



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE BIOQUIMICA Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en
Ciencias Biológicas**

**Estudios filogeográficos en cangrejos de agua dulce de la familia
Aeglidae**

Lic. Gisela Loretán

Director: Dr. Federico Giri
Codirector: Dra. Eva Carolina Rueda

**Instituto Nacional de Limnología
(INALI-CONICET-UNL)
Laboratorio de Macrocrustáceos**

-2020-

Agradecimientos

A...

La Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, sede del Doctorado en Ciencias Biológicas.

El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la beca otorgada para la realización de este Doctorado.

Eva, por sus conocimientos, su tiempo y su ayuda tanto en lo académico como en lo no académico

Fede por su curiosidad, compañerismo, por su sencillez y por haberme tratado siempre como a su igual animándome a tomar las decisiones en esta tesis

Pablo, por haber confiado en mí para realizar este doctorado y por su acompañamiento en todo este trayecto

Marcos, por su confianza, por su apoyo, por su humildad y por haberme hecho sentir en casa estando lejos

A Georgina Tumini, por contribuir con los análisis de morfometría geométrica y por las charlas tesinísticas y catárticas

Pato, por charlas de café a la siesta

Pauli, Caro y Pame, por ser mis amigas precarias y por su sostén invaluable en el doctorado

Los integrantes del Laboratorio de Genética de la FHUC y del Laboratorio de Macrocrustáceos del INALI: por ser familia

Al Crandall's laboratory del Science and Engineering Hall de George Washington University, por permitirme hacer gran parte de mi trabajo de laboratorio allí

Al jurado de esta tesis por sus valiosos aportes

Mis padres, Liliana y José Luis, por el esfuerzo, por las enseñanzas y por el amor por el cual nunca bajé los brazos. Por ser hombro y oreja. Por ellos soy quien soy

Maxi, mi amor, mi compañero de vida, por el apoyo constante y la confianza y por haberme dado una familia

Milo, mi eje, por llegar y poner las cosas en su lugar, por mostrarme lo que realmente importa en esta vida, por su sonrisa llena de luz y sus miradas de amor

Jo, Pame, Ali, Maxi y Migue, por su amistad, sus escuchas y consejos en estos años

Cami, Yaz y Mariela, por haber sido niñeras para que yo pudiera terminar esta tesis y por escucharme rezongar todos los días

Luna, Bilbo, Titina, Chiquita, Greta, Lilah y Arturo... Por su amistad animal, por ser bálsamo en momentos difíciles, por su lealtad y compañerismo

Los que ya no están, pero siempre me acompañan

Publicaciones

Loretán, Gisela, EC Rueda, JM Cabrera, M Pérez-Losada, PA Collins, F Giri (2020) Geographical isolation and restricted gene flow drive speciation of *Aegla singularis* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) in southern South America. *Biological Journal of the Linnean Society* 129 (1): 177-189.

Índice

<u>Abreviaturas y símbolos</u>	1
<u>Resumen</u>	2
<u>Abstract</u>	5
<u>Introducción general</u>	7
<u>Objetivos, hipótesis y predicciones</u>	11
<u>Materiales y Métodos</u>	12
1. Metodologías moleculares	12
Extracción de ADN genómico	14
Selección de marcadores nucleares y mitocondriales. Descripción del protocolo de amplificación mediante PCR	17
Análisis con marcadores mitocondriales y marcador nuclear	19
Diseño y optimización de marcadores microsatélites	20
Análisis con marcadores microsatélites	23
2. Metodologías geomorfométricas	24
Breve descripción de los programas utilizados en los análisis morfométricos	25
CAPÍTULO 1: <i>AEGLA SINGULARIS</i>: MODELO DE EVOLUCIÓN POR AISLAMIENTO GEOGRÁFICO	27
1. Introducción	28
2. Objetivos	30
3. Materiales y métodos	30
3.1 Muestreo y colección de especímenes	30
3.2 Análisis de diversidad genética	33
3.3 Análisis filogeográficos	34
3.4 Análisis de la variación de forma y tamaño	34
4. Resultados	36
4.1 Estimación de la diversidad genética	36
4.2 Análisis filogeográficos	36

4.3 Variación de forma y tamaño	39
5. Discusión	45
6. Conclusiones	48
CAPÍTULO 2: DIVERSIDAD OCULTA EN LOS ARROYOS MISIONEROS	49
1. Introducción	50
2. Objetivos	51
3. Materiales y métodos	51
3.1 Análisis de la variabilidad y estructura genética	52
3.2 Análisis de las variaciones de forma	54
4. Resultados	55
4.1 Análisis de la variabilidad y estructura genética	55
4.2 Análisis de la variación de forma entre los grupos	61
5. Discusión	62
6. Conclusiones	65
CAPÍTULO 4: AÉGLIDOS CUYANOS: PIONEROS COLONIZADORES	66
1. Introducción	67
2. Objetivos	69
3. Materiales y métodos	69
3.1 Colección de muestras	69
3.2 Extracción de ADN, métodos de amplificación y secuenciación/genotipificación	73
3.3 Análisis de la diversidad genética, estructura poblacional y filogeografía	73
4. Resultados	74
4.1 Análisis de la variabilidad genética y estructura poblacional	74
4.2 Árboles filogenéticos y distribución geográfica de haplotipos	78

5. Discusión	82
6. Conclusiones	87
CONCLUSIONES FINALES	88
ANEXO A1	89
ANEXO A2	90
BIBLIOGRAFÍA	92

Abreviaturas y símbolos

Abreviatura	Concepto
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
COI	Citocromo Oxidasa I
COII	Citocromo Oxidasa II
EF α 1	Intrón del factor de elongación alfa 1
Rpm	Revoluciones por Minuto
ul	Microlitros
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ml	Mililitros
SDS	Dodecilsulfato sódico
ng	Nanogramos
ARNt	ARN de transferencia
Cl ₂ Mg	Cloruro de Magnesio
dNTPs	Nucleósido trifosfato
U	unidades
Min	minutos
°C	Grados Celsius
pb	Pares de bases
PCA	Análisis de Componentes Principales
LDA	Análisis Discriminante Lineal
Mp	Megapíxeles
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ADNnu	ADN nuclear
ADNmt	ADN mitocondrial
RAPD	<i>Random Amplified Polimorphism DNA</i>
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
GPA	Análisis de Procrustes Generalizado
Ma	Millones de años

Resumen

Los eventos modeladores del paisaje, como ingresiones marinas y glaciaciones, que afectaron América del Sur desde el Mioceno hasta fechas recientes, determinaron la estructura actual de los ambientes acuáticos continentales, influenciando la dinámica y la evolución de las especies presentes. Los momentos y las circunstancias de la evolución de los decápodos de agua dulce han variado según el grupo en particular. La interrupción del flujo génico (aislamiento), producto de estos eventos geoclimáticos, sería una de las causas de la riqueza de los decápodos dulceacuícolas de determinadas familias, ya que presenta un escenario propicio para la especiación. El origen, distribución y diversificación de *Aegla* han sido y son motivo de discusión y las relaciones filogenéticas de sus especies han intrigado a los biólogos durante mucho tiempo. Los cangrejos de agua dulce de la familia Aeglidae tienen características que los convierten en un grupo muy adecuado para estudios evolutivos: algunas especies muestran altos niveles de endemismo y requerimientos de hábitat específicos, es la única familia de anomuros completamente restringida a ambientes de agua dulce, su posición taxonómica está en disputa y muchas de sus especies están amenazadas y, desde un punto de vista morfológico, porque poseen caracteres particulares en el cefalotórax y las branquias.

La evolución de los decápodos de agua dulce se puede caracterizar mediante estudios genéticos, utilizando marcadores moleculares. La filogeografía, que integra la genética de poblaciones y la filogenética desde una perspectiva geográfica, es una herramienta que puede ayudar a determinar el origen y radiación de las especies. Por otra parte, la morfometría geométrica como herramienta de estudio ha permitido identificar diferencias intra e interespecíficas en el cefalotórax de crustáceos, por lo que complementa la información que brindan los marcadores moleculares. El cefalotórax del género *Aegla* posiblemente sea la característica más notable del grupo, ya que puede variar dentro de una misma especie y entre especies; asimismo, los crustáceos poseen duros exoesqueletos que permiten obtener medidas precisas y, frecuentemente, están adornados por evidentes espinas. Estas características hacen que el grupo sea un candidato excelente para los análisis de forma mediante morfometría geométrica. La potencialidad del uso complementario de metodologías moleculares y morfométricas promueve la capacidad de discusión basada en evidencias sobre diferentes aspectos de la evolución de las especies, permitiendo esclarecer la historia y el futuro de los crustáceos dulceacuícolas de América del Sur.

En el marco de esta tesis se optimizaron los métodos moleculares que se utilizaron posteriormente en los análisis filogeográficos: dos marcadores mitocondriales previamente descritos (genes que codifican para citocromo oxidasa I y II), un intrón nuclear (intrón del factor de elongación alfa 1), y se diseñaron 10 nuevos marcadores microsatélites en base a la secuenciación parcial de

genomas de especies del género *Aegla*. A estas herramientas moleculares se les incorporó, en algunos casos, análisis de morfometría geométrica con el fin de complementar los resultados obtenidos.

La primera especie estudiada fue *Aegla singularis*, de distribución restringida al sur de la provincia de Misiones, Argentina, que habita los cuerpos de agua de las cuencas del Uruguay y del Paraná, separadas en toda la longitud de su distribución por una cadena montañosa. Los análisis revelaron una alta estructuración genética y diferencias de forma y tamaño entre los especímenes de los sitios analizados lo cual sugiere que las poblaciones de dichas cuencas están evolucionando de forma separada y que estarían en proceso de especiación. Estos resultados muestran que actualmente existen dos linajes genéticos de *A. singularis*, correlacionados con su origen geográfico.

Por otro lado, entre las poblaciones de *Aegla* colectadas en Misiones, se encontraron ejemplares que fueron catalogados como *Aegla sp.*, ya que la clasificación mediante claves sistemáticas mostraba que poseían tanto caracteres diagnósticos de *A. platensis* como *A. singularis* (especies simpátridas en dicha región). Utilizando las herramientas moleculares y de morfometría geométrica, se pudo concluir que *Aegla sp.* era más similar al linaje “Uruguay” de *A. singularis* definido en esta tesis. Es decir que, a pesar de tener caracteres diagnósticos intermedios, estos individuos en realidad son una variación intraespecífica del grupo *A. singularis* cuyo origen geográfico es de la cuenca del “Uruguay”.

Finalmente, se analizó una especie con características y distribución geográfica diferente a *A. singularis*. *Aegla scamosa*, habita los ríos y arroyos de la cuenca del río Desaguadero en la zona de Cuyo de Argentina. En esta especie, los resultados mostraron que además de una estructuración genética entre las subcuencas en estudio, había diferencias según las herramientas utilizadas; la evidencia nuclear, que refleja mayor estructura, estaría mostrando la distribución de los linajes de estos aéglicos cuando los ríos de las subcuencas se hallaban separados y con flujo génico limitado entre las poblaciones. Por otra parte, la información de la mitocondria, que muestra el pasado intermedio, pone en evidencia la unión de los ríos posterior al levantamiento de los Andes, con el consiguiente aumento de la conectividad de los sistemas y el mayor flujo genético entre las poblaciones.

Los aportes presentados demostraron, en primer lugar, que es de suma importancia utilizar variedad de herramientas tanto moleculares como de morfometría geométrica para responder a las hipótesis y objetivos planteados en torno a preguntas filogeográficas. Los resultados encontrados por dichas herramientas pueden concordar, dando robustez a los estudios, o disentir, mostrando diferentes patrones evolutivos que experimentaron las poblaciones. En todos los casos, los análisis se enriquecen y las conclusiones que pueden extraerse son más amplias y mejor soportadas por la evidencia. Por otra parte, el estudio de la filogeografía la familia Aeglidae demuestra que los eventos geoclimáticos

que ocurridos en su área de distribución fueron una de las causas de su actual diversidad de especies. Sin embargo, la gran diversidad genética y variación morfológica que tienen estos cangrejos también fueron un elemento clave en la gran radiación y colonización de ambientes que marcaron la historia evolutiva de la familia.

Abstract

Landscape modeling events, such as marine ingress and glaciations, that affected South America from the Miocene to the present, determined the current structure of continental aquatic environments, influencing the dynamics and evolution of current species. Moments and circumstances of freshwater decapods evolution have varied according to the particular group. The gene flow interruption (isolation), product of these geoclimatic events, would be one of the causes of the freshwater decapods richness of certain families, since it presents a favorable scenario for speciation. The origin, distribution and diversification of *Aegla* have been and are the subject of discussion and the phylogenetic relationships of its species have intrigued biologists for a long time. Freshwater crabs in the Aeglididae family have characteristics that make them a very suitable group for evolutionary studies: some species show high levels of endemism and specific habitat requirements, it is the only anomuran family completely restricted to freshwater environments, their taxonomic position is in dispute and many of their species are threatened and, from a morphological point of view, they have particular characteristics in the cephalothorax and the gills.

Freshwater decapods evolution can be characterized by genetic studies, using molecular markers. Phylogeography, which integrates population genetics and phylogenetics from a geographic perspective, is a tool that can help to determine the species origin and radiation. On the other hand, geometric morphometrics as a study tool has allowed to identify intra and interspecific differences in crustaceans cephalothorax, thus complementing the information provided by molecular markers. The cephalothorax of the genus *Aegla* is possibly the most notable characteristic of the group, since it can vary within the same species and between species. Likewise, crustaceans have hard exoskeletons that allow precise measurements to be obtained and, frequently, they are adorned with evident spines. These characteristics make the group an excellent candidate for shape analyzes using geometric morphometrics. The potentiality of the complementary use of molecular and morphometric methodologies promotes the capacity of discussion based on evidences on different aspects of the evolution of the species, allowing to clarify the history and future of freshwater crustaceans of South America.

In this thesis framework, molecular methods that were subsequently used in the phylogeographic analyzes were optimized: two previously described mitochondrial markers (genes coding for cytochrome oxidase I and II), a nuclear intron (intron of the elongation factor alpha 1), and 10 new microsatellite markers were designed based on the partial sequencing of the genus *Aegla* genomes. To these molecular tools, in some cases, geometric morphometrics analysis was incorporated in order to complement the results obtained.

The first species studied was *Aegla singularis*, of restricted distribution to the south of the province of Misiones, Argentina, which inhabits the bodies of water of the Uruguay and Paraná basins, separated along the entire length of their distribution by a mountain chain. Analyzes revealed a high genetic structure and differences in shape and size among the analyzed sites specimens, which suggests that these basins populations are evolving separately and they would be in the speciation process. These results show that there are currently two genetic lineages of *A. singularis*, correlated with its geographical origin.

On the other hand, among *Aegla* populations collected in Misiones, specimens were found that were classified as *Aegla sp.*, since the classification using systematic keys showed that they had both diagnostic characters of *A. platensis* and *A. singularis* (sympatric species in that region). Using the molecular and geometric morphometrics tools, it was concluded that *Aegla sp.* it was more similar to the “Uruguay” lineage of *A. singularis* defined in this thesis. In other words, despite having intermediate diagnostic characteristics, these individuals are actually an intraspecific variation of the *A. singularis* group whose geographic origin is from the “Uruguay” basin.

Finally, a species with characteristics and geographic distribution different from *A. singularis* was analyzed. *Aegla scamosa*, inhabits the rivers and streams of the Desaguadero river basin in the Cuyo area of Argentina. In this species, the results showed that in addition to a genetic structuring among the sub-basins under study, there were differences according to the tools used; the nuclear evidence, which reflects a greater structure, would be showing the distribution of the lineages of these aeglids when the sub-basins rivers were separated and there were limited gene flow among populations. On the other hand, the mitochondria information, which shows the intermediate past, highlights the union of the rivers after the Andes rising, with the consequent connectivity of the systems and greater genetic flow between populations.

The contributions presented showed, first of all, that it is of utmost importance to use a variety of tools, both molecular and geometric morphometrics, to answer the hypotheses and objectives posed around phylogeographic questions. The results found by these tools may agree, giving robustness to the studies, or disagreeing, showing different evolutionary patterns that the populations experienced. In all cases, the analyzes are enriched and the conclusions that can be drawn are broader and better supported by evidence. On the other hand, phylogeography study of Aeglidae family shows that the geoclimatic events that occurred in its range were one of the causes of its current species diversity. However, the great genetic diversity and morphological variation that these crabs have were also a key element in the great radiation and environments colonization that marked the family evolutionary history.

Introducción general

Los eventos modeladores del paisaje, como ingresiones marinas y glaciaciones, que afectaron América del Sur desde el Mioceno hasta fechas recientes, determinaron la estructura actual de los ambientes acuáticos continentales [1]. Esto ha influenciado la dinámica evolutiva de las poblaciones de las especies presentes [2][3]. La interrupción del flujo génico (aislamiento), producto de estos eventos geoclimáticos, sería una de las causas de la riqueza de los decápodos dulceacuícolas de determinadas familias, ya que representaría el inicio de la especiación [4]. En estos casos, los mecanismos que actúan en forma conjunta o aislada sobre el proceso inicial de segregación específica podrían ser interrupción del flujo génico o migración y la deriva génica. Si el aislamiento geográfico continúa en el tiempo, el efecto de estos confluye en el proceso de la especiación [5].

Los momentos y las circunstancias de la evolución de los decápodos de agua dulce han variado según el grupo que se trate. Los aéglicos (Aeglidae: Dana, 1852) son los cangrejos decápodos de agua dulce más abundantes y ampliamente distribuidos en el sur de Sudamérica, incluidos los países de Brasil, Argentina, Chile, Uruguay, Paraguay y Bolivia [6]. Habitan en ríos, lagos, arroyos, marismas, y cuevas, que van desde 320m de profundidad en lagos chilenos hasta 3500m de altitud en la cordillera de los Andes en el noreste de Argentina [7]. La familia Aeglidae incluye tres géneros, dos de los cuales están extintos (*Haumuriaegla*: Feldmann, 1984 y *Protoegla*: Feldmann y col., 1998) y *Aegla*: Leach, 1820 es el único género de Aeglidae existente en la actualidad con 82 especies descritas y muchas otras en estudio [8].

El origen, distribución y diversificación de *Aegla* ha sido motivo de discusión y las relaciones filogenéticas de sus especies han intrigado a los biólogos durante mucho tiempo [9]. Schmitt [10] sugirió para el grupo un origen marino y Atlántico, y propuso que las especies se dispersaron desde un centro de distribución en el noroeste argentino hacia Brasil y Chile a través de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay. Ringuelet [11], a través de estudios biométricos, y Morrone y Lopretto [9], basados en el análisis de trazos, argumentaron a favor de un origen Atlántico para *Aegla*. En cambio, Ortmann [12] propuso que el grupo habría colonizado el continente por medio del océano Pacífico, ingresando por el actual territorio chileno en los inicios del Paleógeno y dispersándose hacia el norte de Argentina y el sur de Brasil. Asimismo, Feldmann [13] expuso que el ancestro de *Aegla* evolucionó en un hábitat marino en la región del Indo-Pacífico, se dispersó hacia Chile y desde allí hacia el este y sur de América del Sur. Feldmann [14] basándose en el registro fósil de una nueva especie del Cretácico tardío hallado en Nueva Zelanda, clasificado como el representante conocido más antiguo de la familia Aeglidae [13], aportó evidencias a la hipótesis del ingreso Pacífico. Por su parte, los resultados obtenidos por Pérez-Losada *et al.* [7] mediante métodos moleculares corroboraron el ingreso del ancestro de *Aegla* en América del Sur desde Chile. Estos autores, a través de análisis

filogenéticos de *Aegla*, propusieron que su ancestro habría colonizado cuerpos de agua continentales durante una transgresión marina de la costa del Océano Pacífico hace aproximadamente 70 millones de años. Además, plantearon que la diversificación y distribución del género están relacionados con procesos de vicarianza y dispersión que tuvieron lugar durante la extensión/coalescencia de ciertos cuerpos de agua y sus drenajes, desarrollados a lo largo del Pleistoceno y con las fases orogénicas ocurridas durante la formación de los Andes en el Oligoceno tardío.

A pesar de su capacidad limitada para dispersarse y migrar [15] [16], la radiación y la especiación de los aeglidos a lo largo de la Era Cenozoica hasta el presente son evidencia de la exitosa adaptación y colonización de los hábitats de agua dulce [17], lo que resulta en su gran diversidad de especies [18]. Muchas especies de *Aegla* tienen áreas de distribución relativamente pequeñas, restringidas a una cuenca de drenaje o a unas pocas cuencas adyacentes [9] [19]. Por otra parte, los cangrejos de agua dulce de la familia Aeglididae tienen características que los convierten en un grupo muy adecuado para estudios evolutivos: es la única familia de anomuros completamente restringida a ambientes de agua dulce, su posición taxonómica está en disputa y muchas de sus especies están amenazadas y, desde un punto de vista morfológico, porque poseen caracteres particulares en el cefalotórax y las branquias [6] [7] [20]. Debido a los altos niveles de endemismo y requerimientos de hábitat específicos que se observa en muchas especies representan un excelente grupo para estudios filogeográficos.

La filogeografía es el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que rigen las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos, especialmente a nivel intraespecífico [21]. Esta disciplina utiliza evidencia molecular para conocer las relaciones filogenéticas que existen entre poblaciones de una misma especie o entre especies cercanas. La evolución de los decápodos de agua dulce se puede caracterizar mediante estudios genéticos, utilizando marcadores moleculares, en la familia Aeglididae. D'Amato y Corach [22] han evaluado las diferencias entre algunas especies mediante análisis de secuencias de ADN polimórficas amplificadas al azar (RAPD – *Random Amplified Polimorphism DNA*). Estos autores tenían como objetivo aclarar las relaciones evolutivas en la familia, destacando que hay secuencias repetitivas del ADN que son conservadas entre los grupos de Caridea, Brachyura y Anomura. Respecto a esto, ellos observaron solo en los aeglidos una secuencia de 400 pb altamente conservada que los definió en dicho análisis como grupo monofilético. En dicho estudio, D'Amato y Corach [22], además presentaron evidencias de estructuración genética entre poblaciones de *A. jujuyana* a partir del análisis de marcadores moleculares de tipo RAPD. Lo mismo se observó para *A. uruguayana*, una especie de mayor rango de distribución, mediante estudios con marcadores moleculares tipo ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) [23]. En este estudio, los autores encontraron estructura genética entre poblaciones de diferentes subcuencas. Pérez-Losada *et*

al., [7] propusieron una nueva filogenia del género, a partir del análisis de secuencias mitocondriales y nucleares en 64 especies. En este estudio, se encontraron evidencias de especies que tenían un origen polifilético, dando lugar a numerosos estudios posteriores que describieron nuevas especies. Por ejemplo, Moraes *et al.* [18] describieron cuatro nuevas especies a partir de lo que se consideraban poblaciones de *A. paulensis*. Asimismo, Crivellaro *et al.* [24] descubrieron especies crípticas enmascaradas en la especie *A. longirostri*, delimitando al menos 14 nuevas especies potenciales. En estudios propiamente filogeográficos, Xu *et al.* [16] testearon hipótesis evolutivas asociadas a cangrejos de Chile (*A. alacalufi*) mediante marcadores de ADNmt, sugiriendo que las glaciaciones han afectado la diversidad genética y la distribución de dichas especies. Pérez-Losada *et al.* [25], posteriormente, analizaron y compararon la filogeografía de estas dos especies de aéglicos patagónicos indicando que la evolución de *A. alacalufi* estuvo muy influenciada por las glaciaciones del Pleistoceno tardío, mientras que la diferenciación de *A. neuquensis* fue impulsada principalmente por divisiones de las cuencas establecidas mucho antes del Último Máximo Glacial. Asimismo, Barber *et al.* [26], encontraron patrones filogeográficos diferentes con marcadores nucleares y mitocondriales en *A. neuquensis*, debido a que estos genes muestran distintos eventos geoclimáticos en el tiempo. Zimmermann *et al.* [27], hallaron mediante filogeografía que en la especie *A. platensis*, a pesar de que parecía tener un origen polifilético, sólo una de 18 poblaciones era una especie críptica. Estos trabajos demuestran la diversidad de patrones evolutivos que presentan las especies de *Aegla*, un motivo más por el cual es prioridad realizar este tipo de estudios.

En filogeografía se recomienda utilizar marcadores moleculares mitocondriales, nucleares intrónicos, microsátélites, SNPs (Single Nucleotide Polymorphism: Polimorfismo de un solo nucleótido), entre otros, debido a que un solo tipo de marcador muchas veces no muestra la verdadera historia evolutiva del taxón [28] [29] [30]. Por otra parte, numerosos estudios han utilizado evidencia morfológica, mediante morfometría geométrica, para indagar las variaciones de forma intraespecíficas (en *Aegla*: [4] [31] [32], entre otros).

En el análisis de la forma de estos particulares anomuros, Martin y Abele [6] sugieren que el cefalotórax del género *Aegla* posiblemente sea la característica más notable del grupo, y puede variar dentro de una misma especie y entre especies. Según Hepp *et al.* [33], este género es un buen modelo para aplicar morfometría porque posee una morfología bien conservada. Al respecto, Aldrich [34] expuso que la variabilidad local en la forma de los crustáceos, podría ser examinada mediante el uso de un enfoque global de la forma del cefalotórax. Los crustáceos son particularmente atractivos para estudios morfológicos porque sus duros exoesqueletos permiten obtener medidas precisas [35] y, frecuentemente, están adornados por evidentes espinas, lo que los hacen candidatos excelentes para los análisis de forma mediante morfometría geométrica [36]. En tanto, la morfometría geométrica

como herramienta de estudio permitió identificar diferencias en el cefalotórax de estos cangrejos, entre sexos, poblaciones y especies. En especies de Argentina, Giri y Collins [31] estudiaron dimorfismo sexual y diferencias específicas en *A. platensis* y *A. uruguayana*. Giri y Loy [32] indagaron en los patrones de forma intra e interespecíficos en *A. neuquensis* y *A. riolimayana*. Hepp *et al.* [33] estudiaron diferentes poblaciones de *A. plana* y encontraron que la variación morfológica estaba relacionada con algunas variables ambientales. En el caso particular de *A. uruguayana* se observaron patrones clinales en toda la distribución de la especie, analizada en diferentes cuencas mediante estudios de morfometría geométrica [4]. Marchiori *et al.* [37], analizaron poblaciones de *A. longirostri* de seis ríos, hallando diferencias morfológicas en las poblaciones de uno de los ríos.

