.
- Bookstein, E. L. (1991). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. *Cambridge Univ. Press, New York*, 435 pp
- Boschi, E. (1964). Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense (R. Argentina). *Bol. Inst. Biol. Mar. Mar de Plata*, 6, 1-100.
- Brian, J.V., T. Fernandes, Ladle, R.J. & Todd, P. A. (2006). Patterns of morphological and genetic variability in UK populations of the shore crab, *Carcinus maenas* Linnaeus, 1758 (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Journal of Experimental Marine Biology*, 329, 47–54.
- Ceballos, S. G., Lessa, E. P., Victorio, M. F. & Fernández, D. A. (2012). Phylogeography of the sub-Antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus*: evidence of population expansion. *Marine Biology*, 159(3) 499-505.
- Charlesworth, J., & Eyre-Walker, A. (2006). The rate of adaptive evolution in enteric bacteria. *Mol. Biol. Evol*, 23, 1348–1356.
- Crales, M. M., Chérubin, L., Gandy, R., Garavelli, L., Ghannami, M. A. & Crowley, C. (2019). Blue crab larval dispersal highlights population connectivity and implications for fishery management. *Marine Ecology Progress Series*, 625, 53-70.
- Dalongeville, A., Andrello, M., Mouillot, D., Lobreaux, S., Fortin, M. J., Lasram, F., & Manel, S. (2018). Geographic isolation and larval dispersal shape seascape genetic patterns differently according to spatial scale. *Evolutionary Applications*, 11(8), 1437-1447.
- Dana, J. D. (1851). *Conspectus crustaceorum quae in orbis terrarum circumnavigatione, Carolo Wilkes e classe Reipublicae Faederate Duce, lexit et descripsit. Crustacea Grapsoidea, (Cyclometopa, Edwardsii)*. Proceedings of the Academy of Natural Science of Philadelphia, 5(10), 247-254.
- De Aranzamendi, M. C., Bastida, R., & Gardenal, C. N. (2011). Different evolutionary histories in two sympatric limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) in the South-western Atlantic coast." *Marine Biology*. 158 (11), 2405-2418.
- Dellatorre, F. G., Pisoni, J. P., Barón, P. J. & Rivas, A. L. (2012). Tide and wind forced nearshore dynamics in Nuevo Gulf (Northern Patagonia, Argentina): Potential implications for cross-shore transport. *Journal of Marine Systems*, 96, 82-89.
- De Marco, S. G., Barral, P., Bó, J., Beltrame, O., de Armentia, A. M. L., Bazzini, S. M. & Marcovecchio, J. E. (2014). Vulnerabilidad de cuerpos de aguas superficiales en el sudeste de la provincia de Buenos Aires estudio preliminar de la cuenca de la laguna costera Mar Chiquita. *Geoquímica de la superficie argentina*, 70 pp.
- Diniz-Filho, J. A. F., Soares, T. N., Lima, J. S., Dobrovolski, R., Landeiro, V. L., Telles, M. P. D. C., & Bini, L. M. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and molecular biology*, 36, 475-485.
- D'Onofrio, E., Fiore, M., Di Biase, F., Grismeyer, W. & Saladino, A. (2010). Influencia de la marea astronómica sobre las variaciones del nivel del Río Negro en la zona de Carmen de Patagones. *Geoacta*, 35(2), 92-104.