La capacidad de la información que la metodología conjunta, molecular y morfogeométrica, provee en el análisis de la filogeografía aumenta la posibilidad de discusión sobre diferentes aspectos de la evolución de las especies, permitiendo, y junto a otro tipo de información, discutir intensamente y con fundamentos la historia y el futuro de los crustáceos dulciacuícolas de América del Sur. Si bien hay trabajos anteriores que abordan cuestiones filogeográficas del género *Aegla*, las particularidades de los aéglicos y la gran diversidad de historias evolutivas que se han observado en dichos trabajos, demuestran la importancia de realizar este tipo de estudios en otras especies sobre las que aún no se ha investigado.

Objetivos

Objetivo general

- Analizar y caracterizar aspectos filogeográficos en cangrejos de agua dulce de la familia Aeglidae.

Objetivos específicos

- Optimizar las condiciones para amplificar marcadores moleculares mitocondriales y nucleares necesarios en los estudios de estructura genética-poblacional del género *Aegla*.
- Analizar datos genéticos utilizados en el estudio filogeográfico y genético de poblaciones que permita identificar subdivisiones démicas potenciales.
- Encontrar patrones filogeográficos de las especies que expliquen su actual distribución y estructura genética
- Proporcionar información de la filogeografía de las especies en estudio que sean útiles para planes de conservación y manejo de los aeglidos, destacando su rol en los sistemas acuáticos

A partir de los objetivos propuestos y de los antecedentes sobre el tema se postula la siguiente hipótesis:

Los eventos geoclimáticos ocurridos en América del Sur tuvieron incidencia en la diversificación y radiación de los aeglidos

Predicciones:

- La Sierra Central en Misiones ha aislado las poblaciones de *A. singularis* que habitan la cuenca del río Paraná de las que habitan la cuenca del río Uruguay, por lo que existe estructura genética y diferencias morfológicas entre las poblaciones de cada cuenca.
- El aislamiento geográfico junto con la baja capacidad de dispersión que presentan los aeglidos, provoca marcadas diferencias entre las poblaciones, aunque se encuentren separadas por cortas distancias geográficas.
- La alta conectividad que existe entre las subcuencas del río Desaguadero posibilita el flujo genético entre las poblaciones de *A. scamosa*, por lo que no hay estructura genética entre las mismas.

Materiales y métodos

En esta sección se describen, en general, las metodologías utilizadas en los capítulos de la tesis, tanto moleculares como geomorfométricas. Sin embargo, en cada capítulo se especifica el tipo de tratamiento que se aplica para cada set de datos.

1. Metodologías moleculares

En análisis filogeográficos, se utilizan marcadores genéticos para amplificar regiones del ADN de interés de las especies bajo estudio. Históricamente, el marcador por excelencia para este tipo de estudios fue el ADN mitocondrial (ADNmt); sin embargo, actualmente se reconoce la necesidad de complementar esta evidencia con el uso de marcadores nucleares, como secuencias de intrones y microsatélites [28].

El genoma mitocondrial tiene un tamaño de 15000 a 17000 pb [38] y su longitud varía considerablemente entre especies [39]. Las moléculas de ADN mitocondrial son especialmente importantes para trazar historias filogeográficas y de estructura genético-poblacional estrechamente relacionadas al linaje, porque son de herencia uniparental y no recombinan. También permiten inferir cambios demográficos y de dispersión entre especies [40]. Sin embargo, las limitaciones del ADNmt se deben a su evolución única, lo que lo hace poco representativo en comparación con otras regiones genómicas [29] [41] [42] [43]. Además, la tasa de mutación mitocondrial no es necesariamente alta en todos los animales [44], lo que convierte al ADNmt en un marcador poco adecuado para el análisis de la variación intraespecífica en algunos casos. Es por ello, que muchos autores recomiendan el uso de otros marcadores para complementar la evidencia que nos brinda el genoma mitocondrial [29]. Por otra parte, las limitaciones de las inferencias hechas a partir de árboles de un solo gen se han hecho más evidentes por el aumento de la complejidad de las hipótesis filogeográficas, que se contrastan en el contexto de la conservación y los estudios evolutivos. Los avances en la Teoría Coalescente proporcionan el marco para probar historias evolutivas complejas [45] pero no importa cuán sofisticada sea la teoría, las explicaciones alternativas para los patrones de datos a menudo no pueden distinguirse sin comparaciones entre loci independientes. La fuerza final y la aplicabilidad más amplia de un enfoque filogeográfico, por lo tanto, depende de la capacidad de incorporar loci nucleares [29].

En eucariontes, la mayor parte de la información genética se encuentra contenida en el núcleo de la célula. El ADNnu se encuentra empaquetado y asociado a proteínas histonas, conformando los cromosomas [39]. Se considera que los organismos diploides tienen dos copias de cada región genética (locus) en los pares homólogos de los cromosomas, llamadas alelos, sin tener en cuenta si contienen regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones o regiones intergénicas). El gen del factor de elongación 1-alfa (EF1- α en adelante), codifica una proteína que cataliza la unión de

aminoacil-ARNt al ribosoma durante la traducción [46] y la cantidad de esta proteína en las células eucariotas es comparable a la abundancia de las principales proteínas del citoesqueleto [47]. A pesar de ser un gen altamente conservado, sus intrones han demostrado ser útiles para estudios filogenéticos y/o filogeográficos a nivel de especie [48] [49].

Existen otros marcadores moleculares nucleares, como los microsatélites, que consisten en motivos de ADN cortos de dos a seis nucleótidos, repetidos en tándem, encontrados en alta frecuencia en los genomas de todos los organismos superiores investigados hasta la fecha [50]. La cantidad de diversidad alélica en microsatélites es ventajosa para el estudio de procesos microevolutivos que generalmente actúan en escalas de tiempo típicas de la genética de poblaciones y la filogeografía [30]. Estos marcadores también pueden usarse para detectar individuos heterocigotos. Esta capacidad de distinguir entre homocigotos y heterocigotos es una de las características más importantes de los marcadores codominantes porque significa que podemos calcular fácilmente las frecuencias alélicas para muestras agrupadas (como las poblaciones); por otro lado, presentan en general, un número elevado de alelos [51].

Los microsatélites tienen tasas de mutación mucho más elevadas que otros tipos de marcadores; estas oscilan alrededor de 10^{-4} a 10^{-5} eventos por locus por replicación en levadura [52] y alrededor de 10^{-3} a 10^{-4} en ratones [58]. Esto es sustancialmente más alto que la tasa de mutación puntual global promedio de las secuencias de ADN, estimada de alrededor de 10^{-9} - 10^{-10} [54]. Estas altas tasas de mutación en los microsatélites se atribuyen más comúnmente al mal emparejamiento de las hebras durante la replicación del ADN, lo cual, debido a que puede resultar en la ganancia o pérdida de una sola unidad de repetición, ha dado lugar a un modelo de mutación de escalonamiento gradual. (SMM; [55]). Alternativamente, el modelo de alelos infinitos (IAM; [56]) permite mutaciones en las que se ganan o pierden múltiples repeticiones simultáneamente, pero también supone que no se ha encontrado previamente un nuevo tamaño de alelo dentro de una población. Los modelos de mutación son importantes para el análisis de datos genéticos, pero la conciliación de modelos particulares con la evolución de microsatélites es compleja por el hecho de que, aunque las mutaciones a menudo involucran repeticiones únicas, se obtienen o pierden varias repeticiones periódicamente después de una sola mutación (*single mutation*). En otros momentos, las inserciones o deleciones en las secuencias que flanquean el microsatélite, alterarán el tamaño de la región amplificada. También hay evidencia considerable que sugiere que la mutación de los microsatélites está influenciada por el número y el tamaño del motivo de repetición y también por la complejidad del microsatélite [57].

Como ya se mencionó en la introducción general, *Aegla* es un modelo para los estudios de evolución molecular, pero a pesar de ello, pocos estudios han desarrollado o utilizado marcadores

microsatélites en estudios de genética de poblaciones en este grupo zoológico [58] [59] [60]. Debido a que hay muchas especies de *Aegla* con diferentes características biológicas, ecológicas y de distribución del hábitat, que no han sido estudiadas, resulta conveniente investigar su historia evolutiva utilizando microsatélites para comparar y complementar los resultados con la diversidad de métodos actualmente utilizados.

Extracción de ADN genómico

Las especies de *Aegla* utilizadas para todos los análisis (*A. singularis*, *A. scamosa*, *A. platensis*, *A. affinis*, *A. uruguayana*), pertenecen a la colección del Laboratorio de Macrocrustáceos del Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL). En la Figura 1 se pueden apreciar imágenes de individuos de estas especies.

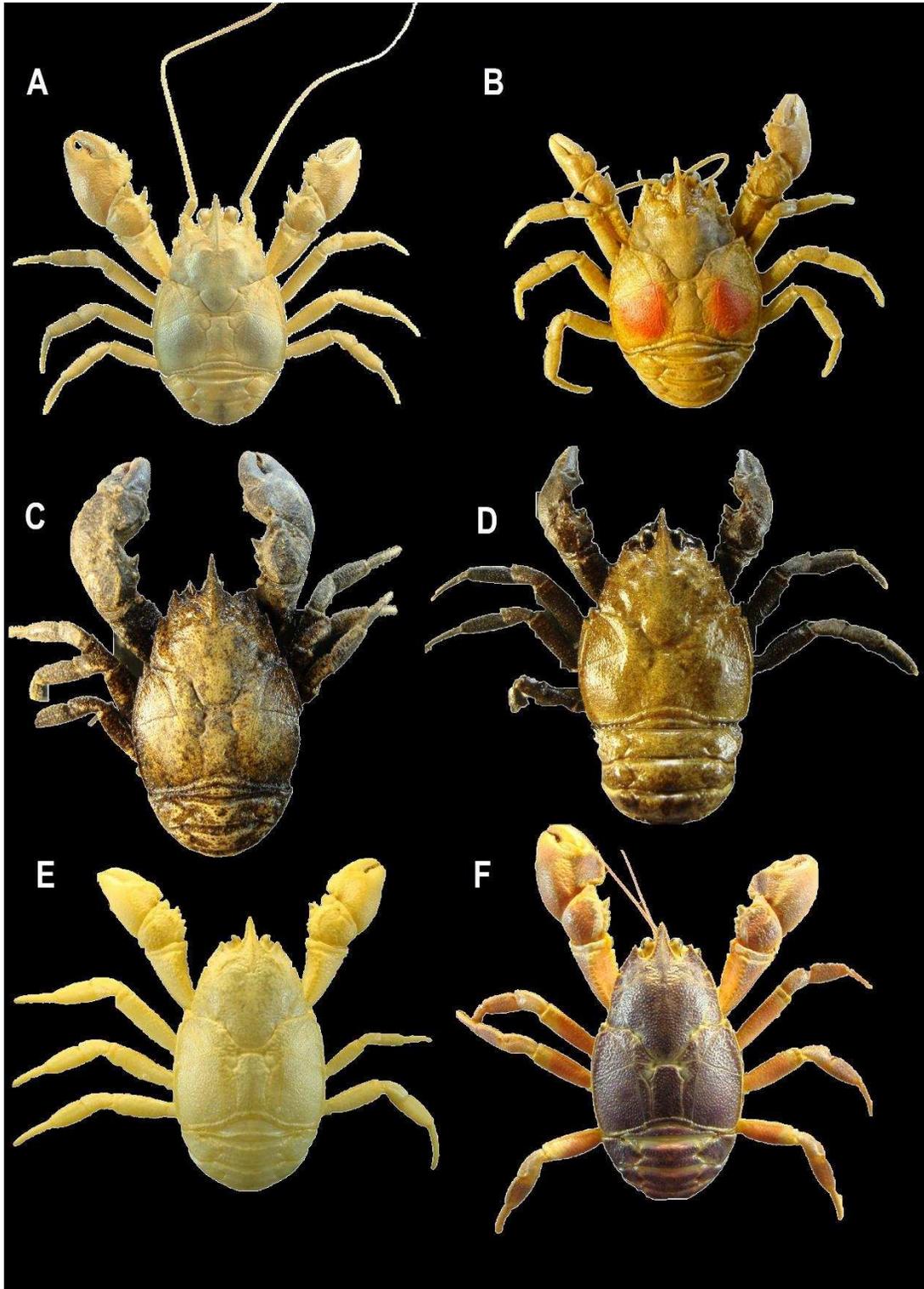


Figura 1- Imágenes de las especies de aéglidos utilizadas en esta tesis. A: *A. singularis* del río Paraná. B: *A. singularis* del río Uruguay. C: *Aegla platensis*. D: *A. uruguayana*. E: *A. affinis*. F: *A. scamosa*. Las fotos pertenecen al Laboratorio de Macrocrustáceos (INALI) y fueron tomadas por la Dra. Georgina Tumini y la Dra. Valeria Diawol.

La extracción de ADN genómico se realizó con kits comerciales (AccuPrep® de Bioneer) o con el protocolo de precipitación salina propuesto por Aljanabi y Martínez [61], con modificaciones. El protocolo se detalla a continuación:

- 1- El tejido se extrajo de los pleópodos de los cangrejos por encontrarse en mejor estado de conservación. Se colocaron en un tubo de 1,5 ml y se trituraron con una pinza de puntas afiladas. Se le adicionó a cada tubo 500 μ l de solución de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 1% SDS, 50 mM NaCl) y 25 μ l de proteinasa K.
- 2- Se mezcló con vórtex y se colocaron los tubos en baño termostático a 55 °C, mezclando en vórtex cada media hora hasta que los tejidos se veían desintegrados (de 4 a 24 horas)
- 3- Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 20 min., luego se extrajeron 500 μ l de sobrenadante (sin tocar el fondo del tubo y evitando tomar solución de la superficie oleosa) y se colocaron en un nuevo tubo de 1,5 ml.
- 4- Se agregó 300 μ l de NaCl 5 M, mezclando de forma manual y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min.
- 5- Se extrajeron 500 μ l. de sobrenadante y se le colocó el mismo volumen de isopropanol, mezclando de forma manual. Los tubos se colocaron en freezer a -20°C durante toda la noche.
- 6- Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min. y luego se tiró el sobrenadante cuidando de no remover el *pellet* de la parte inferior. Se colocó 750 μ l de etanol 70 % y se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 15 min.
- 7- Se tiró el sobrenadante, dejando secar los tubos en estufa hasta que se evapore todo resto de alcohol. El *pellet* fue resuspendido en 50 μ l de TE 10X.

Las muestras se visualizaron en un gel de agarosa al 0,8% teñido con GelGreen®. La concentración se midió con espectrofotómetro y a partir de esto se hicieron las diluciones correspondientes para que todas tengan una concentración final de 10 ng / μ l. La extracción de ADN fue exitosa para todas las especies del género que se utilizaron en esta tesis. En la Figura 1.2 se observa un gel de agarosa al 0,8% con muestras de ADN genómico a modo de ejemplo.

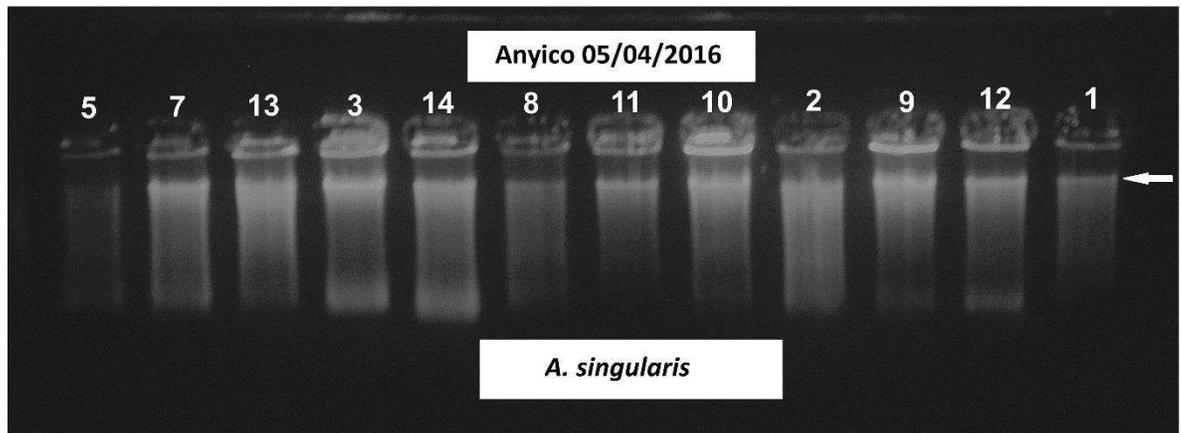


Figura 2- Gel de agarosa que muestra el ADN genómico del arroyo Anyico (banda indicada por la flecha blanca), extraído mediante el protocolo de extracción salina

Selección de marcadores nucleares y mitocondriales. Descripción del protocolo de amplificación mediante PCR.

Con el fin de escoger marcadores mitocondriales y/o nucleares para realizar los análisis fitogeográficos, se relevó la bibliografía sobre estudios en *Aegla* y se testearon los juegos de cebadores que se muestran en la Tabla 1. Si bien se utilizaron diferentes protocolos y se testearon todos los juegos de la tabla, finalmente se seleccionaron los *primers* de COI [62], COII [63] y EF α 1 [16] porque amplificaron exitosamente en un alto porcentaje de muestras y mostraron alta variabilidad genética.

Tabla 1- Información de los marcadores testeados. En negrita se muestran los marcadores seleccionados.

Marcador	Secuencias del <i>primer</i> (5'-3')	Cita
COI (ADNmt)	F: GAG-CTCCAGATATAGCATTCC R: AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC	Pérez-Losada <i>et al.</i> [63], van Syoc [64]
	F: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG R: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> [62]
COII (ADNmt)	F: CTTAYTTAGGATTTCAAGATAG R: GGTATAAATCTATGATTTGC	Pérez-Losada <i>et al.</i> [63]
16S	F: ACTTGATATATAATTAAGGG R: CTGGCGCCGGTCTGAACTCAAATC	Pérez-Losada <i>et al.</i> [63]
12S	F: GAAACCAGGATTAGATACCC R: TTTCCCGCGAGCGACGGGCG	Pérez-Losada <i>et al.</i> [63]
EFα1 (ADNnu)	F: TAAGATGTCTGTGTAATGGC R: CCTGCCACCCATTGACAATTCA	Xu <i>et al.</i> [16]

Para obtener los fragmentos de interés, se procedió a la optimización del protocolo de amplificación mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés; Reacción en Cadena de la Polimerasa) de los marcadores moleculares publicados para *Aegla*. Para ello se trabajó en el ajuste de algunos parámetros básicos de la reacción: temperatura de apareamiento de los oligonucleótidos, concentración de Cl_2Mg y concentración de ADN; tomando como punto de partida los protocolos recomendados por los autores.

Una vez optimizados estos parámetros, las condiciones finales de PCR fueron: para la mezcla por tubo de reacción: Taq polimerasa (0,75 U), dNTPs (0,25 mM), Cl_2Mg (2,5 mM), *buffer* Taq 1X, *primers* o cebadores (0,48 mM cada uno) y 50 ng de ADN en un volumen final de 25 μ l. Las condiciones de amplificación incluyeron un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 45 °C (COI; COII) / 49 °C (EF α 1) para el apareamiento de los *primers*, seguido de un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% teñidos con gel Green® y expuestos a transiluminador de luz oscura. Cuando el resultado fue positivo (es decir, se observó banda del tamaño deseado) se enviaron en placas de 96 pocillos al servicio de purificación y secuenciación de Macrogen Inc. en Corea. En la Figura 1.3 se muestra a modo de ejemplo un gel de agarosa al 1,5% donde se visualiza el producto de la amplificación del intrón nuclear.

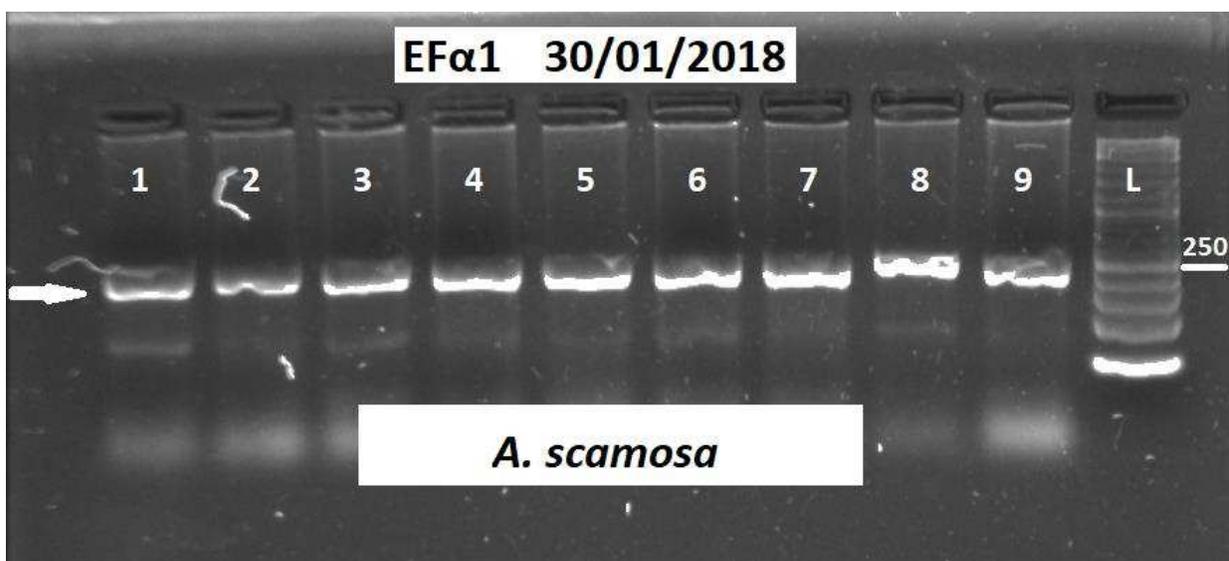


Figura 3- Gel de agarosa que muestra la amplificación del intrón EFα1 para *A. scamosa*. En las calles 1 a 9 se observan productos de PCR de distintos individuos y la última calle muestra el *Ladder*, con la banda de 250 pb de resaltada (ya que es el tamaño aproximado del producto de este marcador). La flecha blanca indica la banda del fragmento de interés.

Análisis con marcadores mitocondriales y marcador nuclear

Una vez recibidas las secuencias, se verificó su calidad mediante el análisis de los electroferogramas de las mismas y comparando la secuencia obtenida mediante los marcadores *Forward* (sentido 5´ a 3´ de la hebra de ADN) y *Reverse* (sentido 3´ a 5´ de la hebra de ADN) para constatar que la información de cada nucleótido sea válida. Luego, se alinearon con el programa MEGA 7 [65], utilizando en algunos casos el algoritmo MUSCLE [66] o CLUSTALW [67] según el requerimiento de las secuencias. Luego se las editó de manera manual. Es decir, se evaluaron los sitios segregantes en cada secuencia para verificar que los picos del electroferograma en dichos sitios se encontraran distinguibles.

A partir de estas secuencias ya alineadas, se utilizó el programa DnaSP v6 [68] para determinar los parámetros de diversidad genética como: número de haplotipos (variaciones del gen amplificado), diversidad haplotípica (singularidad de un haplotipo en una población dada en relación con el tamaño muestral), diversidad nucleotídica (número medio de diferencias de nucleótidos por lugar entre dos secuencias de ADN elegidas al azar entre la muestra poblacional) y número de sitios polimórficos (número de sitios en los que variaban los nucleótidos).

Con el programa Arlequin 3.5 [69] se analizaron los valores de F_{ST} [70] y se realizó el AMOVA (Análisis de la Varianza Molecular) [71] para determinar la estructura poblacional. El F_{ST} , también conocido como índice de fijación, proporciona una estimación de la diferenciación genética entre subpoblaciones. Es una medida del grado de endogamia dentro de una subpoblación en relación con la población total (la población total aquí significa todas las subpoblaciones combinadas), y refleja la probabilidad de que dos alelos extraídos al azar de una subpoblación sean idénticos por descendencia. Se calcula como:

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

Donde H_T la heterocigosidad esperada del total de la población y H_S es la heterocigosidad esperada si la población estuviera en Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Por otro lado, el Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) básicamente consiste en utilizar la matriz de distancia entre haplotipos para medir la estructura genética de la población dentro de una especie. Su principal interés es el procedimiento de prueba, basado en un análisis permutacional, que requiere muy pocos supuestos. Aunque inicialmente se diseñó para sistemas haploides, el tratamiento AMOVA proporciona un marco general para el análisis de la estructura genética de la población. Dicho análisis consiste en caracterizar la variación genética dentro y entre las poblaciones. En el caso de AMOVA jerárquico, además, se puede caracterizar la variación genética entre grupos de poblaciones asignados a priori.

Mediante los datos de secuencia es posible calcular redes de haplotipos, las cuales se utilizan en el análisis de datos genéticos de poblaciones para visualizar relaciones genealógicas a nivel intraespecífico, así como para hacer inferencias sobre biogeografía e historia de poblaciones. En este caso, se construyeron mediante el algoritmo bayesiano Median Joining [72] en el programa Network 5.0 (fluxus-engineering.com) con los parámetros predeterminados. Los árboles filogenéticos, que también muestran las relaciones evolutivas entre especies o individuos de una especie, se realizaron con el programa MrBayes [73], para lo cual se estimó el mejor modelo de sustitución con el programa MrModelTest [74]. Los parámetros utilizados variaron en función de los datos proporcionados y se detallan para cada estudio en el capítulo correspondiente. Los árboles obtenidos se visualizaron y editaron con el programa FigTree v1.3.1 [75].

Diseño y optimización de marcadores microsatélites

En primer lugar, se testearon los marcadores microsatélites propuestos por Roratto *et al.*, [60] en muestras de *A. singularis* (Ver Tabla en sección A1 del Anexo). Sin embargo, no se amplificaron exitosamente para la mayoría de las muestras y muchos de ellos resultaron monomórficos, por lo que

se decidió diseñar marcadores propios y testarlos en varias especies del género. Para el diseño de los cebadores que flanquean la región microsatélite, se utilizaron fragmentos del genoma de *A. platensis* (números de acceso de GenBank: MN027599; MN027898) y *A. araucaniensis* (números de acceso: JF693281.1; JF693283.1; JF693284.1; JF693289.1; JF693280.1; JF693280.1; JF693280.1; 1). La detección de microsatélites y el análisis del diseño del cebador se llevaron a cabo con FullSSR [76] usando la configuración predeterminada. Luego, con el programa informático DNASTar [77] se verificó su calidad, evaluando la formación de horquillas y de dímeros cebador-cebador entre cada uno y entre los pares de cebadores elegidos. La Tabla 2 muestra la lista de marcadores seleccionados mediante la verificación de DNASTar [77].

Tabla 2- Información de los cebadores microsatélites diseñados para esta tesis

Nombre	Secuencia F (5'-3')	Secuencia R (5'-3')	Tamaño fragmento	Temperatura apareamiento (°C)	Repetición
Aa 6	GGCTGGCCGTGATGTAGG	CCGTGACGCATCAAGTGT	187	58-60	AG
Aa 8	AGGAGTAGCTCAGGTGGA	ACGGCCGGTCAATATGGA	167	54	GAAT
Au 6	TTGCAGAGTCTGGCGTGG	ACCTCATCCTCACAGACC	161	52-61	G
Au 8	TGCCTTCTCGCTCACTCT	AGTCAAGGTCTGGTGGCT	157	56	G
Au 9	TACTTCGTGGTAGCCGGA	AGTGTAAGAGCGAGGTGG	100	56	AT
Au 10	GGTGGCTTGAGTGATTGG	AGCACAGCATCATCCGCA	198	52-55	AT
Au 11	GCCTGTAGCGAGCACATT	GGTGGTGTGTGAGTGAGA	168	57-58	AT
Au 12	CGTTCGTCTGCCGCTCAA	AGGTGGAATTATGCCGCT	198	57-61	AG
Au 19	GTCGGCCACATACAGACT	AGGATGACACGGCAAGCC	195	57-60	TC
Au 20	TGTTGCCTTCTCGCTCAC	AGTCAAGGTCTGGTGGCT	160	57-59	TC
Au 21	GTACAGGTGTTCGTCGCC	GTAGCACGCCACGCAATG	147	60	GA
Au 24	TGGTGGTGGTGGTGGTGA	CGAATGCTGATGTGCCGC	242	60-61	ATG

Se probaron los 10 nuevos microsatélites en las cuatro especies de *Aegla* estudiadas (*A. uruguayana*, *A. affinis*, *A. singularis* y *A. platensis*) para determinar su eficacia como marcadores moleculares a ser utilizados en análisis genéticos poblacionales, siendo el objetivo principal que amplifiquen en un gran porcentaje de muestras y que sean polimórficos. Las condiciones finales de PCR fueron (para la mezcla por tubo de reacción): Taq polimerasa (0,75 U), dNTPs (0,25 mM), Cl₂Mg (2,5 mM), *buffer* Taq 1X, cebadores o *primers* (0,48 mM cada uno) y 50 ng de ADN en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación incluyeron un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min., seguido de 30 ciclos de 1 min. de apareamiento de los cebadores (la temperatura para cada marcador se muestra en la Tabla 2), seguido de un paso de extensión final a 72 °C durante 10 min. y finalmente, 10 min. a 60 °C.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,5% teñidos con gel Green y expuestos a transiluminador de luz oscura. Cuando el resultado fue positivo (es decir, se observó banda del tamaño deseado) se enviaron en placas de 96 pocillos al servicio de genotipificación de MacroGen Inc. en Corea. El diseño y amplificación de microsatélites resultó exitoso. En la Tabla 3 se muestra que todos los microsatélites amplificaron satisfactoriamente en las cuatro especies en las que se testearon (*A. scamosa*, *A. singularis*, *A. affinis*, y *A. uruguayana*), pero con algunas diferencias. Los microsatélites Au12 y Au9 se amplificaron en las cuatro especies y mostraron un alto polimorfismo, con siete alelos diferentes para Au12 (157 a 201 pb) y seis para Au9 (90 a 108 pb). El microsatélite Au10 se amplificó en todas las especies, pero fue monomórfico en 3 de las especies analizadas. Los resultados podrían variar al aumentar el número de ejemplares estudiados (N), ya que en el caso de *A. scamosa*, donde el N fue mucho mayor, dicho marcador se mostró polimórfico.

Tabla 3- Información de los marcadores amplificados por especie. N: número de muestras amplificadas. AN: Número de alelos. R: rango de los alelos amplificados

Especie Cebador	<i>A. scamosa</i>	<i>A. singularis</i>	<i>A. affinis</i>	<i>A. uruguayana</i>
Au11	N: 55 AN: 7 R: 164-212	N: 1 AN: 2 R: 185-195	N: - AN: - R: -	N: 3 AN: 2 R: 161-163
Au12	N: 77 AN: 12 R: 157-179	N: 7 AN: 7 R: 161-203	N: 8 AN: 5 R: 159-185	N: 8 AN: 2 R: 197- 201
Aa8	N: 7 AN: monomórfico R: 175	N: 6 AN: 2 R: 171-179	N: - AN: - R: -	N: 4 AN: monomórfico R: 175
Au24	N: 72 AN: 6 R: 177-209	N: 2 AN: 4 R: 171-230	N: - AN: - R: -	N: 2 AN: 4 R: 200-232
Au10	N: 8 AN: monomórfico R: 198	N: 8 AN: monomórfico R: 198	N: 8 AN: monomórfico R: 198	N: 8 AN: monomórfico R: 198
Au21	N: 78 AN: 14 R: 134-160	N: 8 AN: monomórfico R: 146	N: - AN: - R: -	N: - AN: - R: -
Au9	N: 74 AN: 10 R: 100-118	N: 8 AN: 3 R: 90-98	N: 8 AN: 3 R: 98-102	N: 7 AN: 2 R: 102-104
Au6	N: 7 AN: monomórfico R: 164	N: - AN: - R: -	N: - AN: - R: -	N: - AN: - R: -
Aa6	N: 78 AN: 12 R: 140-196	N: 2 AN: monomórfico R: 168	N: - AN: - R: -	N: 4 AN: 3 R: 162- 171
Au19	N: 78 AN: 7 R: 192-204	N: 8 AN: 2 R: 195-197	N: 8 AN: monomórfico R: 195	N: - AN: - R: -

Análisis con marcadores microsatélites

El tamaño de los fragmentos obtenidos, se determinó utilizando el programa PeakScanner (<http://www.appliedbiosystems.com>). Luego, se utilizaron los programas Arlequin [69] para calcular valores de F_{ST} [70] y AMOVA [71] y GenAlEx [78] para estimar parámetros poblacionales de diversidad y estructura genética (número de alelos por locus, heterocigosidad esperada y observada).

En el caso de los microsatélites se utilizó una variante del F_{ST} , el R_{ST} [79], ya que se adecúa a los casos de homoplasia muy comunes en la evolución de las regiones de microsatélites. A diferencia de F_{ST} , las estimaciones de R_{ST} suponen un modelo de mutación escalonada y tienen en cuenta la magnitud de las diferencias en la longitud de los alelos. Se considera que este modelo representa mejor los procesos mutacionales de los microsatélites, que a menudo tienden a ocurrir de manera algo escalonada, por lo que los alelos con longitudes muy diferentes están más relacionados que dos alelos de longitud bastante similar.

Para calcular el número de agrupamientos (*clusters*) más probable de las muestras de *Aegla* se utilizó el programa Structure [80]. Éste se presenta como un enfoque bayesiano para analizar de manera más objetiva los límites reales de la población, ya que no siempre se puede definir *a priori* qué es realmente una población [81] dado que el origen geográfico de las muestras podría ser un mal predictor de su relación genética. Structure, se basa en soluciones probabilísticas para identificar límites entre poblaciones o especies utilizando enfoques bayesianos [82]. Con los algoritmos de agrupación de población bayesiana es posible estimar el número de subpoblaciones distintas (agrupaciones) a partir de los datos de una manera a posteriori y asignar individuos a ellos. Con este fin, el número más probable de clústeres “*k*,” se estima a partir de los datos mediante un algoritmo basado en un modelo.

2. Metodologías geomorfométricas

La morfometría geométrica consiste en la captura de la forma usando coordenadas cartesianas y luego, en la eliminación de cuestiones ajenas a la misma, eliminando la posición, la orientación y el tamaño absoluto de los objetos en estudio [83]; es decir, permite usar la forma y el tamaño por separado. Esta herramienta, analiza la forma y el tamaño mediante imágenes digitalizadas y posteriormente se realiza la determinación de los puntos de referencias (*landmarks*) en la imagen para establecer las formas a comparar. Bookstein [84] desarrolló un método basado en “*thin-plate splines*” que permite la creación de una grilla de transformación que mapea la configuración de puntos homólogos (*landmarks*) de un organismo sobre otro [85]. La selección de puntos se sigue mediante un criterio de homologías entre los puntos de los objetos a analizar, es decir, que se deben respetar la posición de los *landmarks* entre los caracteres anatómicos seleccionados en cada individuo. Los *landmarks* se representan por una matriz de configuración X que es la matriz $k \times m$ de coordenadas cartesianas (k *landmarks* en m dimensiones). El promedio de las matrices individuales se llama la matriz de consenso que define la configuración de consenso. Las distancias de Procrustes pueden ser definidas como la raíz cuadrada de la suma de las distancias cuadradas entre dos configuraciones de

landmarks centradas mediante la superposición de los centroides (traslación), normalizadas a un tamaño centroide igual a 1 (escalado), y óptimamente rotadas (rotación) [86].

Las imágenes utilizadas para los análisis de morfometría geométrica pertenecen a la base de datos de fotografías del Laboratorio de Macrocrustáceos (INALI, CONICET-UNL) y fueron capturadas con una Sony Cyber-Shot DSC-W210 de 12.1 Mp. montada sobre un trípode. Se tomaron fotografías de la parte dorsal del caparazón a una distancia de 30 centímetros del espécimen. Para ello, los especímenes fueron dispuestos en una placa de vidrio colocada sobre un dispositivo compuesto por una columna de madera y cuatro bulones de cabeza plana, los cuales permitían ajustar la altura y nivelación de la placa. Previo al inicio de cada sesión fotográfica, se midió la horizontalidad de la cámara de fotos y de la mencionada placa.

Se identificaron los puntos de referencia (*landmarks*) en el caparazón dorsal para usar como configuración de base (la configuración de *landmarks* fue diferente según la especie evaluada, se especifica en los capítulos correspondiente). La digitalización de los puntos de referencia se realizó mediante el programa tpsDig2 versión 2.30 [87]. Las coordenadas de los puntos de referencia en las muestras se superpusieron en un sistema de coordenadas común utilizando el “Análisis de Procrustes Generalizado” (GPA) para eliminar los efectos de traslación, rotación y escala [85]. El error en la fotografía y la digitalización se estimaron a través del análisis de Procrustes ANOVA utilizando el programa MorphoJ [88]. También se evaluó el dimorfismo sexual utilizando un método de validación cruzada de exclusión (basado en Análisis Discriminante Lineal -LDA-), para determinar si dentro del grupo las muestras presentan diferencias entre los sexos. Se realizó un estudio de la alometría, utilizando la regresión lineal entre los dos grupos (poblaciones de la cuenca de Paraná vs. Uruguay), para evaluar la relación entre el tamaño y la forma. Si la interacción no presentaba diferencias estadísticas, se utilizaron los residuos de la regresión, pero si la interacción fue estadísticamente significativa, se usaron los datos originales para los análisis. Para analizar el tamaño entre las muestras de dos grupos, se llevó a cabo la prueba ANOVA. Se realizó un PCA (Análisis de Componentes Principales) y una prueba de permutación en MorphoJ [88] mediante validación cruzada (basada en LDA) para evaluar la presencia de patrones de diferenciación de grupos.

Breve descripción de los programas utilizados en los análisis morfométricos

Morpho J [88]. Es un paquete de programas integrados para hacer morfometría geométrica. Entre otras funciones incluye: generación de matrices de covarianza, PCA (análisis de componentes principales), matrices de correlación, Two-Block PLS (mínimos

cuadrados parciales de dos bloques), regresión, CVA (análisis de variación canónica) y análisis discriminante.

tpsUtil [87] Este programa permite realizar diferentes operaciones a fin de manipular archivos de extensión *.tps y *.nts a fin de ser utilizados en otros programas de la serie.

tpsDig [87] Este programa permite seleccionar *landmarks* a partir de las imágenes digitales. Además, es posible tomar medidas y obtener contornos entre otras cosas.

tpsRelw [89] Este programa realiza diferentes operaciones matemáticas y estadísticas para el análisis de las formas. Es un programa del cual se obtienen resultados exploratorios sobre la variación de las formas en el espacio. En este caso la exploración se da principalmente a través de análisis de componentes principales. Los parámetros ajenos a la forma (orientación, escala y traslación) son obtenidos mediante GPA.



Capítulo 1: *Aegla singularis*: modelo de evolución por aislamiento geográfico

Capítulo 1: *Aegla singularis*: modelo de evolución por aislamiento geográfico

1. INTRODUCCIÓN

La especiación, es decir, el origen de las especies, es el proceso directamente responsable de la diversidad de la vida [90]. Es, en última instancia, una consecuencia de la divergencia genética, causada por la ausencia de flujo genético entre las poblaciones debido al aislamiento reproductivo [91]. En el caso de la especiación alopátrida, el flujo de genes se ve afectado o impedido por el aislamiento geográfico, permitiendo la diversificación morfológica y la estructuración de las poblaciones, hechos que podrían ser los primeros pasos en el proceso de especiación [5] [92]. Las barreras geográficas han jugado un papel muy importante en la diversificación de la fauna sudamericana de agua dulce [93], incluyendo a los crustáceos. De hecho, existen evidencias que respaldan el papel del aislamiento geográfico en el proceso de especiación en los crustáceos [37] [94] [95] [96] [97].

Tal como se expuso en la introducción general, los aéglicos tienen una alta diversidad de especies y han desarrollado una gran radiación desde el cenozoico hasta el presente, a pesar de su capacidad limitada de dispersión, por lo que resultan un grupo muy adecuado para estudios evolutivos. Desde un punto de vista biológico, se puede estudiar la evidencia molecular y fenotípica para evaluar la diferenciación de poblaciones que parecen aisladas. La expresión fenotípica tiene un importante componente de historia evolutiva [92] [98] y el análisis de forma cuantitativa puede ayudar a definir la variación intra e interespecífica [31] [37] [99]. Por otro lado, el conocimiento de las genealogías moleculares intraespecíficas permite inferir cómo los procesos paleoclimáticos afectaron la dinámica de las poblaciones y determinar la estructura genética actual [100].

El género *Aegla* es un buen modelo para aplicar el análisis morfométrico porque presenta aspectos de su fenotipo bien conservados y se ha demostrado que su caparazón puede variar dentro y entre especies [6] [32] [33]. Varios estudios han descrito el tamaño y la forma de estos organismos. Además, Giri y Loy [32] estudiaron las poblaciones de *A. neuquensis* y *A. riolimayana* y encontraron diferencias entre sexos y especies, especialmente entre poblaciones de lagos y ríos. Hepp *et al.* [33] estudiaron diferentes poblaciones de *A. plana* y descubrieron que la variación morfológica está relacionada con variables ambientales. Fernandes y Bichuette [101] encontraron diferencias morfológicas entre individuos de *A. schmitii* que habitan corrientes y cuevas epígenas. Marchiori *et al.* [37] analizaron poblaciones de *A. longirostri* en seis ríos del sur de Brasil y encontraron diferencias significativas en la forma del caparazón entre todas las poblaciones, lo que podría indicar la existencia de especies crípticas o un proceso incompleto de especiación. Giri y Collins [4] observaron un patrón clinal en toda la distribución de *A. uruguayana*, que podría atribuirse a la deriva genética y al

aislamiento geográfico de las cuencas, las diferencias en las características ambientales y la baja capacidad de dispersión de estos organismos.

También se han llevado a cabo estudios con técnicas moleculares en la familia Aegliidae para comprender su evolución y diversificación. Pérez-Losada *et al.* [25] compararon patrones filogeográficos en *A. alacalufi* y *A. neuquensis* de la Patagonia y descubrieron que sus poblaciones divergían debido a los diferentes procesos de aislamiento. Giri *et al.* [23] utilizaron marcadores moleculares para analizar la estructura genética de *A. uruguayana*, pertenecientes a la cuenca del Plata, y hallaron que poblaciones que habitan diferentes subcuencas, tienen historias evolutivas independientes. Además, la población oriental (Río Tercero) presentaba una estructura genética diferente de las poblaciones occidentales (Ríos Paraná y Uruguay). Al estudiar los eventos paleogeográficos, infirieron que dicha población no había sido afectada por la transgresión marina a diferencia de las demás, por lo que se trataría de la población ancestral. Estos resultados sugieren que la historia geomorfológica de esta cuenca proporciona evidencia para el aislamiento o la reducción del flujo de genes entre estas poblaciones. Recientemente, Crivellaro *et al.* [24] llevaron a cabo un estudio molecular para evaluar la monofilia de *A. longirostri* y observaron la presencia de dos clados principales (Norte y Sur), que, aunque geográficamente cercanos, eran genéticamente muy distintos entre sí. Los autores propusieron que podría tratarse de especies crípticas, es decir, especies distintas, pero morfológicamente muy similares. Sin embargo, otros autores no encontraron especies crípticas en *A. platensis*, un aégliido ampliamente distribuido con baja diversidad genética [27]. A pesar de que *A. longirostri* y *A. platensis* son especies ampliamente distribuidas, que ocupan gran variedad de ambientes, no se comportan de la misma forma en cuanto a su filogeografía. Todos estos trabajos dan cuenta de la diversidad de historias evolutivas que podemos encontrar dentro del género, a pesar de que morfológicamente estos cangrejos parecen ser muy similares, posiblemente por la gran radiación que tuvieron en el sur de América del Sur [7].

Aegla singularis habita los arroyos de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay (sistema del río de La Plata) en la provincia Paranaense de la región neotropical de Sudamérica (Misiones, Argentina). En el área de distribución de la especie, los ríos Paraná y Uruguay están completamente separados por una cadena montañosa, la Sierra Central [102], los dos ríos convergen a más de mil kilómetros del sitio de estudio. De acuerdo con esta caracterización, la población de ambas cuencas está aislada geográficamente, considerando que hay poco o ningún flujo de genes entre ellas. En este escenario, se espera que mecanismos como la deriva genética y la selección direccional sean más pronunciados, ya que la población adquiere formas evolutivas independientes que podrían aumentar la variación fenotípica [5] [103] debido a la ausencia o al flujo genético muy bajo. Aunque *A. singularis* podría considerarse un buen modelo de estudio para la especiación debido a su distribución

restringida y la barrera geográfica que separa las cuencas que habita, su filogeografía y evolución aún no han sido estudiadas. La presencia de una cadena montañosa continua y la falta de conectividad entre las cuencas superiores del río Paraná y río Uruguay son barreras potenciales para el flujo de genes y podrían inducir la divergencia. El estudio de dicho proceso impulsado por el aislamiento geográfico ayudaría a comprender los procesos evolutivos en otras especies de aéglidos y, en general, podría presentar algunos de los escenarios que explican la gran diversidad del género *Aegla*. Además, podría ser un modelo para responder preguntas sobre otras especies de decápodos de agua dulce en los que los procesos evolutivos no han sido suficientemente estudiados.

2. OBJETIVOS

Evaluar el proceso de divergencia impulsado por el aislamiento geográfico como factor principal, utilizando datos morfométricos y moleculares.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo y colección de especímenes

Para este trabajo se utilizaron en total 165 especímenes de *A. singularis* (Paraná: 58 hembras y 62 machos; Uruguay: 19 machos y 26 hembras) de 11 afluentes de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay ubicados en la provincia de Misiones, Argentina (Figura 2.1, Tabla 2.1).

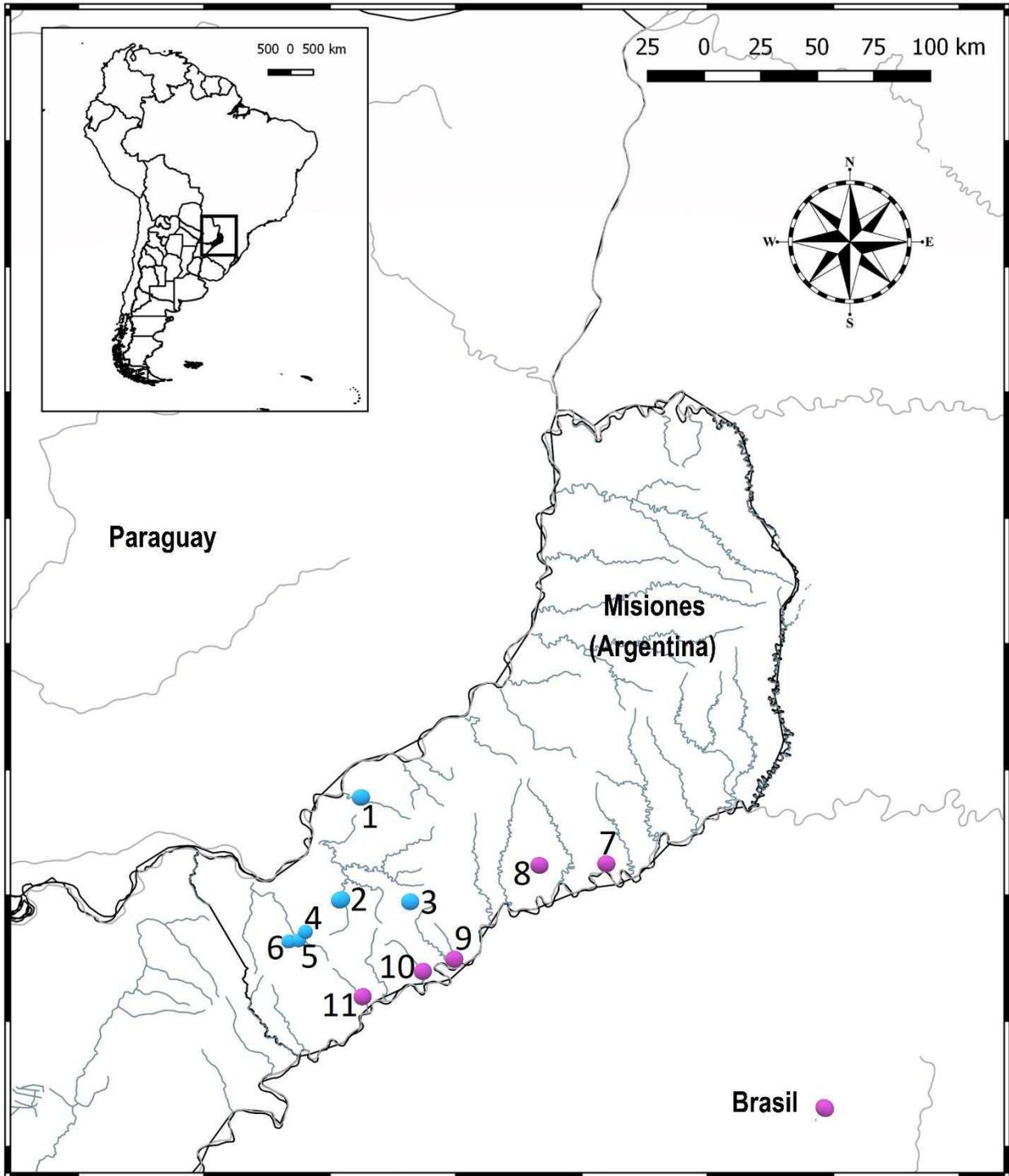


Figura 1.1- Sitios de colecta de muestras de *A. singularis* en la provincia Misiones (Argentina), y sitio de la secuencia de Brasil que se usó de GenBank. El color celeste representa a los arroyos que pertenecen a la Cuenca del Paraná y el violeta a los arroyos de la Cuenca Uruguay. Arroyos (sitios de muestreo): 1: Ñacaguanzú, 2: Isabel, 3: Mártires, 4: Anyico, 5: Liso, 6: Coaty, 7. Los Muertos, 8. Shancay, 9. Panambí, 10. Intersección, 11. Santa María.

Algunos de los ejemplares utilizados se encontraban en la colección de muestras del Laboratorio de Macrocrustáceos (INALI-CONICET-UNL), colectados en los años 2009 y 2011. Por otra parte, en el año 2016, en el marco de las actividades propuestas para esta tesis, se realizó una campaña de colecta de material biológico a la provincia de Misiones, donde se completó el muestreo de *A. singularis* (Figura 2.2). En el momento del muestreo, los arroyos presentaban poca profundidad, con diferentes grados de transparencia y velocidad del corriente, además tenían poca vegetación sumergida. Su lecho estaba compuesto principalmente de arcilla, rocas y arena. Antes de extraer el músculo para la futura extracción de ADN y tomar la fotografía, las muestras se crioanestesiaron (la temperatura de las muestras se redujo, en agua fría a 0 °C) hasta que los cangrejos no respondieron a los estímulos.



Figura 1.2- Muestreo de aéglidos con copo de mano en el arroyo Shancay (Cuenca Uruguay) de la provincia de Misiones.