- Excoffier, L. & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Fang, F., Ji, Y., Zhao, Q., Wang, Y., Gao, W., Chu, K. & Sun, H. (2015). Phylogeography of the Chinese endemic freshwater crab *Sinopotamon acutum* (Brachyura, Potamidae). *Zoologica Scripta*, 44(6), 653-666.
- Fasano, J.L., Hernández, M.A., Isla, F.I. & Schnack, E.J. (1982). Aspectos evolutivos y ambientales de la laguna Mar Chiquita (Provincia de Buenos Aires, Argentina). *Oceanologica Acta*, SP, 285-292.
- Favier-Dubois, C. M. F. & Scartascini, F. L. (2012). Intensive fishery scenarios on the north Patagonian coast (Río Negro, Argentina) during the mid-Holocene. *Quaternary International*, 256, 62-70.
- Fraser, C. I., Hay, C. H., Spencer, H. G., Waters, J. M. (2009). Genetic and morphological analyses of the southern bull kelp *Durvillaea antarctica* (phaeophyceae: durvillaeales) in new zealand reveal cryptic species 1. *Journal of Phycology*, 45(2), 436-443.
- Folmer, R. H. A., Nilges, M., Folkers, P. J. M., Konings, R. N. H. & Hilbers, C. W. (1994). A model of the complex between single-stranded DNA and the single-stranded DNA binding protein encoded by gene V of filamentous bacteriophage M13. *Journal of molecular biology*, 240(4), 341-357.
- Forster, M. (2020). Network 10.2.0.0. User Guide. *Fluxus Technology Ltd*, 58 pp.
- Futuyma, J. D. & Kirkpatrick, M. (2017). Evolution. 4<sup>th</sup> Ed. *Sinauer, Sunderland, MA: Sinauer Associates*, 594 pp.
- Fratini, S. & Vannini, M. (2002). Genetic differentiation in the swimming crab *Scylla serrata* (Decapoda: Portunidae) within the Indian Ocean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 272, 103-116.
- Fusi, M., Giomi, F., Babbini, S., Daffonchio, D., McQuaid, C. D., Porri, F. & Cannicci, S. (2015). Thermal specialization across large geographical scales predicts the resilience of mangrove crab populations to global warming. *Oikos*, 124(6), 784-795.
- Garrido-Garduño, T. & Vázquez-Domínguez, E. (2013). Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(3), 1031-1054.
- Gautreau, P. (2006). La Bahía de Montevideo: 150 años de modificación de un paisaje costero y subacuático. Bases para la conservación y manejo de la costa Uruguaya. *Vida Silvestre*, 401-411.
- Getino-Mamet, L. N., Soria, G. & Vega, A. M. (2021). Multiple-scale processes shape the population genetics of Tehuelche scallop, *Aequipecten tehuelchus*, in Northern Patagonia. *Fisheries Research*, 240, 11.
- Giri, F., Loy, A. (2008). Size and shape variation of two freshwater crabs in Argentinean Patagonia: The influence of sexual dimorphism, habitat, and species interactions. *J. Crustac. Biol*, 28(1), 37-45.
- González-Wevar, C. A., Nakano, T. J. I., Cañete, Poulin, E. (2011). Concerted genetic, morphological and ecological diversification in *Nacella limpets* in the Magellanic Province." *Molecular Ecology*, 20(9), 1936-1951.
- Gopurenko, D. & Hughes, J. M. (2002). Regional patterns of genetic structure among