Tabla 1.1- Descripción de los ejemplares de *A. singularis* utilizados para el estudio: ubicación geográfica (código de mapa, cuenca, arroyo y coordenadas geográficas) del lugar de colecta; Número de individuos utilizados en los análisis (n), número de haplotipos (Nh), diversidad haplotípica (Hd). ADNmt: ADN mitocondrial; ADNnu: ADN nuclear; MG: Morfometría Geométrica

Código o mapa	Cuenca	Arroyo	Coordenadas geográficas	Código árbol	ADNmt			ADNnu			MG
					n	Nh	Hd	n	Nh	Hd	n
1	Paraná	Ñacaguanzú	27° 7'14.50" S 55°22'22.97" O	Nac	6	1	0	5	4	0.9	16
2		Isabel	27°31'0.54" S 55°27'0.15" O	Isa	5	1	0	4	2	0.5	11
3		Mártires	27°31'21.84" S 55°10'45.17" O	Mar	10	3	0.688	2	2	1	24
4		Anyico	27°39'876" S 55°36'560" O	Any	8	5	0.785	7	5	0.857	33
5		Liso	27°40'26.92" S 55°37'13.67" O	Lis	4	3	0.833	7	4	0.714	21
6		Coaty	27°41'9.60" S 55°39'18.00" O	Coa	4	3	0.833	1	1	1	12
7	Uruguay	Los Muertos	27°22'18.66" S 54°24'25.56" O	LMu	-	-	-	2	0	1	6
8		Shancay	27°22'18.66" S 54°40'39.54" O	Sha	5	5	1	3	2	0.667	14
9		Panambí	27°44'46.05" S 54°59'59.12" O	Pan	8	3	0.464	8	2	0.535	13
10		Intersección	27°47'52.20" S 55° 8'34.14" O	Int	-	-	-	1	0	-	4
11		Santa María	27°54'13.92" S 55°22'19.20" O	SMa	4	1	0	1	1	1	8

3.2 Análisis de diversidad genética

La extracción de ADN y la amplificación con marcadores se realizó tal como se detalla en el capítulo 1. Se amplificaron los fragmentos de interés para un total de 95 especímenes de *A. singularis*, 54 para COII y 41 para EF α 1. También se agregó al análisis una secuencia del gen mitocondrial COII de GenBank de un espécimen brasileño [7] (Código de acceso: AY595739.1 GI: 46989080).

Las secuencias de ADN se alinearon utilizando el algoritmo ClustalW [67] implementado en el software MEGA7 [65]. El alineamiento se realizó con la configuración predeterminada y se ajustó de forma manual cuando fue necesario. La diversidad genética se evaluó utilizando los estimadores de diversidad de nucleótidos (π) y diversidad de haplotipos (h) en DnaSP [68]. Para estudiar la estructura genética, se utilizó el análisis de la varianza molecular [76] (AMOVA) con el software Arlequin 3.5 [69].

3.3 Análisis filogeográficos

Los resultados de los análisis filogeográficos se visualizaron en una red de haplotipos y en un árbol filogenético. Para construir las redes de haplotipos se utilizó el programa Network (fluxus-engineering.com) y el MrModel Test [74] para estimar el mejor modelo de sustitución. El modelo HKY + I fue elegido para la inferencia filogenética posterior en Mr. Bayes [73]. Se realizaron dos análisis con cuatro cadenas, 1000000 generaciones iniciales de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) y 5000000 generaciones posteriores.

Los tiempos de divergencia de los dos clados (Paraná y Uruguay) para el gen mitocondrial COII fueron calculados mediante Beast 1.8.2 [104], tomando como tasa de sustitución la calculada por Xu *et al.* [16] para el género *Aegla* (0,118 sustituciones por sitio por millón de años). Se realizaron dos corridas independientes de 200 millones de cadensa de Markov, las cuales se combinaron en el programa Tracer 1.7.1 [105]. Se construyó un análisis de agrupamientos (*clusters*) utilizando el paquete “Enfoque bayesiano para el agrupamiento filogeográfico” (BPEC) [106] implementado en el proyecto R [107] para probar la existencia de flujo de genes entre las poblaciones actuales y los sitios geográficos ancestrales más probables, es decir, en qué sitio es más probable que se haya originado la especie (parámetros, $ds=0$, número máximo de migraciones= 5 y 200 millones de iteraciones).

3.4 Análisis de la variación de forma y tamaño

Se procedió con la captura de fotos de especímenes adultos (de acuerdo con [108]) de *A. singularis* (Tabla 2.1), de acuerdo a lo detallados en el capítulo de Materiales y Métodos.

Se identificaron 19 puntos de referencia (*landmarks*) en el caparazón dorsal para usar como configuración de base (Figura 2.3). La digitalización de los puntos de referencia se realizó mediante el programa tpsDig2 versión 2.30 [87]. El error en la fotografía y la digitalización se estimaron a través del análisis de Procrustes ANOVA utilizando el programa MorphoJ [88]. También se evaluó el dimorfismo sexual utilizando un método de validación cruzada de exclusión (basado en Análisis Discriminante Lineal - LDA-), para determinar si dentro del grupo las muestras presentan diferencias entre los sexos. Se realizó un estudio de la alometría, utilizando la regresión lineal entre los dos grupos (poblaciones de la cuenca de Paraná vs. Uruguay), para evaluar la relación entre el tamaño y la forma. Después de eso, se realizó un

MANCOVA para probar las pendientes entre grupos usando TPSReg versión 1.45 [109]. Para analizar el tamaño entre las muestras de dos grupos, se llevó a cabo la prueba ANOVA. Se realizó un PCA (Análisis de Componentes Principales) y una prueba de permutación (10000 permutaciones) en MorphoJ [88] mediante validación cruzada (basada en LDA) para evaluar la presencia de patrones de diferenciación de grupos de ambas cuencas fluviales.

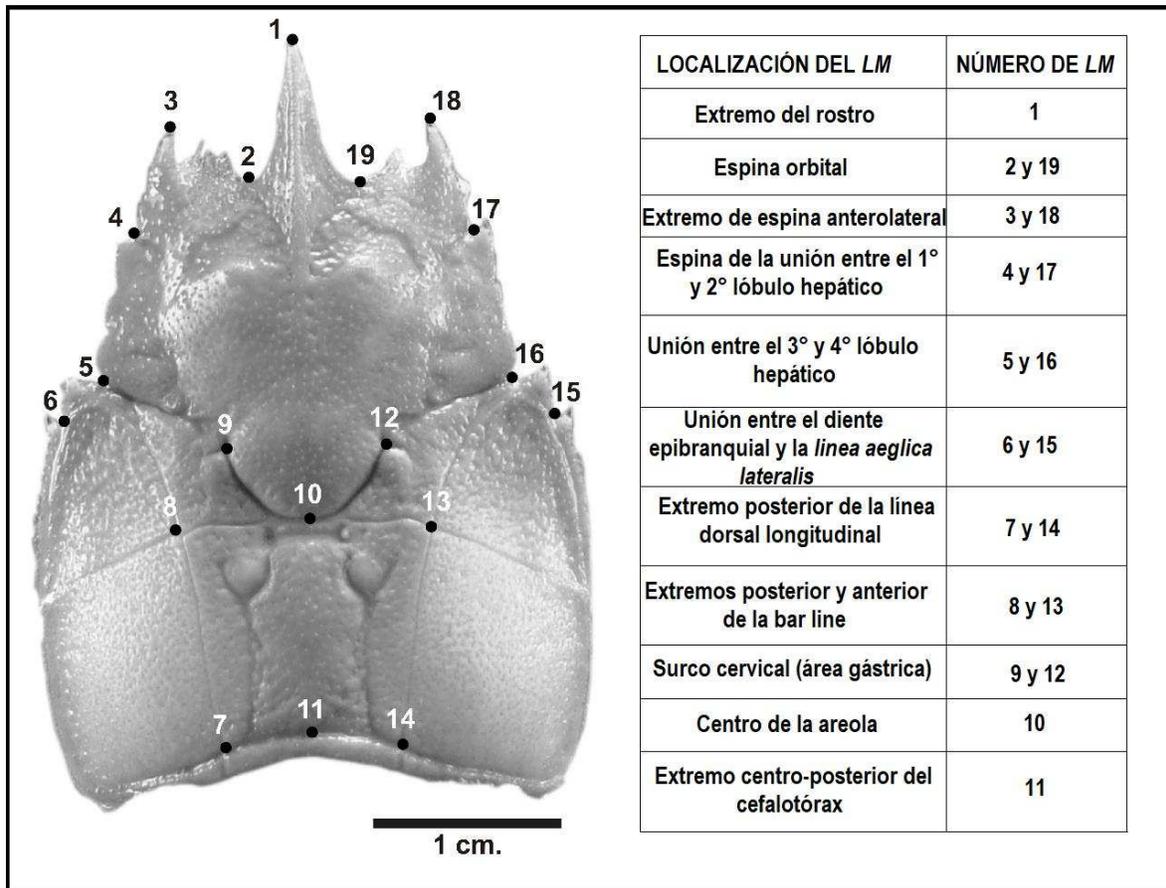


Figura 1.3- Ubicación de *landmarks* sobre una imagen del cefalotórax en vista dorsal de un aéguido para el análisis de morfometría. A la derecha se muestra la tabla con la descripción de dicha configuración.

4. RESULTADOS

4.1 Estimación de la diversidad genética

A partir de la amplificación del gen mitocondrial COII, se obtuvo un fragmento de 493 pb, para cada uno de los 55 individuos (54 secuencias propias y una secuencia de GenBank). Luego del alineamiento de todas las secuencias, se identificaron un total de 53 sitios polimórficos y se definieron 19 haplotipos basados en estos sitios polimórficos. El análisis de la diversidad genética para todas las muestras mostró una alta diversidad de nucleótidos (π : 0,04109) y una alta diversidad de haplotipos (h : 0,834). Por otro lado, se amplificó y secuenció un fragmento de 250 pb del gen EF α 1 en 41 individuos. Para este caso, se identificaron un total de 109 sitios polimórficos y se definieron 18 haplotipos basados en estos sitios polimórficos. Los análisis de la diversidad genética para todas las muestras también mostraron una alta diversidad de nucleótidos (π : 0,11684) y una alta diversidad de haplotipos (h : 0,820).

La estructura genética de las poblaciones se analizó utilizando el índice F_{ST} ⁷⁰[70]. Este valor, mostró diferencias entre las cuencas fluviales, para los dos marcadores utilizados, tanto para EF α 1 (F_{ST} = 0,3251, p = 0,0001 \pm 0,0001) como para COII (F_{ST} = 0,9325, p < 0,0001 \pm <0,0001), sugiriendo una estructuración genética.

4.2 Análisis filogeográficos

El árbol filogenético de COII (Figura 2.4) separó a los individuos de ambas cuencas fluviales en dos haplogrupos distintos conectados por una rama de árbol larga. El árbol EF α 1 (Figura 2.5) también presentó los mismos haplogrupos encontrados en el árbol COII, pero la divergencia entre ellos fue menor y dos individuos no fueron segregados de acuerdo con su río de origen. Las redes de haplotipos muestran la misma tendencia que los árboles, en el caso de la red de EF α 1 se observa que hay muchos haplotipos intermedios que no fueron muestreados (representados por puntos negros), por lo que la diversidad genética podría estar subestimada. Los tiempos estimados de divergencia mediante el programa Beast 1.8.2 [104] fueron de aproximadamente 13,89 Ma (+/- 1,5 Ma) entre los clados del río Uruguay y el río Paraná.

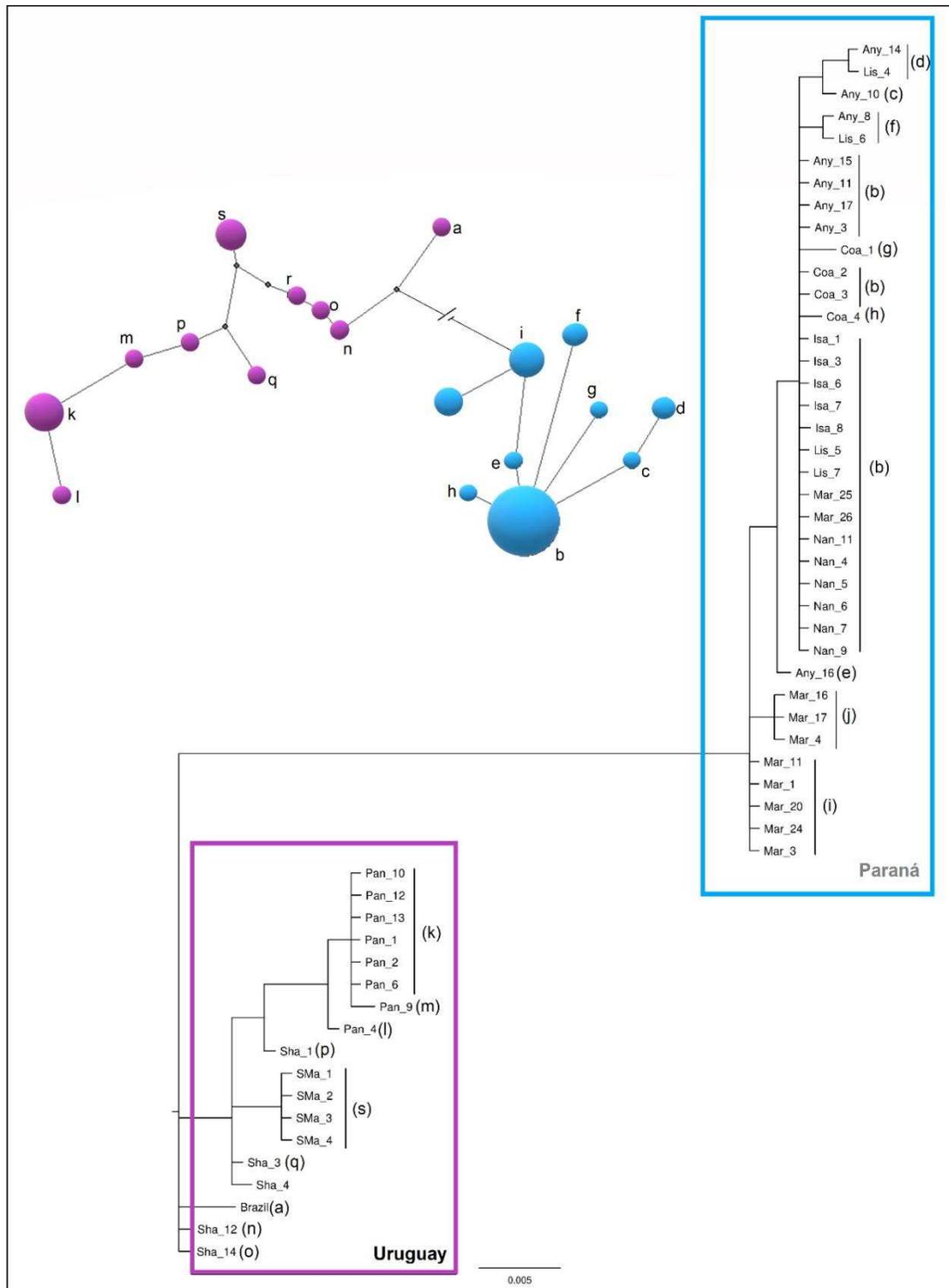


Figura 1.4- Árbol filogenético y red de haplotipos generada con la información de COII. Las muestras que corresponden a la cuenca Paraná se muestran en color celeste y las del Uruguay en violeta. Las letras que indican los diferentes haplotipos en las redes se condicen con las de los árboles (entre paréntesis).

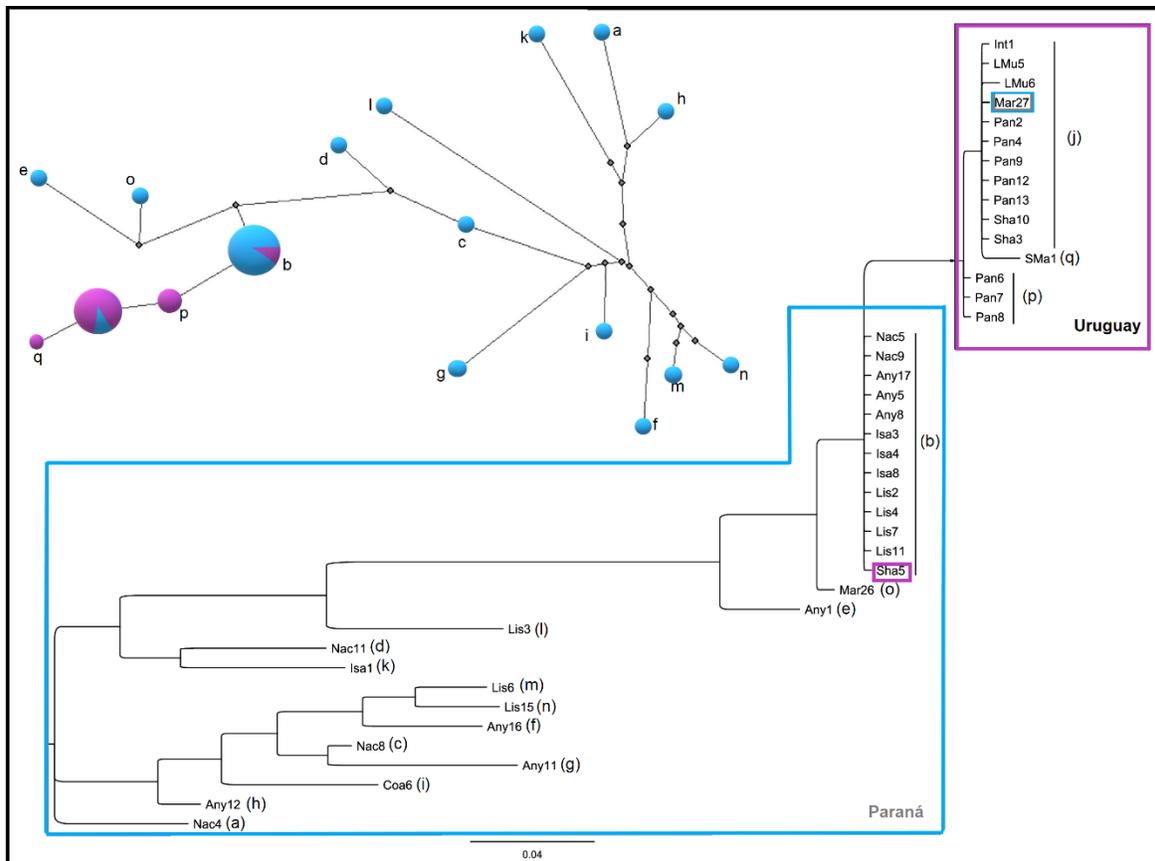


Figura 1.5- Árbol filogenético y red de haplotipos generada con la información de EF α .1. Las muestras que corresponden a la cuenca Paraná se muestran en color celeste y las del Uruguay en violeta. En cada haplogrupo se marcan en el color correspondiente las muestras que se agruparon en la cuenca contraria (Sha5 y Mar27). Las letras que indican los diferentes haplotipos en las redes se condicen con las de los árboles (entre paréntesis).

En el análisis BPEC (Figura 2.6) se observaron dos grupos o clústeres que agrupan las poblaciones del Paraná (gris y celeste), aunque también incluyen los arroyos Intersección y Santa María del Uruguay. Por otra parte, los clúster verde y rojo definen poblaciones del Uruguay. Los clústeres amarillo y fucsia se superpusieron ubicándose en el medio de las dos cuencas fluviales, lo que podría representar el flujo genético pasado entre ellos, ya que actualmente no existe conexión entre dichas cuencas. En este gráfico no se muestran las diferencias bien marcadas entre las poblaciones como en los árboles filogenéticos y redes de haplotipos, por lo que se puede suponer que la divergencia aún está en curso. Este análisis también indicó que los sitios ancestrales más probables para *A. singularis* son los arroyos Coaty, Isabel y Liso, todos ellos en la cuenca del río Paraná.

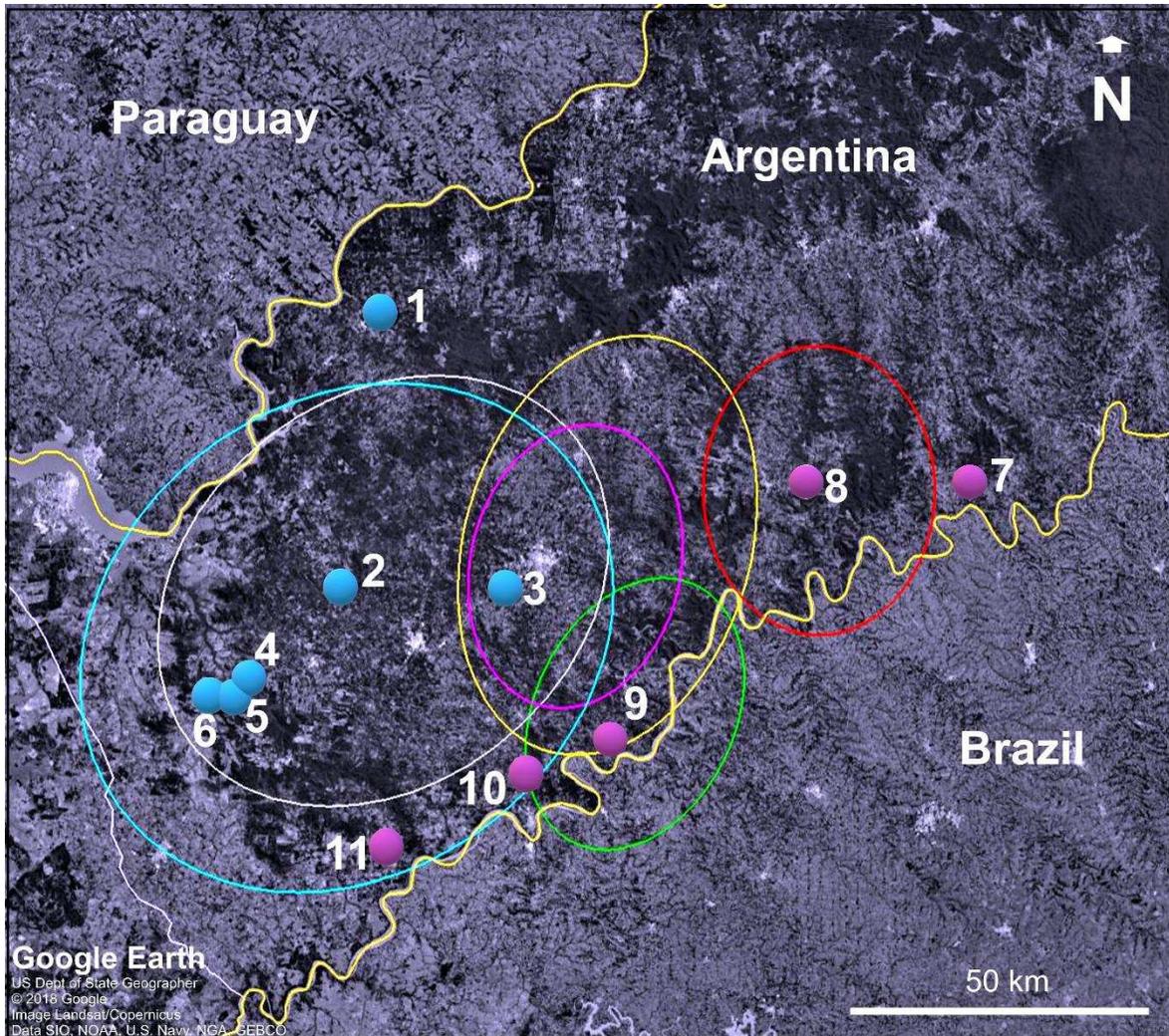


Figura 1.6- Mapa de análisis de clúster creado por el software BPEC utilizando la región del gen COII. Los colores representan diferentes grupos y los puntos de referencia representan sitios de muestreo (1: Ñacaguanzú, 2: Isabel, 3: Mártires, 4: Anyico, 5: Liso, 6: Coaty, 7. Los Muertos, 8. Shancay, 9. Panambí, 10. Intersección, 11. Santa María).

4.3 Variación de forma y tamaño

El primer paso consistió en evaluar el error al fotografiar los especímenes y el de digitalización de *landmarks*. Este arrojó como resultado que ambos no agregaron una variación significativa a las diferencias de forma entre los individuos. Luego se evaluó el dimorfismo sexual mediante prueba de LDA, el cual no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los individuos de cada grupo ($p > 0.05$). Es decir, no se encontraron diferencias de forma entre los sexos. En cambio, se detectó alometría (explicado = 2,3861%, $p = 0,0001$) cuando fue evaluada por el programa MorphoJ [88]. Sin embargo, debido a que el MANCOVA realizado posteriormente reveló que la interacción entre los grupos (cuencas) fue estadísticamente significativa, para el resto de los análisis se utilizaron los datos no corregidos.

El análisis de alometría mostró grandes diferencias en los tamaños de los ejemplares de las dos cuencas. De esta manera, la regresión evidencia que el tamaño de los cangrejos de la cuenca del Uruguay fue mayor que los representantes de la cuenca del Paraná (Figura 1.7). La prueba ANOVA sobre el tamaño del centroide corroboró esta afirmación ($F= 83,67$, $df= 1$, $p< 0,0001$). Las poblaciones de la cuenca del Paraná (predichas= 3,0586%, $p= 0,0006$) y las poblaciones de las cuencas del Uruguay (predichas= 4,0808%, $p= 0,0586$) revelan, como se mencionó anteriormente, diferentes patrones de alometría que sería otra evidencia de la divergencia entre las poblaciones de ambas cuencas.