- Australian populations of the mud crab, *Scylla serrata* (Crustacea: Decapoda): evidence from mitochondrial DNA. *Marine and freshwater research*, 53(5), 849-857.
- Gunz, P., Mitteroecker, P. & Bookstein, F. L. (2005). Semilandmarks in three dimensions. In *Modern morphometrics in physical anthropology* Springer, Boston, MA, 73-98pp.
- Hamilton, M. (2011). *Population Genetics*. 1st ed. Wiley. 424 pp.
- Han, Z., Zheng, W., Zhu, W., Yu, C., Shui, B. & Gao, T. (2015). A barrier to gene flow in the Asian paddle crab, *Charybdis japonica*, in the Yellow Sea. *ICES Journal of Marine Science*, (72), 1440–1448.
- Haye, P. A., Segovia, N. I., Muñoz-Herrera, N. C., Gálvez, F. E., Martínez, A., Meynard, A. & Faugeron, S. (2014). Phylogeographic structure in benthic marine invertebrates of the southeast Pacific coast of Chile with differing dispersal potential. *PLoS One*, 9(2), e88613.
- Hartnoll, R. G. (1971). The occurrence, methods and significance of swimming in the Brachyura. *Animal Behaviour*, 19(1), 34-50.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S. & De Waard, G. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270.suppl\_1: S96-S99.
- Hebert, P., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T.S., Francis, C.M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, 2:1657-1668.
- Hedrick, P. W. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 59, 1633–1638 pp.
- Hines, A. H. (1989). Geographic variation in size at maturity in brachyuran crabs. *Marine Science*, 45(2), 356-368.
- Howard, A. E. & Nunny, R. S. (1983). Effects of near-bed current speeds on the distribution and behaviour of the lobster, *Homarus gammarus* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 71(1), 27-42.
- Huespe, A., Gómez-Simes, E. & Pastor-de-Ward, C. (2008). Gastric mill morphology in the genus *Cyrtograpsus* (Crustacea: Decapoda: Grapsoidea: Varunidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(2), 311-319.
- Idaszkin, Y. L., Márquez, F. & Nocera, A. C. (2013). Habitat-specific shape variation in the carapace of the crab *Cyrtograpsus angulatus*. *Journal of Zoology*, 290(2), 117-126.
- Isla, F., Iantanos, N. & Estrada, E. (2004). Dinámica submareal y condiciones ambientales de la ría Deseado, Santa Cruz. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, 59(3), 367-375.
- Ituarte, R. B., D' Anatro, A., Luppi, T. A., Ribeiro, P. D., Spivak, E. D., Iribarne, O. O. & Lessa, E. P. (2012). Population structure of the SW Atlantic estuarine crab *Neohelice granulata* throughout its range: a genetic and morphometric study. *Estuaries and Coasts*, 35(5), 1249-1260.
- Jones, L. R., Manrique, J.M., Uyua, N.M., Whitton, B.A. (2019). Genetic analysis of the invasive alga *Didymosphenia geminata* in Southern Argentina: Evidence of a Pleistocene origin of local lineages. *Scientific reports*, 9(1), 1-13.
- Kalass, G., Matamala, F., Monteros, B. & Greco, W. (2008). Cambios hidrológicos y morfológicos en el Río Chubut aguas abajo de la presa Florentino Ameghino. V

- Congreso Argentino de Presas y Aprovechamientos Hidroeléctricos, Tucumán, Argentina, 12 pp.
- Keightley, P. D. & Eyre-Walker, A. (2012). Estimating the rate of adaptive molecular evolution when the evolutionary divergence between species is small. *J. Mol. Evol.* 74, 61–68.
- Klautau, M., Russo, C., Lazoski, C., Boury- Esnault, N., Thorpe, J. P., Sole' -Cava, A. M. (1999). Does cosmopolitanism in morphologically simple species result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution*, 53, 1414– 1422.
- Kimura, M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. *Cambridge Univ. Press*, 29 pp
- Klingenberg, C. P. & McIntyre, G. S. (1998). Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods. *Evolution*, 52(5), 1363-1375.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2), 353-357.
- Kühnemann, O. (1969). Vegetación marina de la Ría de Puerto Deseado. *Opera Lilloana*, 17, 123 pp.
- Lanteri, A., & Confalonieri, V. (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía, 185-194.
- Lessa, E. P., D' Elía, G. & Pardinás, U. F. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology*, 19(15) 3031-3037.
- Lezcano, A. H., González-José, R., Spivak, E. D. & Dellatorre, F. G. (2012). Geographic differences in the carapace shape of the crab *Cyrtograpsus affinis* (Decapoda: Varunidae) and its taxonomic implications. *Scientia Marina*, 76(2), 329-337.
- Li, A., Wang, C., Wang, W., Zhang, Z., Liu, M., She, Z. & Li, L. (2020). Molecular and fitness data reveal local adaptation of southern and northern estuarine oysters (*Crassostrea ariakensis*). *Frontiers in Marine Science*, 7, 589099.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Mahalanobis, P. C. (1948). Historical note on the D3 statistic. *Sankhya*:9: 237 pp.
- Manikantan, G., Prasanna, K. C., Vijaylaxmi, J., Pugazhendian, S., Prasanthi, N. (2020). Diversity, phylogeny and DNA barcoding of brachyuran crabs in artificially created mangrove environments. *BioRxiv*. 13, 291–301.
- Marchiori, A. B., Fornel, R. & Santos, S. (2015). Morphometric variation in allopatric populations of *Aegla platensis* (Crustacea: Decapoda: Anomura): possible evidence for cryptic speciation. *Zoomorphology*, 134(1), 45-53.
- Márquez, F. & Idazkin, Y.L. (2021) Crab carapace shape as a biomarker of salt marsh metals pollution, *Chemosphere*, 276, 7.
- Márquez, F. & Van Der Molen, S. (2011). Intraspecific shell-shape variation in the razor clam *Ensis macha* along the Patagonian coast. *Journal of Molluscan Studies*, 77(2), 123-128.
- Mashiko, K. (2000). Insights into the mechanism of speciation in gammarid crustaceans of Lake Baikal using a population-genetic approach. *Adv. Ecol. Res*, 31, 221-235.
- Matano, R. P., Palma, E. D. & Piola, A. R. (2010). The influence of the Brazil and Malvinas Currents on the Southwestern Atlantic Shelf circulation. *Ocean*



- Science*, 6(4), 983-995.
- Mayr, E., (1963). *Animal Species and Evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge, M.A, 797 pp.
- Michalakis, Y. & Excoffier, L. (1996). A Generic Estimation of Population Subdivision using distances between alleles with special references for microsatellite loci. *Genetics Society of America*, 142, 1061-1064.
- Miserendino, M. L. & Archangelsky, M. (2006). Seasonal and spatial distribution of stoneflies in the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Hydrobiologia*, 568(1), 263-274.
- Montecinos, A, Broitman, B. R., Faugeron, S., Haye, P. A., Tellier, F., Guillemin, M. L. (2012). Species replacement along a linear coastal habitat: phylogeography and speciation in the red alga *Mazzaella laminarioides* along the south east pacific. 12 (97), 17.
- Monteiro, L. R. (1999). Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Systematic Biology*, 48(1), 192-199.
- Nagy, G., Martínez, C. M., Caffera, M. R., Pedrosa, G., Forbes, E. A. & Perdomo, A. (1997). The hydrological and climatic setting of the Río de la Plata. In Wells, P. G. & Daborn, G. R. (Eds.), *The Río de la Plata, an environmental overview. An Ecoplata project background report*. Nova Scotia: Halifax, (Chapter 2), 2, 17-68 pp.
- Neethling, M., Matthee, C. A., Bowie, R. C. & Von der Heyden, S. (2008). Evidence for panmixia despite barriers to gene flow in the southern African endemic, *Caffrogobius caffer* (Teleostei: Gobiidae). *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1-9.
- Ojaveer, H., Gollasch, S., Jaanus, A., Kotta, J., Laine, A. O., Minde, A. & Panov, V. E. (2007). Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* in the Baltic Sea—a supply-side invader? *Biological invasions*, 9(4), 409-418.
- Orensanz, J., Ernst, B. & Armstrong, D. (2007). Variation of female size and stage at maturity in snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae) from the eastern Bering Sea. *J. Crustac. Biol*, 27(4), 576-591.
- Palumbi, S. R, Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O, Stice, L. & Grabowski, G. (1991). A simple fools guide to PCR, ver. 2.0. Special publication of the University of Hawaii. *Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory*, 46.
- Palumbi, S. R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual review of ecology and systematics*, 25(1), 547-572.
- Paula, J., Bartilotti, C., Dray, T., Macia, A. & Queiroga, H. (2004). Patterns of temporal occurrence of brachyuran crab larvae at Saco mangrove creek, Inhaca Island (South Mozambique): implications for flux and recruitment. *Journal of Plankton Research*, 26, 1163–1174.
- Pedroza, M., Pérez, L. & Springer, V. (2017). Prevalencia de huevos del género *Toxocara* spp. En arena de playas de Montevideo. *Tesis de grado*. Universidad de la República Facultad de Veterinaria, 46.
- Peres, P. A., Lopes, M., Negri, M., Robles, R., dos Santos, C. R. M. & Mantelatto, F. L. (2020). Lack of population genetic structure among Brazilian populations of *Callinectes danae* (Brachyura: Portunidae): implication for management and conservation. *Regional Studies in Marine Science*, (37), 101336, 9.
- Perillo, G., Piccolo, M. & Scapini, M. (1989). Hydrography and Circulation of the Chubut River Estuary (Argentina). *Estuaries and Coasts*. 12, 186-194 pp.
- Petit, R. J., Brewer, S., Bordács, S., Burg, K., Cheddadi, R., Coart, E., Cottrell, J., Csaikl, U., van Dam, B., Deans, J., Espinel, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Glaz,