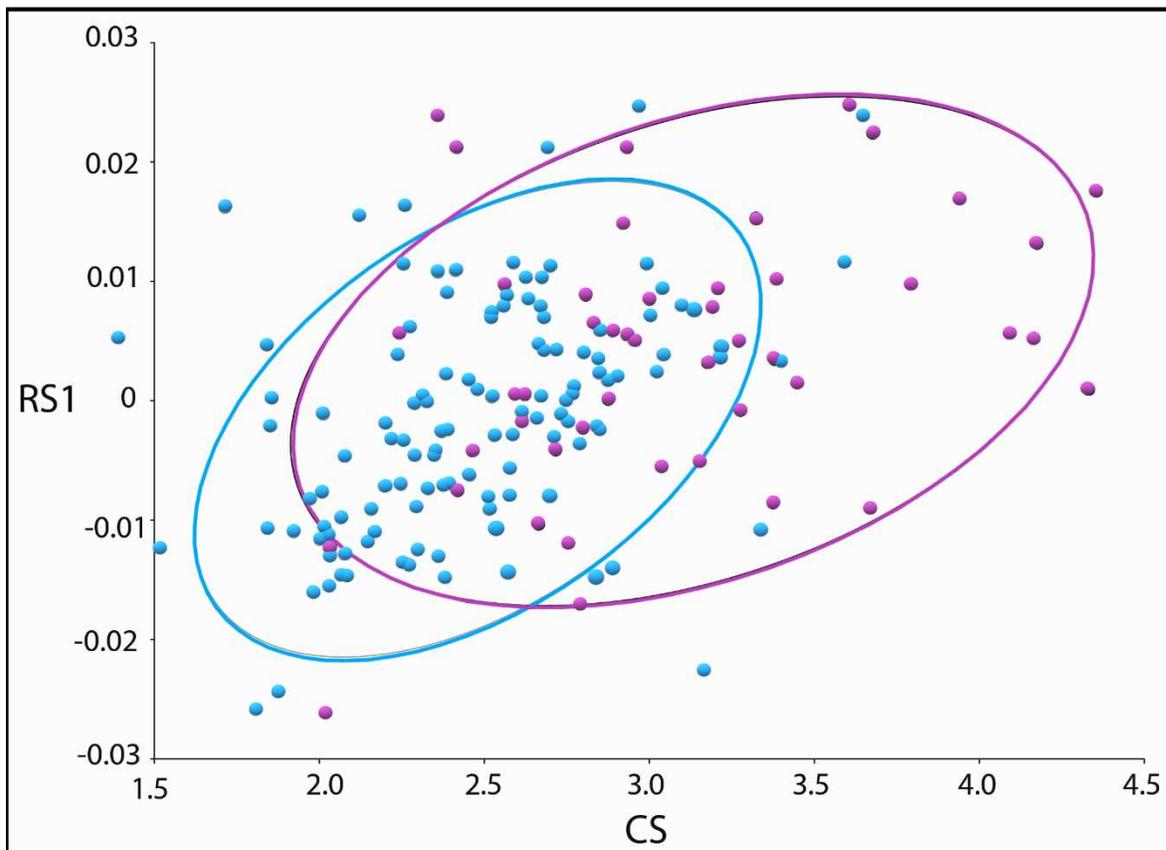


Figura 1.7- Regresión lineal que muestra la alometría y los cambios de forma relacionados con el tamaño del centroide. Cuenca del río Paraná (puntos celestes) y cuenca del río Uruguay (puntos violetas).

También se encontraron diferencias de forma en el PCA (PC1, PC2 y PC3 explicaron 23,11%, 15,56% y 10,07% de variación de forma respectivamente) entre los grupos de Paraná y Uruguay (Figura 2.8). Los diferentes Componentes Principales del análisis revelan un patrón de variación de forma que apoya la hipótesis de separación entre grupos. Como se observa en la Figura 1.8a, en el Componente Principal 1 (PC1) los especímenes pertenecientes a las subcuencas de Paraná y Uruguay prácticamente no se superponen. Además, el Componente Principal 2 revela que la variación de la forma observada en los

especímenes de Paraná fue mayor que los especímenes de Uruguay (Figura 1.8b). La PC3 también muestra diferencias entre los dos grupos, similares a las observadas en la PC1, pero con más superposición. Es decir, en los Componentes Principales que explican el mayor porcentaje de la variabilidad de forma, se observa una marcada diferencia en el cefalotórax de los cangrejos de *A. singularis* cuando se comparan las dos cuencas entre sí.

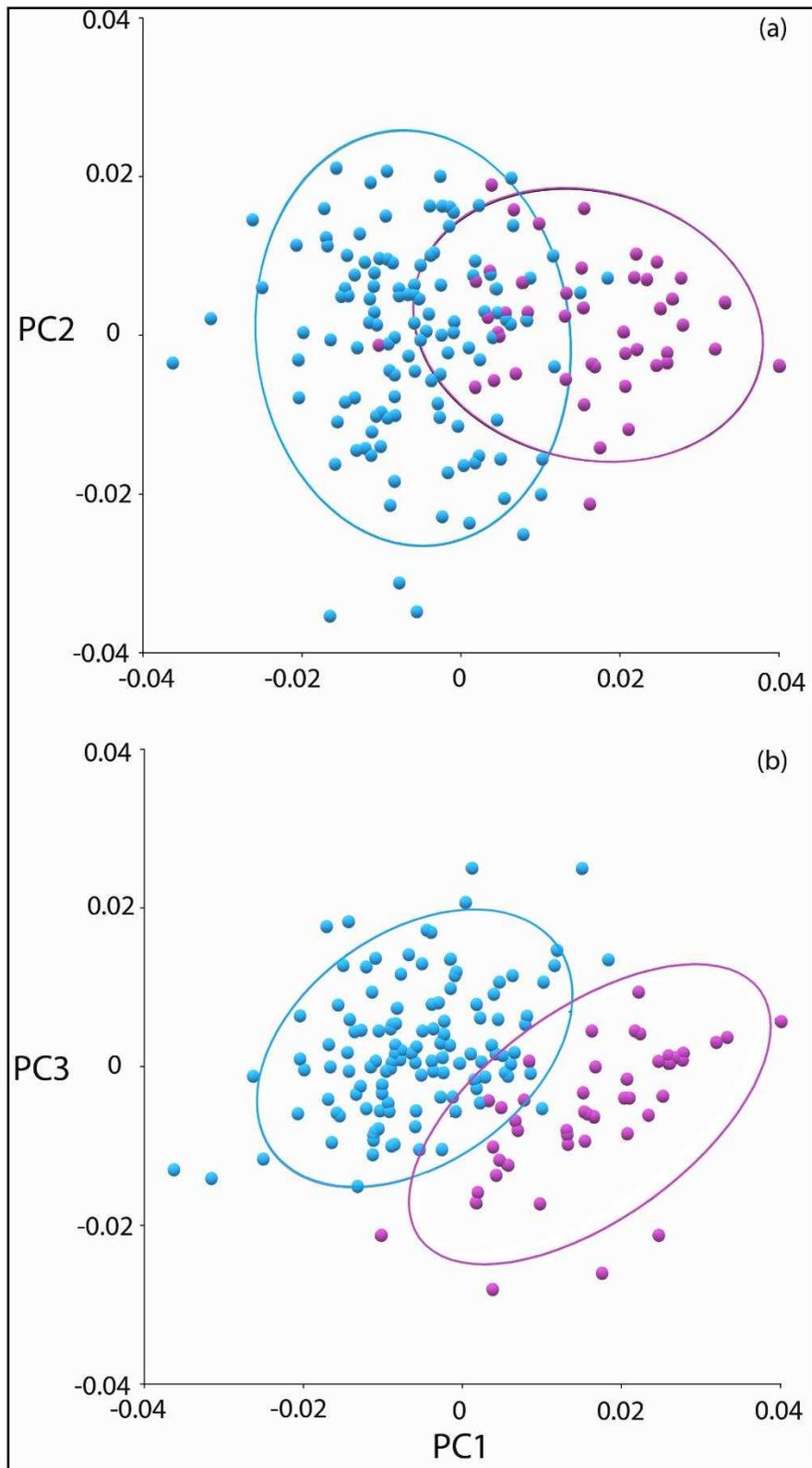


Figura 1.8- Análisis de componentes principales (PCA) de las coordenadas de la forma del caparazón dorsal. PC: Componente Principal A) PC1 y PC2; B) PC1 y PC3. Cuenca del río Paraná (puntos celestes) y cuenca del río Uruguay (puntos violetas).

El LDA de las dos cuencas hidrográficas revela diferencias estadísticas (validación cruzada de exclusión: $p < 0,0001$; en ambos grupos: distancias de Procrustes= 0,0237 y distancias de Mahalanobis= 4,009- Figura 1.9). En este análisis se vieron reforzados los resultados encontrados con PCA. En el gráfico se hace evidente la diferenciación entre los grupos, donde se observa que las barras que representan a cada cuenca están separadas, con superposición sólo en los extremos.

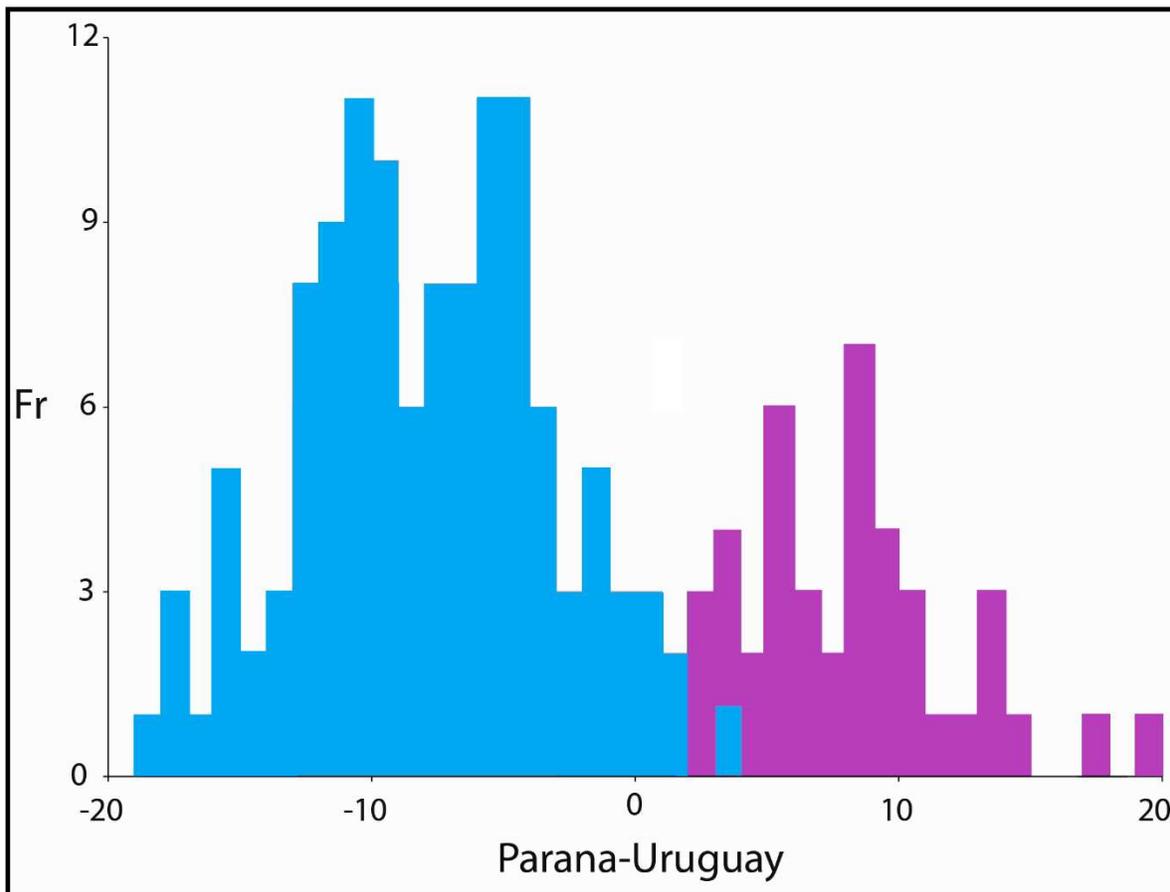


Figura 1.9- Gráfico de validación cruzada de exclusión (basada en Análisis Discriminante Lineal) entre el río Paraná (barras celestes) y Río Uruguay (barras violetas).

La tabla de clasificación entre dos grupos de cuencas mostró: considerando el grupo de la cuenca del Paraná, 114 individuos (97,5%) clasificados en el grupo de Paraná y 6 (2,5%) en el grupo de Uruguay; mientras que, considerando el grupo de la cuenca del Uruguay, los 45 especímenes (100%) estuvieron bien clasificados. Los aéglidos de la cuenca de Paraná tienen un caparazón más delgado y su abdomen y cefalotórax presentan un ancho similar. Las espinas del rostro son cortas y anchas. En el consenso de los aéglidos del río Uruguay, observamos un cefalotórax que se va ensanchando desde el abdomen. Las espinas del rostro también son más alargadas y delgadas (Figura 1.10).

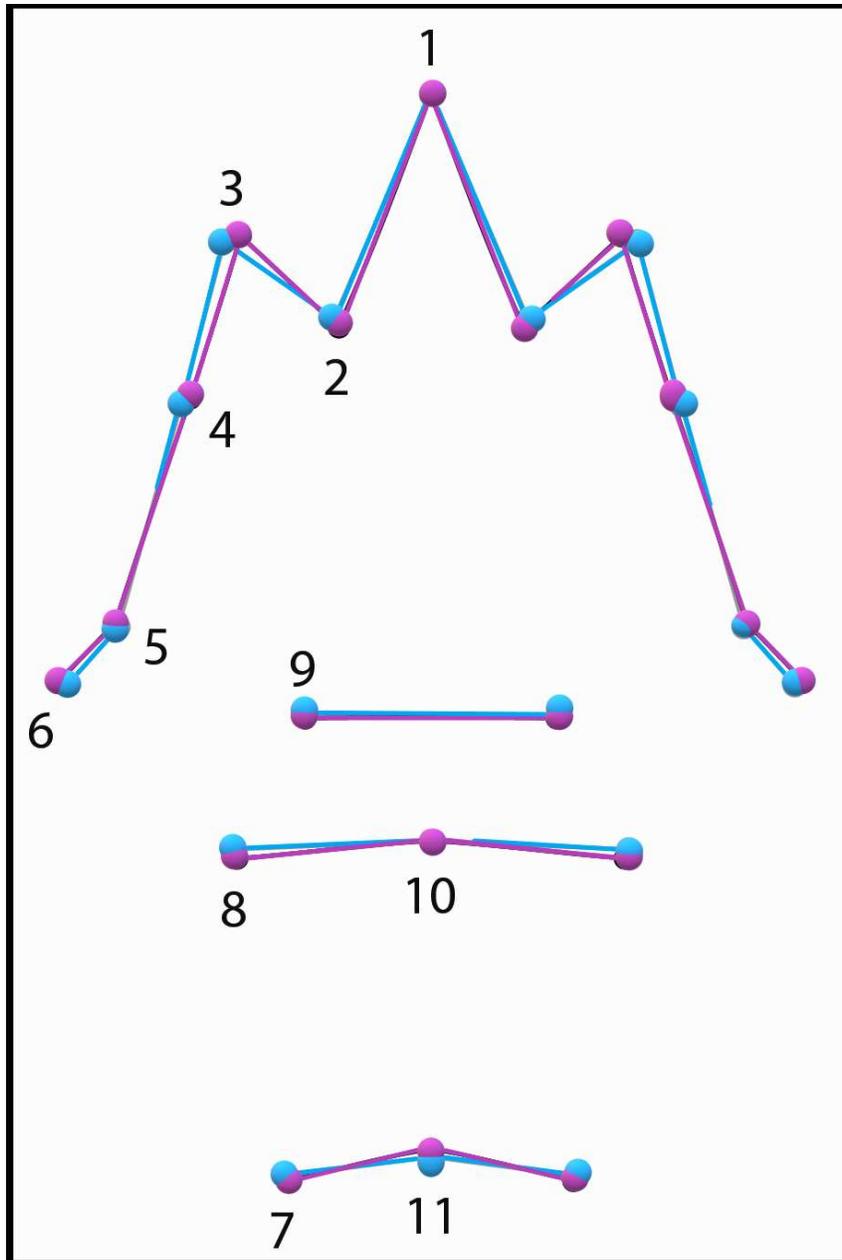


Figura 1.10- Diferencias de forma entre los especímenes de la cuenca del río Paraná (celeste) y del río Uruguay (violeta) indicados por Análisis de función discriminante.

5. DISCUSIÓN

En este capítulo, se estudió la divergencia de *Aegla singularis* en el sur de Sudamérica utilizando datos moleculares y morfométricos. Nuestros resultados sugieren que las poblaciones de *A. singularis* de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay están en proceso de especiación debido al aislamiento geográfico y la consiguiente interrupción del flujo de genes. Tanto el gen mitocondrial (COII) como el nuclear (EF α 1) indican que las poblaciones de *Aegla* se subdividen en dos haplogrupos, de acuerdo con las cuencas hidrográficas bajo estudio. También encontramos que el tamaño corporal y la forma del caparazón de los individuos de *A. singularis* difieren estadísticamente ($p < 0,05$) entre las poblaciones de Paraná y Uruguay. Esto sugiere una diversificación entre las poblaciones de ambas cuencas debido al aislamiento geográfico causado por las montañas de la Sierra Central, que representan una barrera para la migración de los aéglicos

La evidencia genética, filogeográfica y morfológica revela que los grupos de Paraná y Uruguay presentan características diferentes, pero también que el patrón de variaciones es diferente (por ejemplo, diversidad de nucleótidos, diversidad de haplotipos, agrupación filogeográfica, alometría y variación de forma, entre otros). De acuerdo con estos resultados, y teniendo en cuenta que la diversificación genética y morfológica de las poblaciones conducen a la divergencia evolutiva de los linajes, se propone que los dos grupos de aéglicos estudiados son dos linajes separados que aún estarían en proceso de especiación.

En concordancia con estos resultados, en trabajos previos con otras especies de *Aegla* se encontraron diferencias en la estructura genética de las poblaciones y la morfología. Giri y Loy [32] compararon individuos de *A. neuquensis* de lagos y ríos y descubrieron la presencia de dos ecotipos asociados con cada entorno. Fernandes y Bichuette [101] estudiaron especímenes de *A. schmitii* de cuevas subterráneas y ríos superficiales y determinaron la existencia de variaciones morfológicas asociadas con las condiciones ambientales. Marchiori *et al.* [37] revelaron diferencias morfométricas en las poblaciones de *A. longirostri* correlacionadas con la distancia geográfica, lo que demuestra la posible existencia de especies crípticas y la especiación en curso. Posteriormente, Crivellaro *et al.* [24] corroboraron este resultado utilizando marcadores moleculares mitocondriales y nucleares y mostraron que esta especie tiene un origen polifilético y, además, mostraron una alta diferenciación genética entre las poblaciones en dos cuencas hidrográficas geográficamente aisladas y la presencia de especies crípticas. Giri *et al.* [23] y Giri y Collins [4] descubrieron que en *A. uruguayana*, un aéglico ampliamente distribuido, la divergencia en morfología y genética estaba relacionada con la distancia geográfica y que los procesos geoclimáticos que ocurrieron en las cuencas de América del Sur (separación de Gondwana, elevación de los Andes, transgresiones marinas y glaciaciones) podrían haber llevado al aislamiento de las poblaciones. Xu *et al.* [16] examinaron los impactos glaciales del Pleistoceno en el patrón filogeográfico de *A. alacalufi* en la Patagonia chilena y encontraron una gran estructura filogenética en poblaciones de las islas libres de hielo o en el borde del hielo, pero poco profunda en las poblaciones del continente glacial como una consecuencia de los ciclos

glaciales. También sugirieron el aislamiento por vicarianza de la cuenca como un mecanismo importante para producir la diferenciación entre las poblaciones no glaciadas y las poblaciones glaciares. En el estudio de la filogeografía de *A. neuquensis* [26], las muestras de dos ríos (ríos Vaca y Telsen) fueron morfológicamente similares a *A. neuquensis*, pero según los datos moleculares se relacionaron más estrechamente con otros taxones de *Aegla*. Curiosamente, estos ríos están aislados geográficamente de otros sistemas y no se han conectado a ríos que contienen otras poblaciones *A. neuquensis*. Por otro lado, un estudio reciente [27] encontró baja diversidad genética en una especie ampliamente distribuida, *A. platensis*. Encontraron evidencia de solo dos nuevas especies potencialmente no reconocidas de 18 poblaciones en estudio, aunque esta especie parecía ser polifilética. Del mismo modo, Barría *et al.* [98] no hallaron diferencias morfológicas entre las poblaciones de *A. araucaniensis* de los ríos del sistema hidrográfico del río Valdivia, ya que estos ríos están conectados a la cuenca principal, lo que facilita el flujo de genes entre las poblaciones.

Si bien la Sierra Central es fundamental como barrera de aislamiento en la divergencia de los linajes del río Uruguay y del Paraná, debido a que actualmente interrumpe el flujo genético entre las poblaciones, hay otros eventos geoclimáticos que han influenciado la evolución de *A. singularis*. Se estima que la Meseta Misionera, que contiene a la Sierra Central, tiene unos 127 Ma [110] [111] y presenta un relieve abovedado suavemente ondulado, con pendiente hacia los ríos Uruguay y Paraná. Estos ríos y sus afluentes erosionaron a la meseta y le dieron forma de sierra, denominado sierras de Misiones o Central y Victoria [112]. Debido a que el levantamiento de esta Sierra es muy anterior a la colonización de los aéglicos de esta zona (evento estimado por Pérez-Losada *et al.* [7], en 37 Ma para el clado que contiene a las especies *A. singularis* y *A. platensis*) es evidente que otros eventos geoclimáticos intervinieron en la estructura poblacional que se observa actualmente en ambas cuencas. Dado que la especie colonizó los ríos Uruguay y Paraná antes del establecimiento de su actual patrón de drenaje, estimado por Lundberg *et al.*, [2] en ~ 28 Ma (Terciario Tardío), del que no se tienen mayores detalles, es probable que la evidencia nuclear esté mostrando una posible unión de las cuencas cuando esta zona fue colonizada por los aéglicos. Además, según Pérez-Losada *et al.*, [7], la radiación básica de los aéglicos a lo largo del drenaje Paraná-Uruguay ocurrió antes de la formación del Mar Paranaense y el levantamiento final de la Serra do Mar (~ 12 Ma).

Esta transgresión marina extensa (el Mar Paranaense) ocurrió durante el Mioceno tardío, hace entre 15-13 Ma, e inundó la parte central y sur de América del Sur hasta $\sim 17^\circ$ de latitud. Las aguas marinas, que alcanzaron decenas de metros de profundidad en algunos lugares, cubrieron la mayoría de los afluentes occidentales del paleo-Paraná y del paleo-Paraguay y las partes bajas del paleo-Uruguay y paleo-Paraná por ~ 2 Ma hasta que regresaron al Atlántico [113]. Esto explicaría el hecho de que el gen nuclear muestre menor estructura entre los clados de las subcuencas, debido a que la especie se habría originado con anterioridad a estos eventos geoclimáticos. Por otra parte, la divergencia observada para el gen mitocondrial, el pasado

intermedio de las especies, muestra que los clados encontrados para el Uruguay y el Paraná divergieron hace aproximadamente 13 Ma, posiblemente luego de la retracción marina. Las repetidas intrusiones y retracciones marinas han producido muchos eventos de vicarianza [2] y, bajo estas condiciones, se pueden postular episodios de aislamiento en refugios en los arroyos y ríos seguido por recolonización de las áreas de agua dulce renacidas [7]. Es posible que la transgresión marina haya aislado poblaciones de *A. singularis* a ambos lados de la Sierra Central en refugios de agua dulce. Como reveló uno de los análisis coalescentes del gen mitocondrial, los lugares ancestrales más probables para *A. singularis* fueron los arroyos Coaty, Isabel y Liso, todos ellos en la cuenca del río Paraná. Es posible que estos sitios actuaran como refugios mientras el mar estaba en el continente y que, a medida que el mar retrocedió, la especie fuera colonizando el resto de los arroyos del Paraná y también la cuenca del Uruguay. Es por ello que el gen nuclear aún no ha alcanzado el sorteo completo de los linajes debido a su tiempo de coalescencia cuatro veces más largo que los genes mitocondriales [114]. Es importante tener en cuenta que los ríos Paraná y Uruguay fueron un solo río hasta hace unos 2,5 Ma [102], por lo que la hipótesis de refugios parece ser la más probable dado que la separación de los ríos fue posterior al evento de vicarianza de *A. singularis*, estimado mediante evidencia mitocondrial. Existen evidencias de que la transgresión marina del Mioceno Tardío afectó otras especies del género, aislando poblaciones e impidiendo el flujo genético entre ellas. Giri y Collins [4], encontraron que la distribución de *A. uruguayana* podría haberse restringido a ciertos refugios durante este evento y, al retraerse el mar, las poblaciones de esta especie recolonizaron cursos de aguas de las diferentes subcuencas que habitan actualmente.

Finalmente, los resultados del análisis filogeográfico y morfométrico muestran evidencias claras de que la restricción geográfica del flujo génico sería la conductora del proceso de especiación. Sin embargo, el contraste encontrado en el análisis de la bibliografía, donde a veces no hay patrones filogeográficos claros, sugiere que el hábitat, los cambios climáticos y geológicos históricos y la baja capacidad de dispersión de estos cangrejos pueden afectar la diversificación y la especiación de *Aegla* de manera diferente según la especie.

6. CONCLUSIONES

- Los análisis morfométricos genéticos, filogeográficos y morfogeométricos proporcionaron evidencia de la divergencia en curso de las poblaciones de *A. singularis* de los ríos Paraná y Uruguay en dos linajes distintos debido a las restricciones del flujo génico causadas por la barrera de las montañas de la Sierra Central.
- La transgresión marina del Mioceno (Mar Paranaense) afectó a las poblaciones de *A. singularis*, probablemente aislándolas en refugios desde los que recolonizaron ambas cuencas luego de la retracción marina. Al bajar el mar, la Sierra Central quedó al descubierto y las poblaciones quedaron separadas, comenzando el proceso de especiación de *A. singularis*.
- El aislamiento geográfico, que restringió el flujo de genes, es probablemente un punto de partida recurrente para el proceso de especiación en *Aegla* y una de las causas principales su diversidad de especies.