- I., Goicoechea, P., Jensen, J., König, A., Lowe, A., Madsen, S., Mátyás, G., Munro, R., Popescu, F., Slade, D., Tabbener, H., de Vries, S., Ziegenhagen, B., de Beaulieu, J., Kremer, A. (2002). Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest ecology and management*, 156(3) 49-74.
- Philippe, H., Brinkmann, H., Lavrov, D., Littlewood, T., Wörheide, G., Baurain, D. (2011). Resolving difficult phylogenetic questions: why more sequences are not enough. *PLoS biology*, 9(3), e1000602.
- Polzin, T. & Daneshmand, S. V. (2003). On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, 31(1), 12-20.
- Postma, E. & van Noordwijk, A. J. (2005). Gene flow maintains a large genetic difference in clutch size at a small spatial scale. *Nature*, 433(7021), 65-68.
- Retamal, M. A. (1981). Catálogo Ilustrado de los Crustáceos Decápodos de Chile. *Gayana*, 110 pp.
- Quintela, M., Johansson, M. P., Kristjansson, B. K., Barreiro, R. & Laurila, A. (2014). AFLPs and mitochondrial haplotypes reveal local adaptation to extreme thermal environments in a freshwater gastropod. *PLoS One*, 9(7), e101821.
- Riginos, C. & Nachman, M. W. (2001). Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Molecular ecology*, 10(6), 1439-1453.
- Ringuelet, R. A. (1949). Los anomuros del género *Aegla* del noroeste de la República Argentina. *Revista del Museo de La Plata*, 45 pp.
- Rodriguez, M., Gómez, M., Verdi, A. & Muniz, P. (2002). Presencia de *Artemesia longinaris* (BATE, 1888) y *Peisos petrunkevitchi* (Burkenroad, 1945) (Crustacea, Decapoda) en aguas de baja salinidad en la costa de Montevideo. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 13, 21-24.
- Rohlf, F. J. & Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic biology*, 39(1), 40-59.
- Rostami, K., Peltier, W. R. & Mangini, A. (2000). Quaternary marine terraces, sea-level changes and uplift history of Patagonia, Argentina: comparisons with predictions of the ICE-4G (VM2) model of the global process of glacial isostatic adjustment. *Quaternary Science Reviews*, 19(15), 1495-1525.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Macchi, P.J., Alonso, M. & Barriga, J.P. (2011). Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: the roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 514529.
- Santinelli, N., Sastre, V. & Caille, G. (2005). Fitoplancton Del Estuario Inferior Del Río Chubut (Patagonia Argentina) y su relación con la salinidad y la temperatura. *Natura*, 1, 69-79.
- Sersic, A. N., Cosacov, A., Cocucci, A., Johnson, I. A., Pozner, R., Ávila, I. J.
- Sites, J. Q., Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 475-494.