Capítulo 2: Diversidad oculta en los arroyos misioneros



Capítulo 2: Diversidad oculta en los arroyos misioneros

1. INTRODUCCIÓN

Identificar los límites de las especies es importante no sólo para el conocimiento y la clasificación adecuada de la biodiversidad [115], sino para su conservación [116]. Es posible que la familia Aeglidae albergue una gran diversidad oculta, ya que se han descrito nuevas especies en los últimos años [18] [117] [118] [119] [120] [121] [122] [123] [124]. En principio, las evidencias morfológicas, fisiológicas, ecológicas y de comportamiento fueron las utilizadas para delimitar especies. Sin embargo, los marcadores genéticos han resultado muy efectivos para la clasificación de los taxones, sobre todo cuando las demás evidencias no son suficientes [125] [126].

Los caracteres diagnósticos utilizados para clasificar a los cangrejos del género *Aegla* son muy limitados en número y muestran baja variación en términos de estado del carácter [127], por lo que la diversidad real del género podría subestimarse [27]. La alta variabilidad morfológica de este género hace que establecer los límites entre especies sea dificultoso [6] [10] [11] [31] [129] [130] [131] [132] [133]. Por ejemplo, Moraes *et al.* [18] estudiaron *A. paulensis* mediante morfometría clásica y marcadores del genoma mitocondrial encontrando que, aunque estaba catalogada como una especie, era un complejo compuesto por cinco especies crípticas. Crivellaro *et al.* [24], también hallaron evidencias de que *A. longirostri* era en realidad un grupo polifilético formado por varios clados que serían especies crípticas. Los investigadores destacan el potencial de encontrar más especies crípticas dentro de este género a medida que se revisen los grupos taxonómicos con distintas evidencias [24] [27] [37].

Por otra parte, Giri y Loy [32], estudiaron mediante morfometría geométrica las variaciones de forma del cefalotórax en *A. riolimayana* y *A. neuquensis*, dos especies de la Patagonia argentina cuya distribución geográfica se solapa. Entre los ejemplares, se encontraban algunos que presentaban caracteres diagnósticos “intermedios” entre dichas especies. Estos individuos “intermedios” ya habían sido descrito por otros autores [6] [127] [134] [135]. Sin embargo, a pesar de esta superposición de caracteres, Giri y Loy [32] encontraron mediante sus análisis geomorfométricos, que la variación de forma ejemplares parecía ser muy similar a la de *A. neuquensis*, lo que sugiere que, en realidad, representan una expresión de variación intraespecífica de esa especie. Además, estos autores observaron que la forma del cefalotórax de *A. riolimayana* y *A. neuquensis* variaba intraespecíficamente según se encontraran en ríos o en lagos, y que la variabilidad era mayor en los individuos que habitaban ríos respecto de las poblaciones en arroyos, probablemente porque los ríos son sistemas menos estables.

En arroyos de la cuenca del río Uruguay de Misiones (Argentina) se han encontrado aéglicos con características morfológicas intermedias entre las especies *A. platensis* y *A. singularis*, a los que fue

imposible de clasificar según la clave taxonómica vigente [127], a la que se nombró como *Aegla sp.* Dado que la prioridad para la conservación de los hábitats a menudo se basa en la estimación de la riqueza de especies, el endemismo y el estado de conservación, y, sumado al hecho de que varias especies de *Aegla* están en peligro [8] [17] [18] [20], es imprescindible cuantificar con precisión la diversidad oculta de los aéglicos [24]. Asimismo, una gran cantidad de especies de aéglicos tienen la particularidad de ser endémicas [18], rangos de distribución muy específicos [37], una notablemente restringida capacidad de dispersión y altas tasas de evolución [16] por lo que podrían constituir una nueva especie o una especie críptica. Por otra parte, debido a que se observan caracteres intermedios, otra hipótesis sería que se trate de un caso de hibridación entre *A. platensis* y *A. singularis*. Si bien esto no ha sido documentado para el género, hay numerosa evidencia de híbridos en otras especies de decápodos [137] [138] [139] [140] [141]. También podría tratarse de una variación intraespecífica de alguna de estas dos especies que cohabitan en dicha zona geográfica, tal como Giri y Loy [32] encontraron para *A. neuquensis*.

Para dilucidar la sistemática de los ejemplares de *Aegla sp.* que conforman la población de los arroyos de la provincia de Misiones, se decidió utilizar marcadores moleculares y morfometría geométrica debido a que la evidencia conjunta proporcionaría resultados más robustos en la evaluación de individuos con caracteres diagnósticos intermedios y en la detección de posibles especies crípticas [17] [18] [24]. Asimismo, la información filogeográfica proporciona una herramienta objetiva para ayudar en las investigaciones de delimitación de especies y para ayudar a definir los límites de las especies crípticas, especialmente para los organismos que muestran un endemismo de escala fina [140]

2. OBJETIVOS

Aportar al esclarecimiento de la sistemática de los ejemplares de *Aegla sp.* que conforman la población de los arroyos de la provincia de Misiones, mediante marcadores moleculares y análisis de morfometría geométrica.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Entre la colección de especímenes de *Aegla* del Instituto Nacional de Limnología (INALI-CONICET), se encuentran individuos pertenecientes a los arroyos Pesiguero, Itacaruaré y Panambí (ubicados en la provincia de Misiones, Argentina. Figura 2.1) que presentan caracteres diagnósticos intermedios entre *A. platensis* y *A. singularis* (especies simpátricas en esta zona) y que fueron descubiertos al momento de ser clasificados según la clave dicotómica para el género [127]. En adelante, estas muestras serán llamadas como *Aegla sp.*

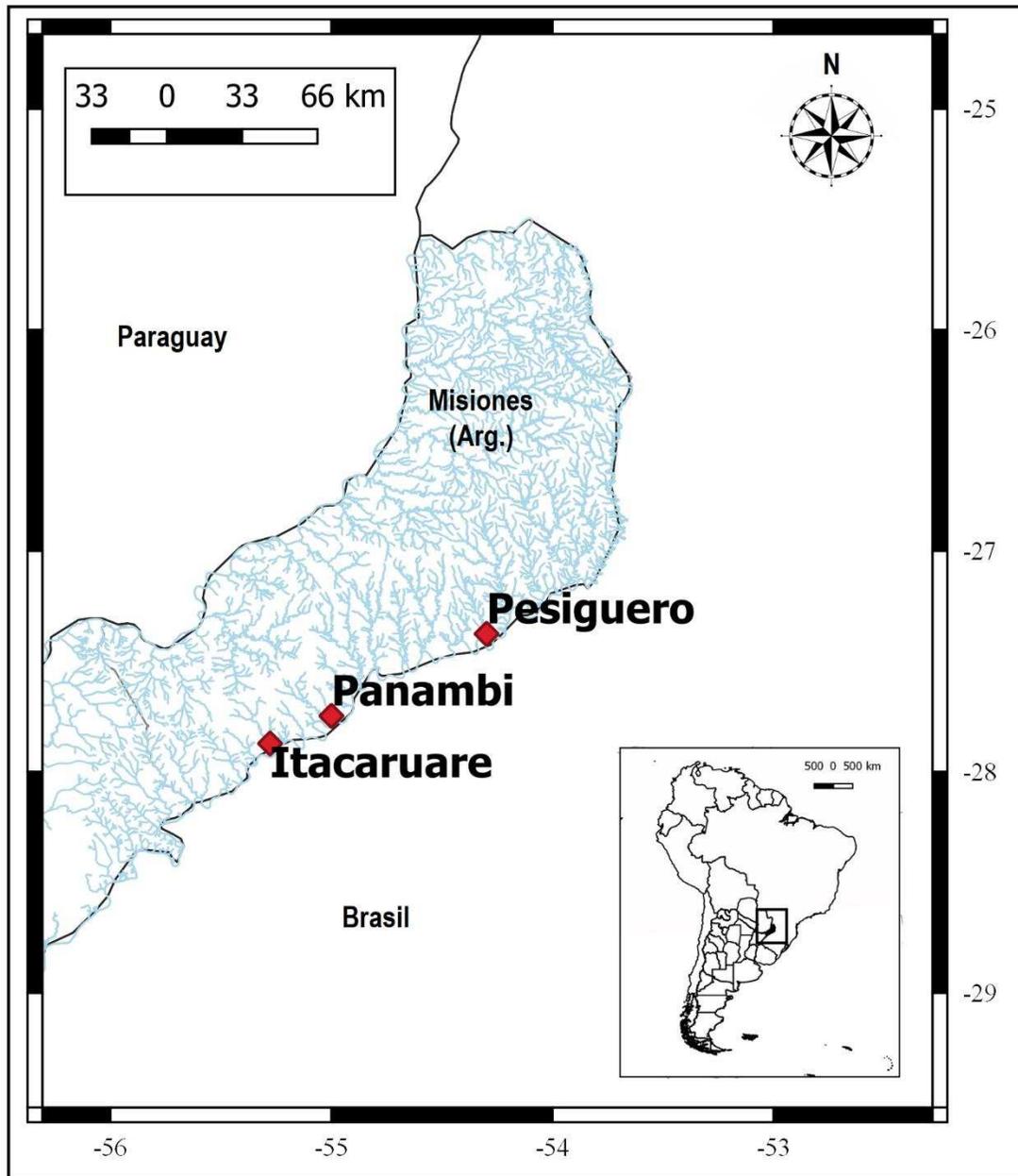


Figura 2.1- Mapa de la localización de los arroyos Pesiguero, Panambi e Itacaruaré de la provincia de Misiones (Argentina), donde se recolectaron las muestras de *Aegla sp.*

En la Figura 2.2 y en la Tabla 2.1 se encuentran detallados los principales caracteres diagnósticos y las diferencias entre ambas especies. Sin embargo, dichos caracteres, que normalmente se utilizan en la determinación de especies, no fueron suficientes para clasificar las muestras de *Aegla sp.* Estos ejemplares poseían características tanto de *A. singularis* como de *A. platensis*.

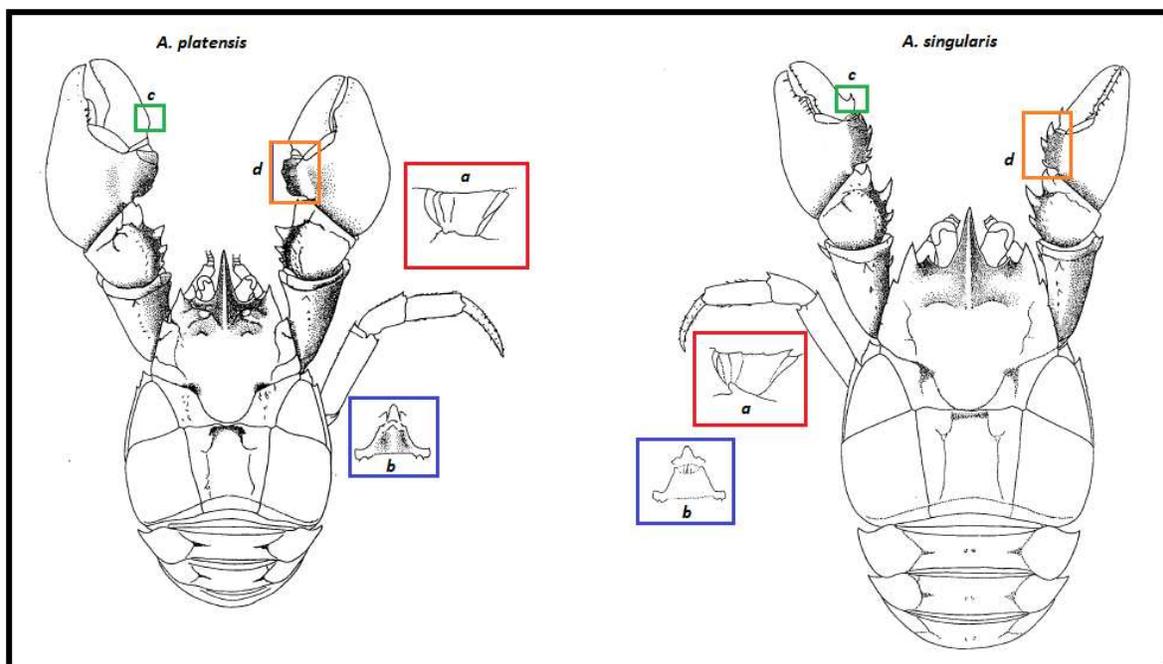


Figura 2.2- Caracteres diagnósticos de las especies *A. platensis* y *A. singularis*. a) base del ísquio del quelípedo, b) cuarto esternito torácico, c) lóbulo del dedo móvil del quelípedo, d) cresta palmar del quelípedo. Estos caracteres se encontraban mezclados en los especímenes de *Aegla sp.* Adaptación de Bond-Buckup y Buckup (1994).

Tabla 2.1- Comparación entre los caracteres diagnósticos de *A. platensis* y *A. singularis* (Bond-Buckup y Buckup, 1994) que se encontraron “combinados” en las muestras de *Aegla sp.*

	Base del ísquio del quelípedo	Cuarto esternito torácico	Lóbulo del dedo móvil del quelípedo	Cresta palmar
<i>A. platensis</i>	Inerme	Elevado medianamente	Con tubérculo poco pronunciado	Rectangular, sin ornamentos
<i>A. singularis</i>	Con una espina distal y dos tubérculos medios	Elevado por una escama	Con una espina robusta	Rectangular, con lóbulo y espinas

3.1 Análisis de la variabilidad y estructura genética

Se extrajo ADN de las muestras de *Aegla sp.* Todos estos especímenes presentaron los caracteres diagnósticos intermedios que se especifican en el apartado anterior. Se amplificaron los marcadores mitocondriales COII, COI y EF α 1, siguiendo el protocolo especificado en el capítulo 1. También se incluyeron en los análisis, muestras de *A. singularis* del río Paraná y Uruguay (utilizadas en el estudio del capítulo 1) y de *A. platensis* del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) cuando fue posible. La información se muestra en la Tabla 2.1. Los datos de los tres marcadores genéticos fueron analizados por separado, debido

a que no estaba completa la información de cada marcador para todos los ejemplares en estudio. Se calcularon valores de diversidad genética en base al número de haplotipos y la diversidad haplotípica con DNAsp [68], y el AMOVA [71] e indicadores de estructura genética con el valor de F_{ST} de a pares entre grupos con Arlequin [69]. Los grupos se definieron a priori de la siguiente forma: *A. singularis* grupo “Paraná”, *A. singularis* grupo “Uruguay”, *A. platensis* y *Aegla sp.* Se decidió dividir en dos grupos (linajes) a la especie *A. singularis* (“Paraná” y “Uruguay”) debido a los resultados obtenidos en el estudio del capítulo 1 de esta tesis, donde se encontró una gran divergencia entre los ejemplares de las dos cuencas.

Tabla 2.2- Análisis de diversidad genética de las muestras ejemplares de *Aegla sp.* (*n*) número de ejemplares usados en función de las secuencias disponibles para cada marcador.

		Marcador molecular		
		COI	COII	EF α 1
Secuencias	<i>n</i> total	43	74	64
	<i>n Aegla sp.</i>	13	14	21
	<i>n A. singularis</i> grupo Uruguay	21	16	17
	<i>n A. singularis</i> grupo Paraná	-	35	26
	<i>n A. platensis</i> (GenBank)	9	9	-
Análisis	Longitud secuencia (pb.)	574	493	205
	n° sitios variables	45	69	64
	n° haplotipos	22	27	24
	Hd (Div. Haplotípica)	0.9413	0.8986	0.8075

El programa MrModelTest [74] determinó que el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustaba a los datos era JC tanto para las secuencias nucleares como mitocondriales. A partir de ello, los árboles filogenéticos se construyeron con el programa Mr. Bayes [73] con los siguientes parámetros: Cadenas de Markov (MCMC) iniciales: 1000000, frecuencia de muestreo: 500, frecuencia de impresión: 500, frecuencia de diagnóstico: 5000 para todos los marcadores. Se añadieron 500000 MCMC posteriores para EF α 1 y 1000000 para COII, para que los árboles convergieran.

3.2 Análisis de las variaciones de forma

Las imágenes para los análisis morfogeométricos fueron capturadas con una cámara de Sony Cyber-Shot DSC-W210 de 12.1 Mp. Se tomaron fotografías de la parte dorsal del caparazón a una distancia de 30 centímetros del espécimen. Se utilizaron 360 ejemplares en total, correspondiendo a *A. singularis* grupo “Uruguay” (*n*= 131), *A. singularis* grupo “Paraná” (*n*= 130), *A. platensis* (*n*= 41) y *Aegla sp.* (*n*= 58).

Se identificaron 25 puntos de referencia (*landmarks*) en el caparazón dorsal para usar como configuración de base (Figura 2.2). Luego se procedió como en el Capítulo 1, en la digitalización de

landmarks, Análisis de Procrustes Generalizado y evaluación de la alometría y dimorfismo sexual. Con el fin de encontrar patrones entre los cuatro grupos de interés: *A. singularis* grupo “Uruguay”, *A. singularis* grupo “Paraná”, *A. platensis* y *Aegla sp.* se realizó un PCA (Análisis de Componentes Principales).

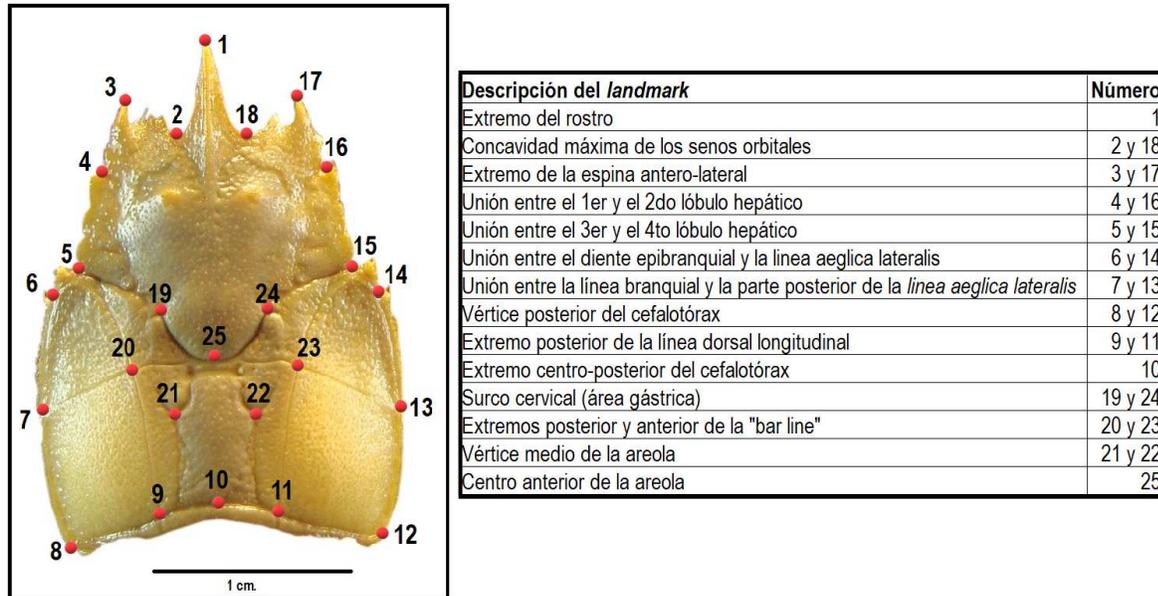


Figura 2.3- Imagen dorsal del cefalotórax de un aéguido donde se observa la ubicación de los *landmarks* y la tabla con la descripción de dicha configuración

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de la variabilidad y estructura genética

Los árboles filogenéticos consenso obtenidos mediante el programa MrBayes [73] se exponen en las figuras 2.3 (gen mitocondrial COII), 2.4 (gen mitocondrial COI) y 2.5 (intrón nuclear EF α 1). Como se puede observar en dichos árboles, las muestras de *Aegla sp.* (arroyos Pesiguero, Itacaruaré y Panambí) se agrupan con las secuencias de *Aegla singularis* de la cuenca del río Uruguay en todos los casos. Por otra parte, es notable indicar que en el árbol de COII, el clado de *A. singularis* “Uruguay”, es grupo hermano del clado de *A. platensis*, y se diferencian de las *A. singularis* “Paraná”, corroborando y resaltando las grandes diferencias encontradas en *A. singularis* de ambas cuencas en el capítulo 2 de esta tesis. Debido a que los tres marcadores utilizados muestran la misma tendencia, y a que los cuatro grupos bajo estudio están mejor representados con el marcador COII, los análisis de estructura genética se realizaron con estos datos.

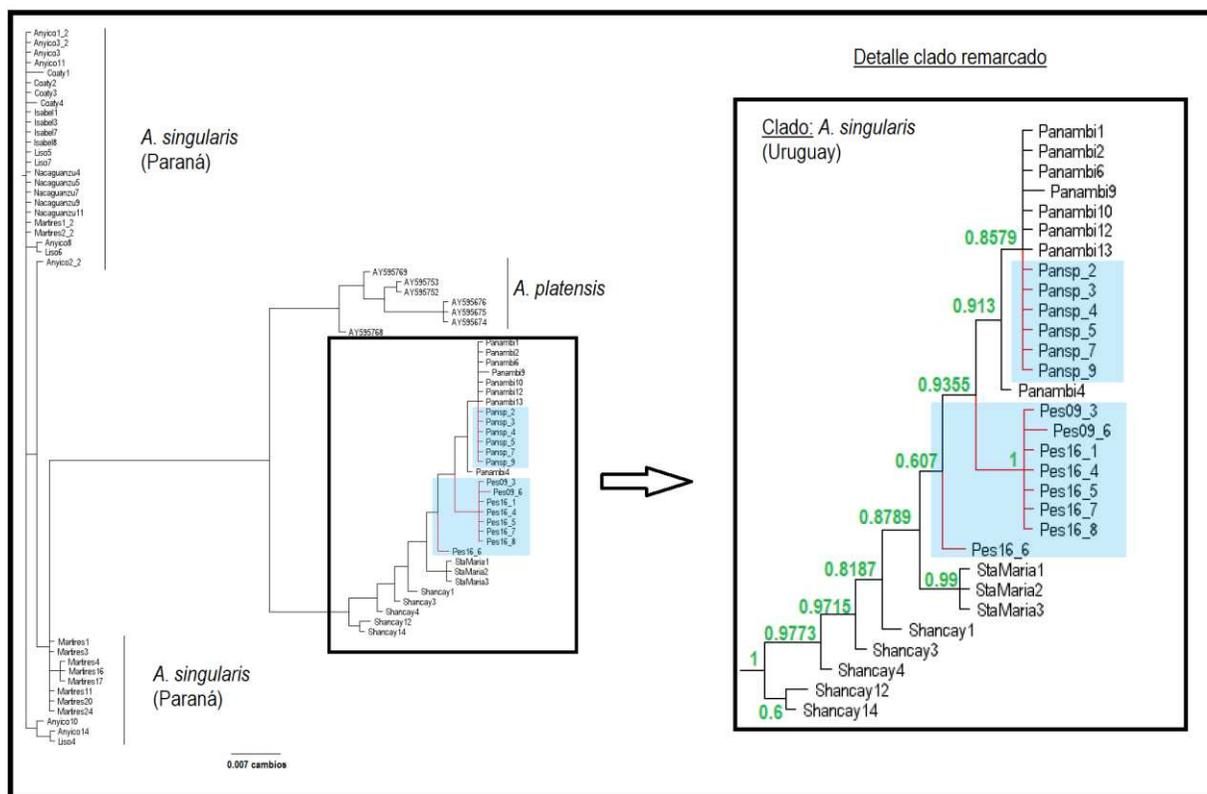


Figura 2.3- Árbol filogenético para el gen mitocondrial COII. Las muestras resaltadas en celeste corresponden a *Aegla sp.*, forman un clado junto con *A. singularis* “Uruguay”.

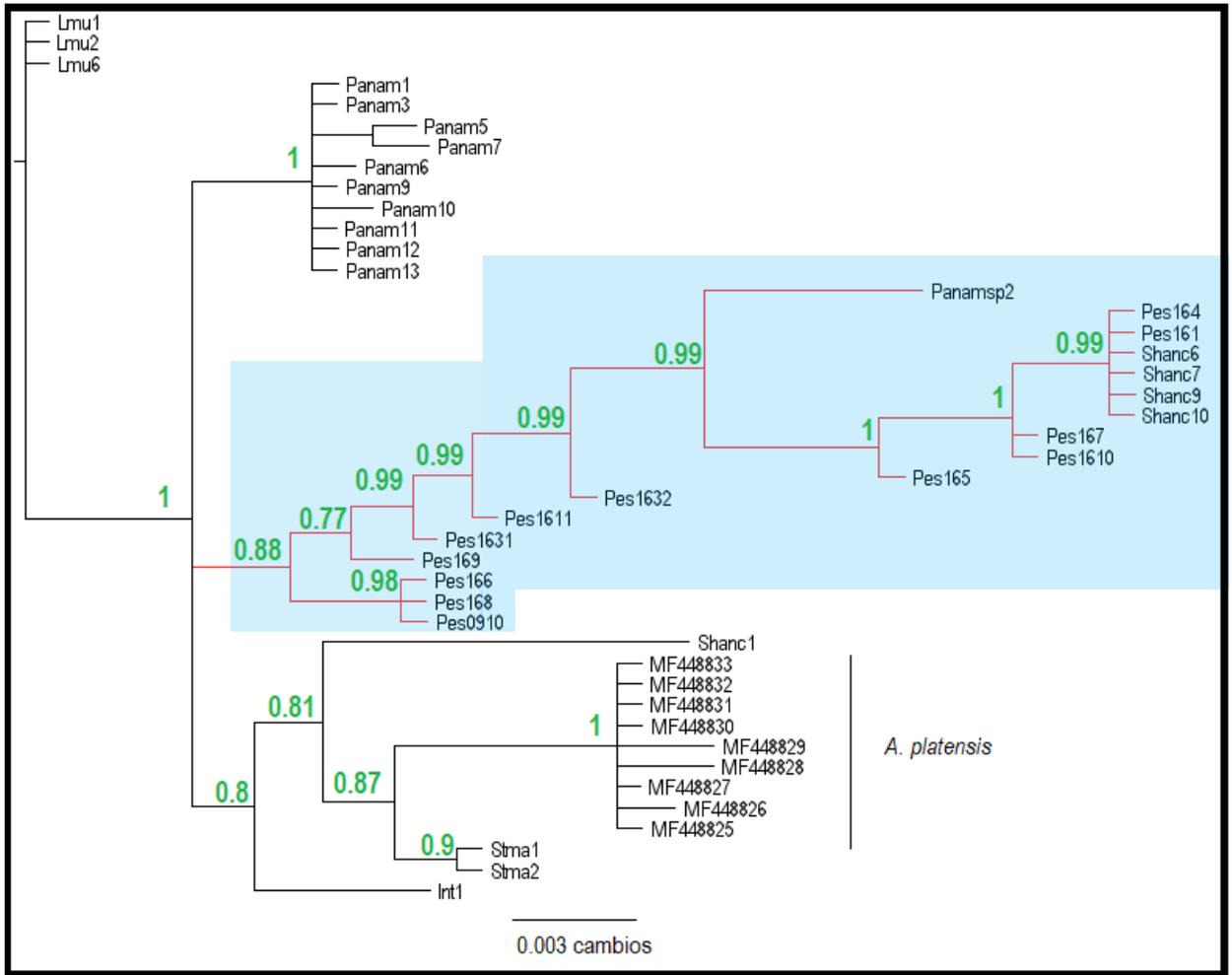


Figura 2.4- Árbol filogenético para el gen mitocondrial COI. Las muestras de *Aegla sp.* forman un clado junto a muestras del arroyo Shancay, perteneciente a *A. singularis* del río Uruguay.

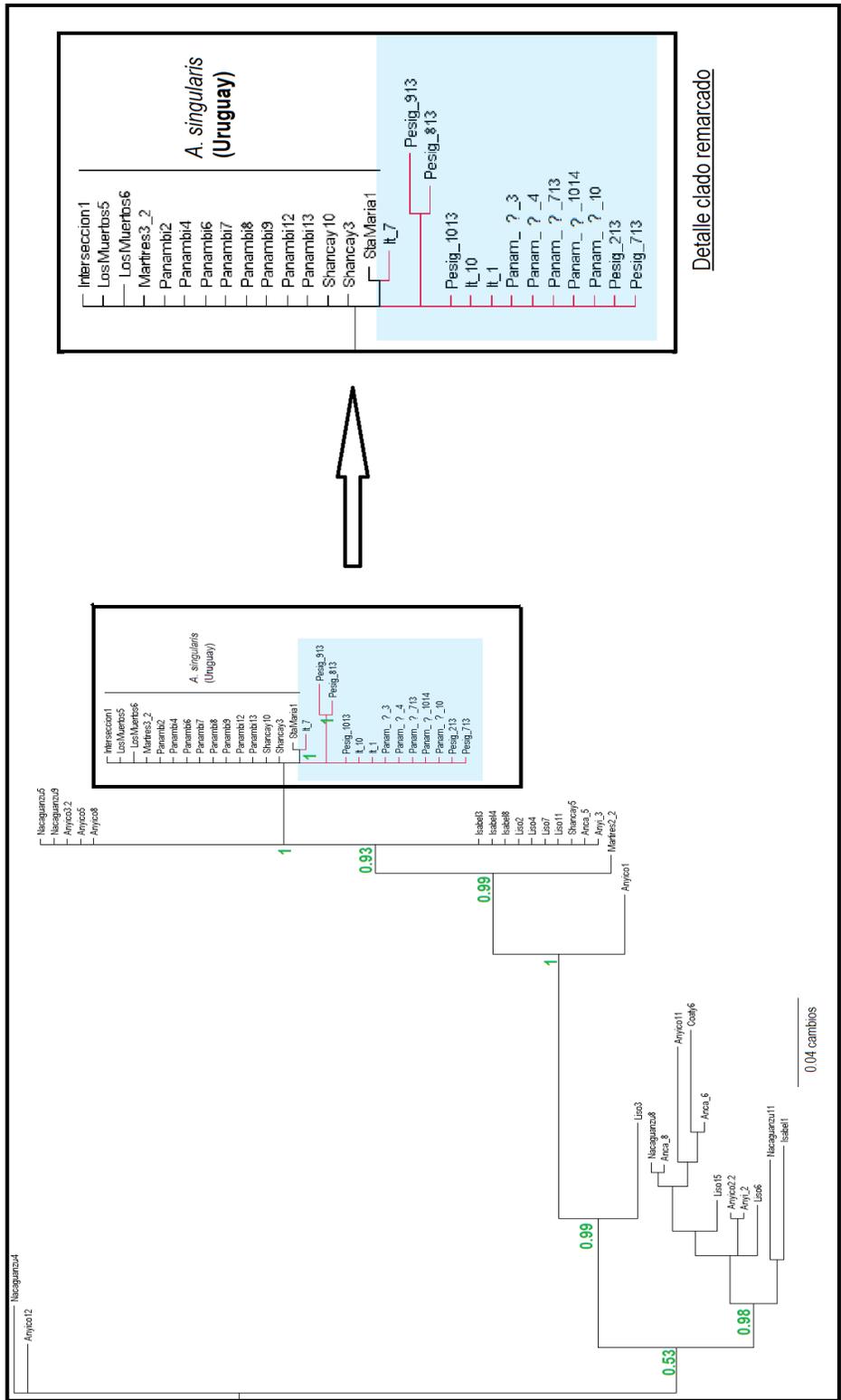


Figura 2.5- Árbol filogenético para el gen nuclear EFα1. En este caso también las muestras de *Aegla* sp. forman un clado con las demás muestras de *A. singularis* del río Uruguay.

Los resultados del análisis de diversidad genética, como el número de haplotipos encontrados por cada marcador y la diversidad haplotípica se visualizan en la Tabla 2.1. Estos resultados muestran, en primer lugar, la gran diversidad genética de los aéglicos, lo cual se puede observar en la alta diversidad haplotípica encontrada para los tres marcadores. Como se expuso en la introducción, esta variabilidad es una de las causas del número creciente de nuevas especies descritas en los últimos años, y demuestra la importancia de trabajar con evidencias moleculares además de morfológicas.

El AMOVA [71] y el F_{ST} [70] de a pares entre grupos se realizó con los resultados del marcador COII, ya que fue la evidencia que poseía información más completa de todos los grupos bajo estudio, como se explicó anteriormente. El AMOVA (Tabla 2.3) revela un gran porcentaje de variación entre las poblaciones (cercana al 25%), en el F_{ST} de a pares (Tabla 2.4) se observa que todas las poblaciones presentan diferencias estadísticas entre sí, pero *Aegla sp.* y *A. singularis* grupo “Uruguay” son las que tienen un menor valor de F_{ST} , por lo que son las más similares, en tanto que *Aegla sp.* y *A. singularis* grupo “Paraná” son las más diferentes.

Tabla 2.3- AMOVA para el gen COII. $p < 0,0001$.

Fuente de variación	grados libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre las poblaciones	3	6,829	0,11645	24,02
Dentro de las poblaciones	69	25,418	0,36837	75,98
Total	72	32,247	0,48482	

Tabla 2.4- F_{ST} de a pares entre los grupos previamente asignados con información del gen COII. Sobre la diagonal se indican los valores p (todos menores a 0,05) y debajo de la diagonal los valores de F_{ST} .

F_{ST} \ p	<i>A. singularis</i> Paraná	<i>A. platensis</i>	<i>A. singularis</i> Uruguay	<i>Aegla sp.</i>
<i>A. singularis</i> Paraná	-	0,00010	0,000	0,000
<i>A. platensis</i>	0,24789	-	0,00228	0,00109
<i>A. singularis</i> Uruguay	0,24104	0,14682	-	0,03089
<i>Aegla sp.</i>	0,31966	0,24714	0,09267	-

4.2 Análisis de la variación de forma entre los grupos

Se registró la presencia de dimorfismo sexual entre machos y hembras mediante Análisis Discriminante (Figura 2.6). La distancia de Procrustes fue de 0,01099524 y la distancia de Mahalanobis fue de 1,4413 ($p < 0,0001$, en ambos casos) entre la forma de machos y hembras.

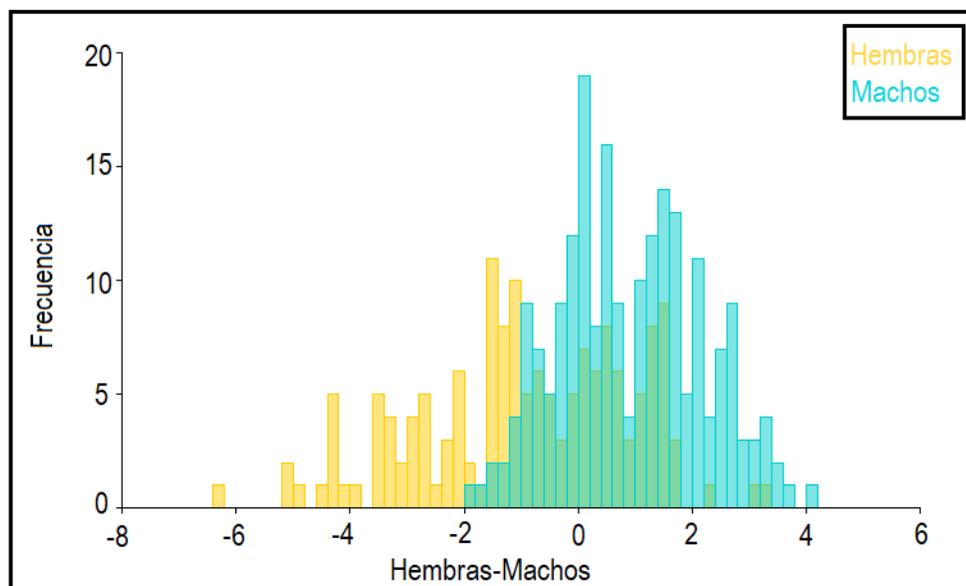


Figura 2.6- Análisis Discriminante entre machos y hembras. Se muestra el gráfico de Validación Cruzada (Referencias de color en la figura).

En el ordenamiento obtenido en los PCA se observan diferencias de forma entre los grupos propuestos. En el gráfico que compara los PC 4 y PC 5 se observa un patrón que acompaña a la hipótesis de que *Aegla sp.* es similar morfológicamente a *A. singularis* “Uruguay”. Estos dos componentes, junto a los tres primeros componentes principales, muestran el porcentaje acumulativo cercano al 70% (PC1: 21,709%; PC2: 41,019%; PC3: 54,515%; PC4: 63,383% y PC5: 70,038%). En la Figura 2.7 se observan los gráficos del PC1 versus el PC2, donde el ordenamiento entre los grupos estudiados presenta superposición. En cambio, el gráfico del CP4 versus CP5 (Figura 2.8), el ordenamiento revela que los grupos de *A. singularis* “Paraná” y *A. platensis* se encuentran desplazados a la izquierda. En ambos gráficos se muestra que los ejemplares de *Aegla sp.* son más similares en forma a los de *A. singularis* “Uruguay”, ya que se observa una superposición de las nubes de puntos.

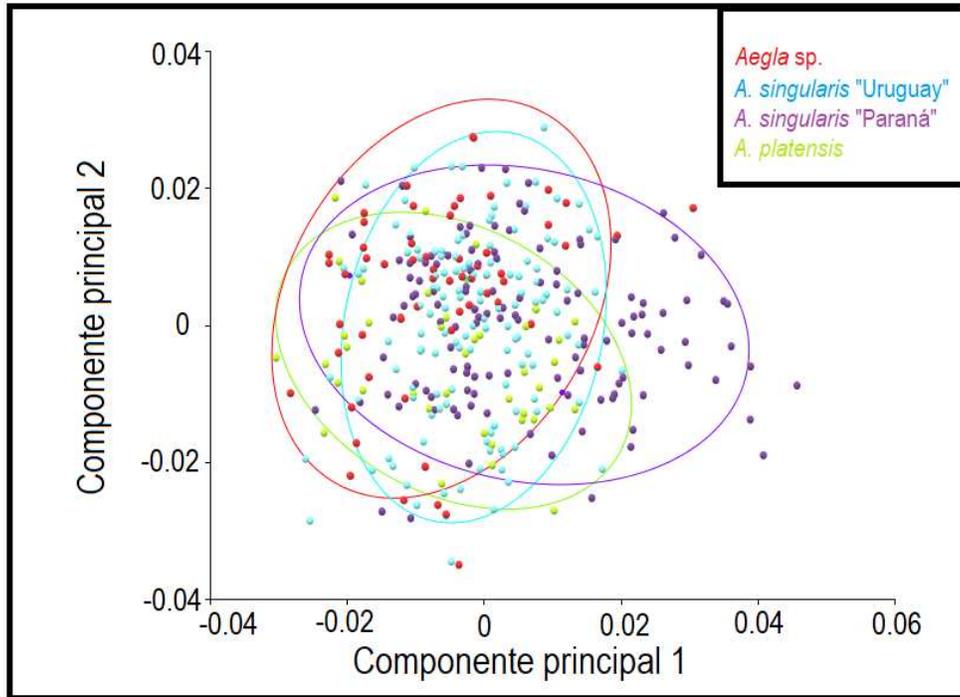


Figura 2.7- Análisis de Componentes Principales. CP1 vs. CP2. Referencia de colores en la figura.

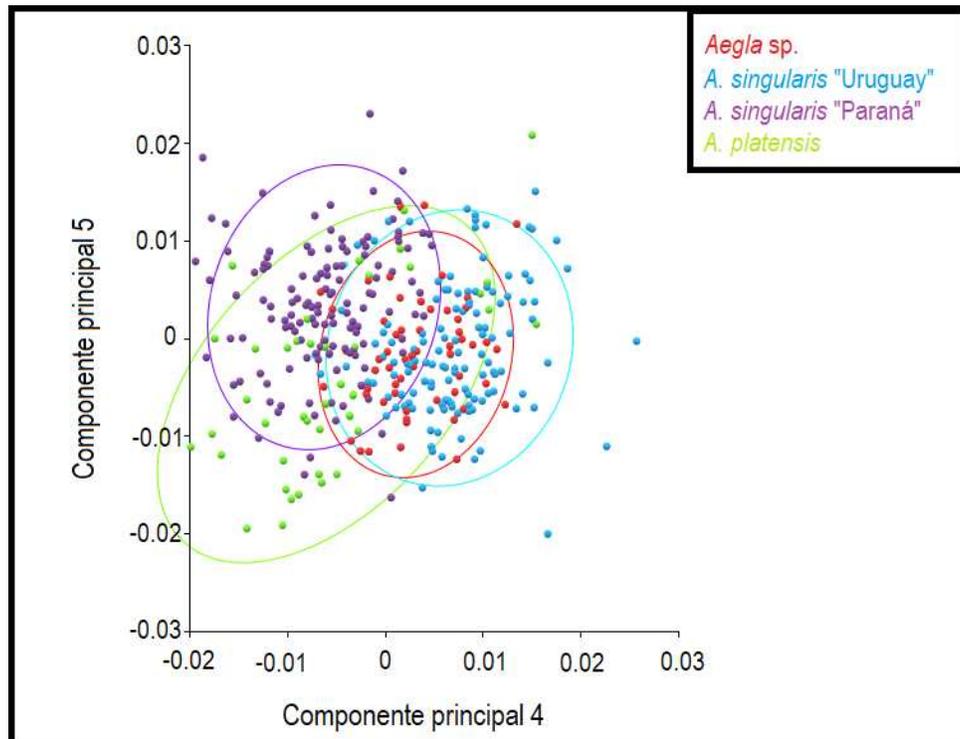


Figura 2.8- Análisis de Componentes Principales. CP4 vs. CP5. Referencia de colores en la figura.

5. DISCUSIÓN

En este capítulo, analizamos mediante marcadores moleculares y morfometría geométrica, muestras de aéglicos, colectadas de arroyos de la cuenca del río Uruguay en Misiones (arroyos Pesiguero, Itacaruaré y Panambí) cuya morfología mostraba tanto caracteres diagnósticos de *Aegla singularis* como de *Aegla platensis*. La evidencia molecular y la evidencia morfogeométrica indicaron que estas muestras incógnitas (*Aegla sp.*) se agrupan con las muestras de *A. singularis* del río Uruguay. Los análisis de las secuencias de ADN mitocondrial y nuclear revelaron una gran variación entre los grupos de interés definidos a priori (*A. singularis* grupo “Uruguay”, *A. singularis* grupo “Paraná”, *A. platensis* y *Aegla sp.*), sin embargo, los grupos de *A. singularis* grupo “Uruguay” y *Aegla sp.*, fueron los más similares entre sí. Estos resultados fueron corroborados por los árboles filogenéticos, donde ambos grupos formaron clados únicos separados del resto. Además, se observa en los mismos que tanto *Aegla sp.* como *A. singularis* “Uruguay”, poseen idénticos haplotipos de los genes analizados, un resultado que apoya aún más la correspondencia entre estos grupos. En cuanto a los análisis geomorfométricos, las variaciones de la forma del cefalotórax también siguieron dicho patrón.

En los árboles filogenéticos mitocondriales se observa que las secuencias de *A. platensis* bajadas de GenBank se resuelven de forma parafilética dentro del clado de *A. singularis* “Uruguay”. Esto resulta llamativo ya que dichas secuencias fueron utilizadas para la filogenia del género *Aegla*, donde forman el clado monofilético de la especie *A. platensis* [7] y corroboradas en un estudio de filogeografía de la misma [27]. Teniendo en cuenta los resultados de estos trabajos, las similitudes encontradas en este capítulo podrían explicarse como un caso de introgresión mitocondrial. Este fenómeno de "introgresión mitocondrial" se observa cuando el genoma mitocondrial de una especie se produce contra un fondo nuclear predominante de otra especie [141] [142] [143], donde la variante de ADNmt de una de las especies (aquí, *A. platensis*) pueden tener una aptitud relativamente mayor que la otra, lo que provoca el desplazamiento. Sin embargo, tal hipótesis no puede ser comprobada con la evidencia disponible. Para comprobar una hipótesis de introgresión, deberían analizarse las mismas muestras de *A. platensis* amplificadas mediante el marcador nuclear EF α 1, e incluso sería conveniente usar más de un marcador nuclear para corroborar los resultados. También podrían utilizarse marcadores microsátélites como herramienta alternativa para aclarar esta cuestión, ya que son más sensibles a la detección de híbridos [51]. En *Aegla*, otros autores, encontraron que había introgresión mitocondrial entre dos poblaciones de *A. neuquensis* aisladas geográficamente [26]. Aunque en el caso de *A. neuquensis* se trataba de poblaciones de la misma especie, los árboles filogenéticos mitocondrial y nuclear se resolvían de manera muy similar al caso de *A. platensis* y *A.*

singularis “Uruguay”. De hecho, en este capítulo, se observa que estos dos grupos son más similares entre sí que los grupos *A. singularis* “Uruguay” y “Paraná”, por lo que la hipótesis de introgresión mitocondrial, junto al aislamiento geográfico y la falta de flujo genético entre poblaciones de ambas cuencas, podría explicar los resultados encontrados en el Capítulo 1, donde se señala que la especie *A. singularis* se encuentra en proceso de especiación.

Dado los resultados obtenidos, otra hipótesis plausible para explicar este fenómeno es que los individuos con caracteres intermedios representan una variación intraespecífica del grupo *A. singularis* grupo “Uruguay”. Estos resultados son consistentes con lo que encontraron Giri y Loy [33] en los cangrejos “intermedios” entre *A. neuquensis* y *A. riolimayana*; los mismos constituían una variación morfológica intraespecífica de la especie *A. neuquensis*. Además, estos autores encontraron que la variación intraespecífica de cangrejos que habitan ríos y arroyos es mayor que las que habitan lagos, probablemente debido a que los sistemas lóticos varían tanto en la disponibilidad o accesibilidad de los recursos, el flujo de corriente y las condiciones físicas y químicas. Esto podría también explicar la gran variación que se encontró en los ejemplares estudiados, mediante los análisis de AMOVA y F_{ST} de a pares, tanto entre como dentro de los grupos que se definieron *a priori*, ya que todos los especímenes utilizados en este análisis fueron colectados en arroyos. Es necesario resaltar, la importancia de separar los individuos de la especie *A. singularis* en los grupos “Paraná” y “Uruguay”, ya que la variación molecular y morfométrica es notable entre ellos, siendo los grupos más diferentes entre sí de todos los analizados en este estudio. Estos resultados, son una evidencia más que apoya las conclusiones del capítulo 2, donde se encontró una especiación en curso entre las poblaciones de ambas cuencas.

El alto grado de endemismo, sumado a la gran variabilidad genética y morfológica del grupo, son dos rasgos que explican en parte la gran diversificación de este género. Tal como se encontró en este estudio, otros trabajos dieron cuenta de la variación interpoblacional, aún en especies de amplia distribución. Por ejemplo, Giri *et al.* [23], encontraron gran estructura genética entre las poblaciones de *A. uruguayana*; resultado que corroboraron Giri y Collins [4], por medio de morfometría geométrica. En este último estudio, además de que los aéglidos mostraron diferencias de forma entre los sitios de muestreo fue evidente un patrón clinal explicado por la capacidad de movimiento muy limitada de la especie, en un entorno moldeado por procesos geoclimáticos relativamente recientes. Al respecto, Hepp *et al.* [33] también encontraron un efecto biogeográfico sobre la variación intraespecífica de la forma del caparazón de *A. plana* de diferentes microcuencas. Ellos observaron el efecto espacial en las características morfológicas del caparazón incluso a pesar de que usaron una pequeña escala geográfica. Tanto los resultados de Giri y Collins [4] en *A. uruguayana* como de Hepp

et al. [33] en *A. plana*, demuestran que los aéglicos pueden tener variaciones intraespecíficas, aunque se comparen poblaciones cercanas geográficamente. Probablemente esto es lo que ocurre con los individuos de *Aegla* sp, de los arroyos Pesiguero, Itacaruararé y Panambí: se han diferenciado externamente por causa de esta gran plasticidad morfológica característica del género [6] al existir escaso flujo genético entre las poblaciones.

Por otro lado, un análisis de poblaciones de *A. platensis* mediante morfometría geométrica, una especie de extenso rango de distribución mostró la posibilidad de que se tratara de varias especies crípticas ya que mostraban diferencias de forma significativas entre las poblaciones [144]. Sin embargo, Zimmermann *et al.* [27], al analizar estas poblaciones con marcadores moleculares, descubrieron que en realidad se trataba de la misma especie, con evidente diferenciación morfológica externa. Estos resultados concuerdan con los encontrados en este capítulo, ya que, si bien existen diferencias en la morfología entre las poblaciones, estudios más profundos demuestran que se trata de la gran variabilidad intraespecífica que muestran los cangrejos de la familia Aegliidae. En cambio, otros autores al investigar poblaciones que se habían catalogado como la misma especie sí encontraron presencia de especies crípticas [18] [40]. Una vez más, los cangrejos de la familia presentan habilidad para mostrar variedad de comportamientos evolutivos dependiendo la especie y el entorno geoclimático de la región en que habitan. En este capítulo, los análisis con métodos moleculares y morfogeométricos no proporcionaron evidencia de que *Aegla* sp. fuese una especie críptica enmascarada en la morfología externa de *A. singularis* o *A. platensis*, ya que claramente pertenece al clado de *A. singularis* grupo “Uruguay”; a diferencia de lo que observaron Moraes *et al.* [18] en *A. paulensis* y Crivellaro *et al.* [24] en *A. longirostri*. En estos trabajos, la polifilia de los taxones era clara en los árboles filogenéticos. Sin embargo, la evidencia molecular muestra una estructura genética entre todos los grupos bajo estudio en este capítulo, que puede deberse a la baja tasa de dispersión, alta tasa de evolución y gran diversidad genética de estos cangrejos [16] por lo que tienden a diferenciarse rápidamente aún en cortas distancias geográficas.

En resumen, según los resultados encontrados en este capítulo, *Aegla* sp. forma un clado con el grupo *A. singularis* “Uruguay”, lo cual sugiere que pertenecerían a la misma especie, a pesar de tener otros caracteres que son característicos de *A. platensis*. En contraste, difieren significativamente del grupo “Paraná” de *A. singularis* y son un grupo hermano de *A. platensis*.

6. CONCLUSIONES

- *Aegla* sp. podría representar una variación intraespecífica del grupo *A. singularis* “Uruguay”, cuyas diferencias son producidas por la gran variabilidad genética y morfológica que presentan los aéglicos, que tienden a diferenciarse aún en cortas distancias geográficas debido a su reducida movilidad y escasa capacidad de dispersión. Sin embargo, deberían utilizarse muestras de *A. platensis* amplificadas mediante marcadores nucleares para testear la hipótesis de introgresión mitocondrial en las poblaciones de *A. singularis* “Uruguay”.



Capítulo 3: Aéglidos cuyanos: pioneros colonizadores

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es un componente fundamental de la biodiversidad y su conservación es crítica para el mantenimiento de los procesos evolutivos [145] [146]. La investigación en el campo de la filogeografía es capaz de identificar unidades de biodiversidad previamente no reconocidas, áreas ricas en poblaciones únicas y unidades de gestión, y puede proporcionar información sobre los procesos que afectan la formación de nuevas especies [147]. Los avances recientes en las técnicas genéticas han aumentado la relativa facilidad con la que se pueden generar los datos y han facilitado el desarrollo de enfoques analíticos complejos mediante los cuales podemos investigar los procesos de población en escalas de tiempo que van desde lo ecológico hasta lo evolutivo [148].