- Schwindt, E., Bortolus, A., Idaszkin, Y. L., Savoya, V. & Mendez, M. M. (2009). Salt marsh colonization by a rocky shore invader: *Balanus glandula* Darwin (1854) spreads along the Patagonian coast. *Biol. Invasions*, 11, 1259-1265.
- Schubart, C. D., Cuesta, J. A. & Felder, D. L. (2002). Glyptograpsidae, a New Brachyuran Family from Central America: Larval and Adult Morphology, and a Molecular Phylogeny of the Grapsoidea, *Journal of Crustacean Biology*, 22(1), 28-44
- Schubart, C. D., Cuesta, J. A. & Rodríguez, A. (2001). Molecular phylogeny of the crab genus *Brachynotus* (Brachyura: Varunidae) based on the 16S rRNA gene. *Hydrobiologia*, 449(1), 41-46.
- Schubart, C. D., Neigel, J.E. & Felder, D.L. (2000). Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. In: von Vaupel Klein, J.C. & Schram, F. (Eds.), *Crustacean, The Biodiversity Crisis and Crustacea*, 12, 817-830.
- Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. (2011). Marine connectivity: a new look at pelagic larval duration and genetic metrics of dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, 436, 291-305.
- Silva, I. C., Mesquita, N. & Paula, J. (2010). Genetic and morphological differentiation of the mangrove crab *Perisesarma guttatum* (Brachyura: Sesamidae) along an East African latitudinal gradient. *Biological Journal of the Linnean Society*, 99(1), 28-46.
- Sinclair, M. & Iles, T. D. (1989). Population regulation and speciation in the oceans. *ICES Journal of Marine Science*, 45(2), 165-175.
- Slice, D. E. (1996). Three-dimensional generalized resistant fitting and the comparison of least-squares and resistant-fit residuals. *Springer*, Boston, MA. *Advances in morphometrics*, 179-199.
- Spaargaren, D. H. (1999). Shape and hydrodynamic properties in relation to size in marine macro-crustacea. *Crustaceana-International Journal of Crustacean Research*, 72, 203-214.
- Spivak, A. D. (2016). Los cangrejos marinos y estuarinos de la Argentina (Decapoda: Brachyura). *El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Los crustáceos de interés pesquero y otras especies relevantes en los ecosistemas marinos*. Ed: Boschi E. E. *Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero Ministerio de Agroindustria Mar del Plata*, República Argentina, 6, 271 pp
- Spivak, E. D., Luppi, T. A. & Bas, C. C. (2016). Los cangrejos (Decapoda: Brachyura): ecofisiología y ontogenia de los cangrejos de marismas y estuarios. *Los crustáceos de interés pesquero y otras especies relevantes en los ecosistemas marinos. El Mar Argentino y sus recursos pesqueros. Ministerio de Agroindustria Mar del Plata*. INIDEP. Ed: Boschi E.E, (6), 27 pp.
- Spivak, E. D. & Schubart, C. D. (2003). Species status in question: a morphometric and molecular comparison of *Cyrtograpsus affinis* and *C. altimanus* (Decapoda, Brachyura, Varunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 23(1), 212-222.
- Spivak, E. D. (1999). Effects of reduced salinity on juvenile growth of two co-occurring congeneric grapsid crabs. *Marine Biology*, 134(2), 249-257.
- Spivak, E., Anger, K., Luppi, T., Bas, C. & Ismael, D. (1994). Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of Buenos Aires, Argentina). *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 48(1), 59-78.
- Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 597-601.



- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1596-1599.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1997). Clustal X multiple sequence alignment program. *European Molecular Biology Organization, Hamburg, Germany. Nucleic Acids Res.*, 25, 4876–4882.
- Trovant, B., Orensanz, J.M., Ruzzante, D. E., Stotz, W., Basso, N. G., (2015). *Scorched mussels* (Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae) from the temperate coasts of South America: phylogenetic relationships, trans-Pacific connections and the footprints of Quaternary glaciations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 60-74.
- Valdano, S. G. & Di Rienzo, J. (2007). Discovering meaningful groups in hierarchical cluster analysis. An extension to the multivariate case of a multiple comparison method based on cluster analysis. *InterStat*, 4, 1-28.
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T. & Gutiérrez-García, T. A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de historia natural*, 82(2), 277-297.
- Vélez Agudelo, C. A. (2019). Distribución de diatomeas en sistemas estuariales y fluviales asociados del norte de la Patagonia: implicancias en las reconstrucciones cuantitativas de paleoambientes Holocenos. Ph. D. *Thesis*. Mar del Plata University, Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNMdP, 234.
- Wang, C., Agrawal, S., Laudien, J., Häussermann, V. & Held, C. (2016). Discrete phenotypes are not underpinned by genome-wide genetic differentiation in the squat lobster *Munida gregaria* (Crustacea: Decapoda: Munididae): a multimarker study covering the Patagonian shelf. *BMC Evol Biol*, (258), 16.
- Willmore, K. E., Young, N. M. & Richtsmeier, J. T. (2007). Phenotypic variability: its components, measurement and underlying developmental processes. *Evolutionary Biology*, 34(3), 99-120.
- Wright, S. (1968), Evolution and the Genetics of Populations. Genetic and Biometric Foundations. *The Univ. of Chicago Press, Chicago*, 1, 480 pp.
- Xia, X., (2000). Data analysis in molecular biology and evolution. *Kluwer Academic Publishers, Boston*, 296 pp.
- Xia, Xuhua, & Philippe, Lemey. (2009). Assessing substitution saturation with DAMBE. In: Lemey, P., Salemi, M. & Vandamme, A. (Eds.), *The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny. Cambridge, Univ. Press*, (Chapter 20), 615-630 pp.
- Xia, Xuhua. (2013). DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular biology and evolution*, 30(7) 1720-1728.
- Xu, J., Pérez-Losada, M., Jara, C. G. & Crandall, K. A. (2009). Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. *Molecular ecology*, 18(5), 904-918.
- Yueyang-wu., S. F, Colborne, M. R., Charron, Heath, D. D. (2022). Development and validation of targeted environmental DNA (eDNA) metabarcoding for early detection of 69 invasive fishes and aquatic invertebrates. *Environmental DNA*, 0,1–12.

Zelditch, M. L., Lundrigan, B. L. & Garland, J. T. (2004). Developmental regulation of skull morphology. I. Ontogenetic dynamics of variance. *Evolution & development*, 6(3), 194-206.

Zimmermann, G., Bosc, P., Valade, P., Cornette, R., Améziane, N. & Debat, V. (2012). Geometric morphometrics of carapace of *Macrobrachium australe* (Crustacea: Palaemonidae) from Reunion Island. *Acta Zoológica*, 93(4), 492-500.

## 11. Material suplementario

**Tabla S1.** Prueba de saturación de sustitución para las regiones parciales de los genes: a) *C. angulatus* ARNr 16s, b) Género *Cyrtograpsus* y c) *C. angulatus* COXI, efectuada en DAMBE. NumOTU = número de subconjunto de secuencias, lss = índice simple de saturación de sustitución, lss.cSym = índice crítico de saturación de sustitución suponiendo una topología de árbol simétrica, lss.cAsym = índice crítico de saturación de sustitución suponiendo una topología de árbol asimétrica, T = valor t, DF = grados de libertad, p = p -valor.

a)

Test saturación componente simétrico	Prop. Sitios invariables	Media H	EE	Hmax	lss	lss.c	T	DF	Prob (Dos-colas)	95% Lím. Inf.	95% Lím. Sup.
	0	0,0039	0,0027	1,021	0,0038	0,801	292,5072	475	0	-0,0016	0,0091

Test saturación componente asimétrico	Iss.c	T	DF	Prob (Dos-colas)	95% Lím. Inf.	95% Lím. Sup.
	0,7905	288,6708	475	0	-0,0016	0,0091

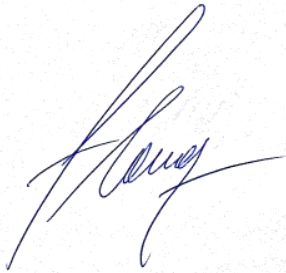
b)

Test saturación componente simétrico	Prop. Sitios invariables	Media H	EE	Hmax	Iss	Iss.c	T	DF	Prob (Dos-colas)	95% Lím. Inf.	95% Lím. Sup.
	0	0,3683	0,0162	1,4947	0,2464	0,7507	31,0837	475	0	0,2145	0,2782

Test saturación componente asimétrico	lss.c	T	DF	Prob (Dos-colas)	95% Lím. Inf.	95% Lím. Sup.
	0,6571	25,3182	475	0	0,2145	0,2782

c)

NumOTU	lss	lss.cSym	T	DF	p	lss.cAsym	T	DF	p
4	0,156	0,807	44,016	696	0,000	0,776	41,917	696	0,000
8	0,135	0,769	43,560	696	0,000	0,659	36,056	696	0,000
16	0,129	0,749	44,142	696	0,000	0,540	29,270	696	0,000
32	0,133	0,722	41,482	696	0,000	0,398	18,647	696	0,000



**Alumna: Florencia Alvarez Gallego**



Directora: Dra. Berenice Trovant



Co-Director: Dr. Federico Márquez



Asesor: Dr. Marcelo F. Tejedor



Co-Asesora: Dra. María Eva Góngora