Las tasas de pérdida de biodiversidad son más altas en los ecosistemas de agua dulce que en la mayoría de los ecosistemas terrestres o marinos, haciendo de la conservación del agua dulce una prioridad. Sin embargo, los métodos de priorización se ven obstaculizados por el conocimiento insuficiente sobre el estado de distribución y conservación de taxones de agua dulce, particularmente en el grupo de los invertebrados [149]. Debido al alto nivel de conectividad de los sistemas de agua dulce, la fragmentación puede tener profundos efectos [150] y amenazas como la contaminación, las especies invasoras y las enfermedades, se esparcen fácilmente a través de las cuencas hidrográficas [151] [152]. Estos posibles riesgos prestan urgencia al estudio de la diversidad y del riesgo relativo de extinción de especies en los ecosistemas de agua dulce [153].

La cuenca del río Desaguadero-Salado-Chadileuvú-Curacó constituye la cuenca de mayor superficie desarrollada íntegramente dentro del territorio de la República Argentina. Se encuentra en la región de los Andes Centrales y recorre las provincias de La Rioja, San Juan, Mendoza, San Luis, La Pampa, Neuquén, Buenos Aires y Río Negro. La superficie total es de 360000 km², comprendiendo las subcuencas del río Vinchina-Bermejo, Jachal, San Juan, Mendoza, Tunuyán, Diamante, Atuel, Desaguadero (Tramo I, II, III) y la cuenca del río Colorado (Figura 3.1). Todos estos ríos se originan en los deshielos de la cordillera de los Andes. La topografía de esta región incluye las altas cordilleras compuestas por la Cordillera Frontal y principal, que comenzaron a elevarse hace 20 millones de años y está caracterizada por una intensa actividad sísmica y tectónica, que ha modificado el curso y conectividad de los cuerpos de agua [154]. Por otra parte, la utilización de sus caudales para producción de energía hidroeléctrica, provisión de agua para el consumo humano y del ganado, riego, turismo, náutica, recreación e incluso pesca genera serios problemas de

deseccación y consiguiente desertificación vegetal, animal y humana en los sectores inferiores de la cuenca [155].

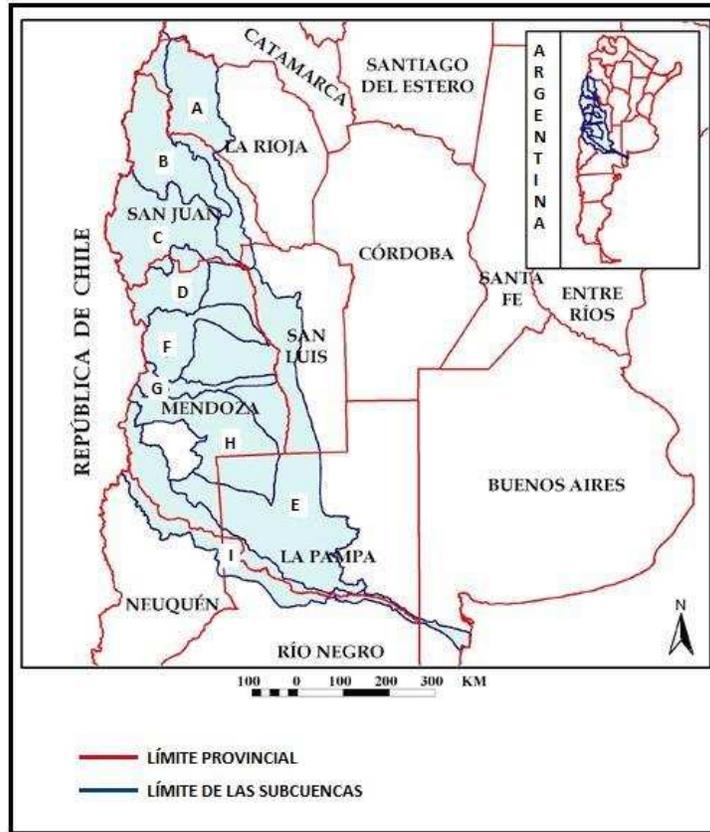


Figura 3.1- Mapa de la cuenca de Desaguadero y de sus subcuencas: A) Vinchina-Bermejo; B) Jachal; C) San Juan; D) Mendoza; E) Desaguadero; F) Tunuyán; G) Diamante; H) Atuel; I) Colorado (modificado de <https://cuencadesaguadero.weebly.com/sobre-la-cuenca.html>)

Debido a que los invertebrados pueden tener rangos de distribución considerablemente más pequeños que los vertebrados, potencialmente pueden proporcionar información a escala fina sobre procesos que tienen los patrones biogeográficos actuales y pasados, y por su baja movilidad a menudo muestran alta fidelidad a su hábitat [127]. Los cangrejos de agua dulce son vulnerables a las modificaciones antropógenas del hábitat [120], incluyendo represas, gestión del agua, y desarrollo urbano. Para muchas especies, esta vulnerabilidad se exagera por sus pequeños rangos de distribución naturales [156]. Los cangrejos de la familia Aeglidae son especialmente sensibles a los cambios de su ambiente ya que, por lo general, tienen distribuciones restringidas o, en el caso de tener amplias distribuciones, sus poblaciones presentan alta estructuración genética [24] [25]. *Aegla scamosa* es una especie que habita las aguas de la cuenca Desaguadero, extendiéndose por las provincias de San Juan, Mendoza y San Luis. Según la filogenia de Pérez-Losada *et al.* [7] *A. scamosa*

sería una de las especies del género más antiguas, ya que junto a *A. ringueleti* tiene las características morfológicas más basales del grupo, y se trata de una de las primeras especies en habitar el actual territorio argentino. Por este motivo, el estudio de su filogeografía puede interpretarse en un contexto de patrones geoclimáticos de la historia evolutiva de las subcuencas que habita. Conocer esta información, por otra parte, es útil para quienes elaboran y gestionan de planes de manejo y conservación de estos humedales.

2. OBJETIVOS

Caracterizar la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *A. scamosa*, y explorar la filogeografía de la especie estudiando especímenes colectados en cinco subcuencas de la cuenca Desaguadero.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colección de muestras

Se utilizaron especímenes de *A. scamosa* pertenecientes a la colección de muestras del Laboratorio de Macrocrustáceos (INALI). Asimismo, se realizó un muestreo a la zona de Cuyo (provincias argentinas de San Juan, Mendoza y San Luis), durante el otoño de 2017, tratando de abarcar el mayor rango de distribución de la especie. Para capturar los ejemplares, se utilizaron copos de captura y también la recolección manual según conveniencia (Figura 3.2).

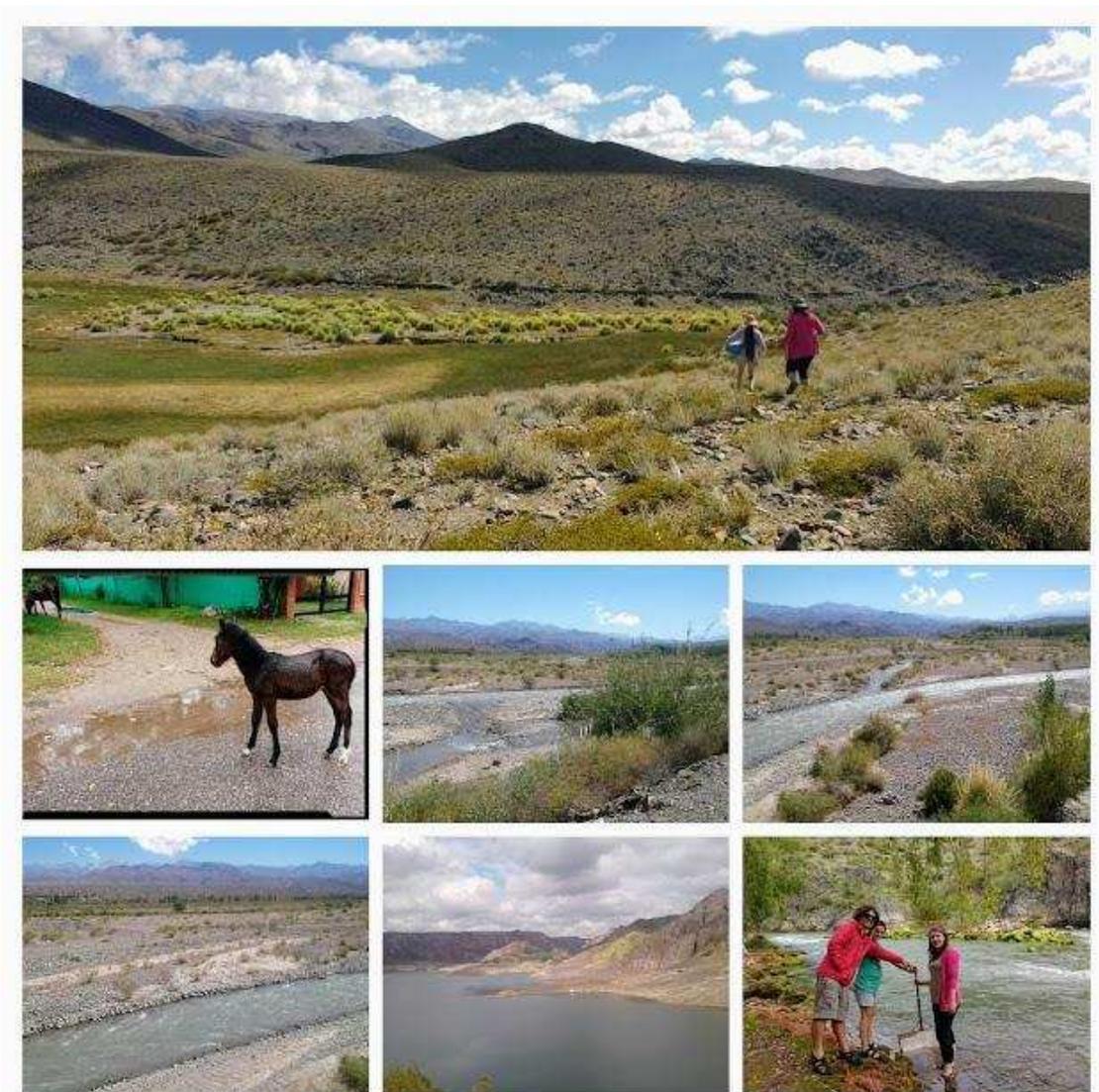


Figura 3.2- Arroyos y ríos donde se recolectaron organismos de *A. scamosa* en la zona de Cuyo (Argentina).

Los cangrejos se procesaron de acuerdo a lo indicado en el Capítulo de Materiales y Métodos. En conjunto con las muestras de la colección y las del muestreo de 2017, se utilizaron para este trabajo 192 especímenes de *A. scamosa* provenientes de 10 ríos y arroyos de la región de Cuyo en Argentina. Los datos de estos sitios se encuentran detallados en la Tabla 3.1 y en el mapa de la Figura 3.3, donde se indica mediante un código y color cada subcuenca que componen la cuenca del río Desaguadero.

Tabla 3.1- Información sobre los sitios de muestreo de ejemplares de *A. scamosa*.

Sitio (mapa)	Ríos y arroyos	Latitud	Longitud	Subcuenca	Código mapa
1	Dique Cuesta del Viento	-30,1833333	-69,0666667	Jachal	JAC
2	Aguas Negras	-30,3019000	-68,7293000	Jachal	
3	Rodeo	-30,2078083	69,1335556	Jachal	
4	Iglesia	-30,5105556	-69,3083333	Jachal	
5	Los Patos	-31,6866667	-69,4883333	San Juan	SJU
6	Uspallata (incluye río Mendoza y arroyo El Salto)	-32,5905430	-69,3512660	Mendoza	MEN
7	Pedernal	-31,9855060	-68,7358890	Mendoza	
8	Potrero de los Funes	-33,2238333	-66,2378611	Desaguadero (Tramo I)	DES
9	Yaucha	-34,1928611	-69,1852500	Tunuyán	TUN
10	Tunuyán	-33,5699444	-69,0056667	Tunuyán	

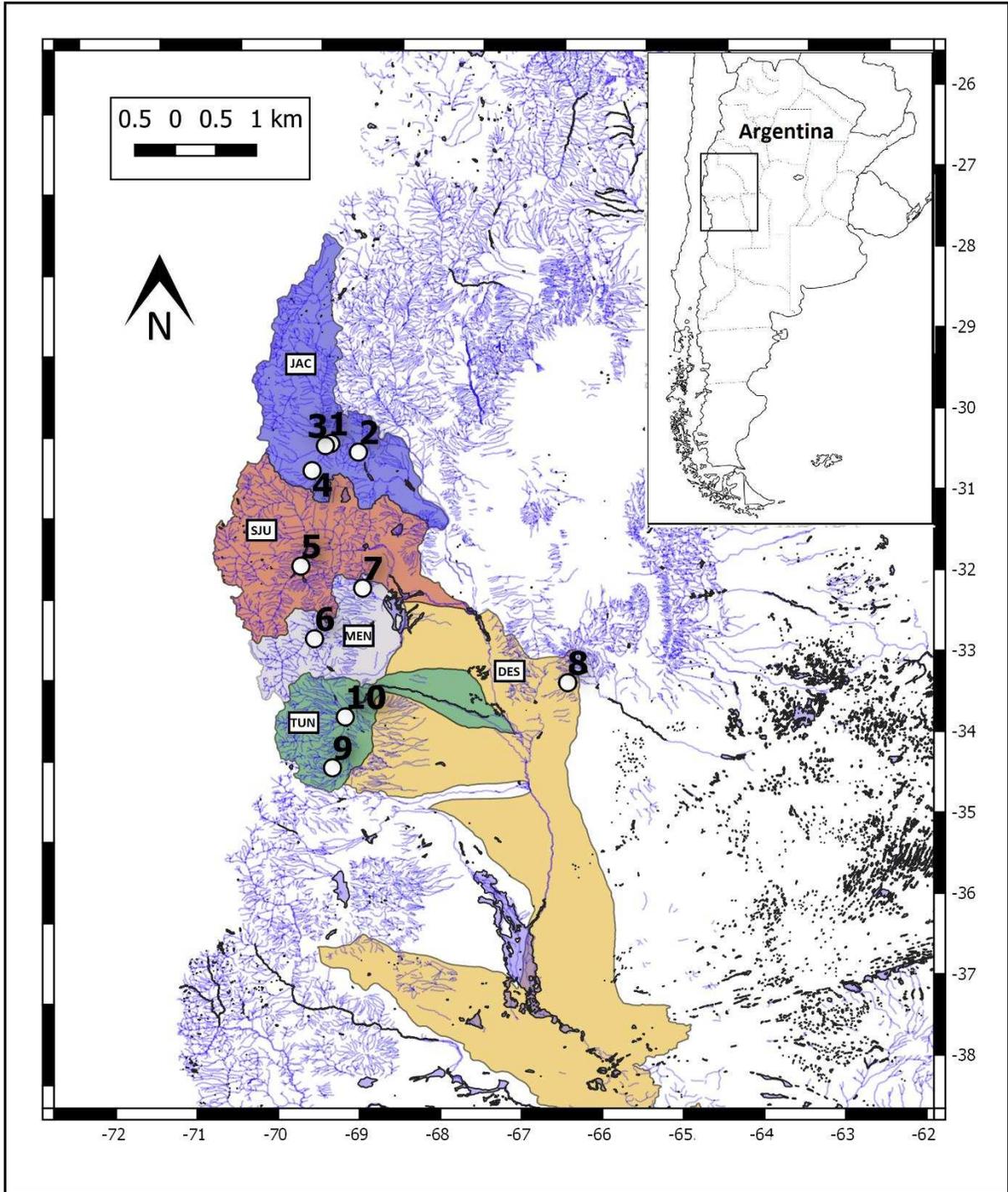


Figura 3.3- Sitios de muestreo de *A. scamosa*. Las referencias de puntos y los colores de las subcuencas se encuentran en la Tabla 3.1. Los números (1 al 10) representan cada punto de muestreo. JAC: Jachal, SJU: Mendoza, TUN: Tunuyán, DES: Desaguadero

3.2 Extracción de ADN, métodos de amplificación y secuenciación/genotipificación.

Se extrajo ADN genómico y se amplificaron los fragmentos del marcador mitocondrial COII (N= 95) y nuclear EF α 1 (N= 127) tal como se describe en el Capítulo de Materiales y Métodos. Los amplicones fueron secuenciados por Macrogen Inc. (www.macrogen.com). Por otra parte, con el fin de analizar la especie mediante distintas evidencias que permitan realizar comparaciones, se eligieron 7 microsatélites desarrollados en la tesis, tomando como requisito que amplifiquen en todas las poblaciones y que sean polimórficos (es decir, que haya más de dos alelos por locus). Los marcadores elegidos fueron: Au24, Aa6, Au11, Au9, Au21, Au12 y Au19 (la descripción de estos microsatélites se encuentra en la Tabla 2 del Capítulo de Materiales y Métodos). Se amplificaron dichos fragmentos en 79 muestras biológicas mediante PCR, con el protocolo descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. Los especímenes se eligieron teniendo en cuenta que sean representativos de las 5 subcuencas. El producto de PCR fue analizado por Macrogen Inc. utilizando un secuenciador mediante el cual se determinó el tamaño del/los fragmento/s amplificados.

3.3 Análisis de la diversidad genética, estructura poblacional y filogeografía

El alineamiento de las secuencias de ADN de los marcadores mitocondrial y del intrón nuclear se llevó a cabo utilizando el algoritmo ClustalW [67] mediante el software MEGA7 [65]. La diversidad genética se evaluó utilizando estimadores de diversidad de haplotipos (h) en DNASP [68]. El análisis de los valores de F_{ST} [70] entre cuencas se realizó en Arlequin v3.5 [74]. El software en línea PhyloGeoViz [157] se implementó para calcular los haplotipos por cuenca y colocarlos en un mapa. Los resultados fueron editados con QGIS [158].

Finalmente, se construyeron árboles filogenéticos. Los haplotipos se colapsaron manualmente por sitio para una mejor visualización de los clados. El mejor modelo de sustitución de nucleótidos se estimó utilizando MrModelTest 2.2 [74]. Se eligió el modelo HKY + I para Ef α 1 y JC + I + G para COII y se realizó la inferencia filogenética posterior en MrBayes [73]. Para ello, se realizaron dos análisis con cuatro cadenas, 500000 generaciones iniciales de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) y 10000000 generaciones posteriores. Los árboles obtenidos se visualizaron y editaron con el programa FigTree [75].

Para los microsatélites, el resultado de la secuenciación fue analizada con el programa Peak Scanner v2.0 (Applied Biosystems) para definir cada alelo según el tamaño del fragmento. Dado que los softwares de genética de poblaciones analizan datos con números enteros, se utilizó el software Tandem [159] para obtener genotipos con números enteros. Se chequearon los genotipos obtenidos mediante Micro-Checker¹⁶⁰ [160], para determinar posible presencia de alelos nulos y exceso de homocigosis. Se utilizaron los programas GenAlEx [78] y Arlequin v3.5 [69] para la inferencia de

los parámetros de diversidad genética y estructura poblacional. Se utilizaron los estadísticos F_{ST} (variante R_{ST} de Slatkin, conveniente para análisis de microsatélites) y AMOVA [71] jerárquico entre subcuencas y arroyos.

Para calcular el número de *clusters* en los que se agrupaban las muestras se utilizó el programa bayesiano Structure v2.3.4 [80]. Se realizaron 15 repeticiones por *cluster* ($k=2$ a 6), 1000000 de cadenas de Markov, eliminando las primeras 200000 (*burn in*); el programa estimó el grado de mezcla (valor alfa). El valor de k más probable se analizó con Structure Harvester [161] y luego se graficó con el programa en línea Clumpak [162].

4. RESULTADOS

4.1 Análisis de la variabilidad genética y estructura poblacional

Un fragmento de 435 pb del gen mitocondrial COII fue secuenciado para 95 individuos. Se identificaron un total de 49 sitios polimórficos y se definieron 30 haplotipos basados en estos sitios polimórficos. El análisis de la diversidad genética para todas las muestras mostró una gran diversidad haplotípica ($h: 0,923$) y una diversidad nucleotídica $\pi= 0,03477$. Por otro lado, se secuenciaron 217 pb del intrón EF α 1 para 127 individuos. Se identificaron un total de 11 sitios polimórficos y se definieron 11 haplotipos basados en estos sitios polimórficos. Los análisis de la diversidad genética para todas las muestras mostraron una gran diversidad de haplotipos ($h: 0,845$) y una diversidad nucleotídica $\pi= 0,01041$.

En cuanto al análisis de estructura genética entre las subcuencas, los valores de F_{ST} entre las cuencas se encuentran en la Tabla 3.2. Los resultados muestran que existe cierta estructura entre las cuencas en estudio, pero ésta difiere en los patrones dependiendo del marcador analizado. Según estos resultados, entre las subcuencas Desaguadero y Tunuyán existe flujo genético, ya que no presentan estructura en el caso del marcador mitocondrial y, para el intrón, la misma es casi nula. La población de la subcuenca Mendoza muestra estructura genética con todas las demás, con ambos marcadores, aunque los valores de F_{ST} son mayores para EF α 1. En cambio, entre las subcuencas Jachal y San Juan, se observa un patrón muy distinto dependiendo del marcador con los que se las analice. Presentan estructuración profunda con el marcador nuclear y una casi nula con el marcador mitocondrial, siendo esta última no significativa estadísticamente. Estas diferencias tienen que ver, entre otras cuestiones, con la historia evolutiva que muestra cada marcador.

Tabla 3.2- Valores de F_{ST} por pares entre las subcuencas. Sobre la diagonal se encuentran los valores del marcador nuclear, y por debajo los valores del marcador mitocondrial. Todas las celdas sombreadas indican que los F_{ST} fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Con asterisco (*) se muestran las únicas comparaciones **no** significativas.

COII	E $F_{\alpha 1}$					
	Cuencas	Jachal	San Juan	Mendoza	Desaguadero	Tunuyán
	Jachal		0,74723	0,43308	0,47867	0,52131
	San Juan	0,01905*		0,63155	0,72095	0,64859
	Mendoza	0,20181	0,14166		0,29058	0,39248
	Desaguadero	0,39558	0,33438	0,45999		0,00583*
	Tunuyán	0,31515	0,25215	0,36742	0,51051	

El análisis de calidad de los marcadores microsatélites mediante Micro-Checker [160] mostró exceso de homocigosis debido a la presencia de alelos nulos sólo para los ejemplares de la subcuenca San Juan (en marcadores Au11 y Au12) y Jachal (en marcadores Aa6 y Au11). El programa no encontró evidencia de que la homocigosis fuese producto de errores en la amplificación de alguno de los alelos (*allele drop-out*). En la Tabla 3.3 se muestran los valores observados y esperados de heterocigosis, así como el número de alelos por locus. Los valores de p indican que la mayoría de los loci no están en equilibrio de Hardy-Weinberg (excepto Au11, Au9 y Au12), por lo que suponemos que hay fuerzas que están influyendo sobre las poblaciones. Teniendo en cuenta la presencia de alelos nulos de las poblaciones Jachal y San Juan, este desequilibrio y el exceso de homocigosis, probablemente sea producto de la endogamia debido de la escasez de flujo genético entre las subcuencas.

Tabla 3.3- Equilibrio de Hardy-Weinberg por locus de microsatélite. Para **79** muestras amplificadas con cada marcador, Na: número de alelos por locus, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada. Los valores $p < 0.05$ (resaltado en negrita) muestran los microsatélites que no están en equilibrio HW.

Locus	Na	Ho	He	Valor p
Au24	15	0,86667	0,66897	0,00859
Aa6	16	0,75	0,62702	0,0042
Au11	12	0,08333	0,08333	1
Au9	13	0,61538	0,69538	0,08451
Au21	16	0,75	0,82258	0,00779
Au12	14	0,57143	0,59788	0,48699
Au19	16	0,6875	0,52621	0,00813

Los R_{ST} por subcuenca (Tabla 3.4) muestran que existen diferencias estadísticamente significativas para todas las comparaciones, por lo que podríamos afirmar que existe una estructura genética entre los sitios de estudio.

Tabla 3.4- Valores de R_{ST} en las comparaciones entre subcuencas. Sobre la diagonal se indican los valores p (todos menores a 0,05) y debajo de la diagonal los valores de R_{ST} .

p	Jachal	San Juan	Mendoza	Desaguadero	Tunuyán
R_{ST}					
Jachal	-	0,000	0,000	0,000	0,000
San Juan	0,22521	-	0,000	0,000	0,000
Mendoza	0,17192	0,16481	-	0,0001	0,000
Desaguadero	0,29879	0,15131	0,14541	-	0,0001
Tunuyán	0,27218	0,19945	0,16471	0,12128	-

El AMOVA jerárquico teniendo en cuenta el agrupamiento por sitio (arroyo) y por subcuenca, muestra que el mayor porcentaje de en la distribución de la variabilidad, está dentro de los sitios de muestreo (o sea, entre los individuos de cada arroyo. Tabla 3.5). Sin embargo, aproximadamente un 21% de la variación es explicado por las diferencias entre arroyos y entre subcuencas.

Tabla 3.5- AMOVA jerárquico entre niveles: 1) subcuencas, 2) entre arroyos dentro de las subcuencas y 3) dentro de los arroyos

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre subcuencas	55,863	0,15246	6,34510
Entre poblaciones (arroyos) dentro de las subcuencas	23,481	0,37035	15,41321
Dentro de las poblaciones (arroyos)	265,825	1,87999	78,24168
	345,169	2,40280	

Finalmente, el programa en línea Structure Harvester [161] determinó, mediante el análisis de los resultados calculados con Structure [80], que el número de agrupamientos genéticos más probable para la especie es 3 ($k= 3$), en las 5 subcuencas estudiadas. En la Figura 3.4 se observa que, las subcuencas de Jachal, San Juan y Tunuyán son genéticamente homogéneas (a pesar de que cada una está compuesta por un grupo genético particular); mientras que la subcuenca de Mendoza es la que muestra la mayor mezcla de clúster, seguida por la de Desaguadero.

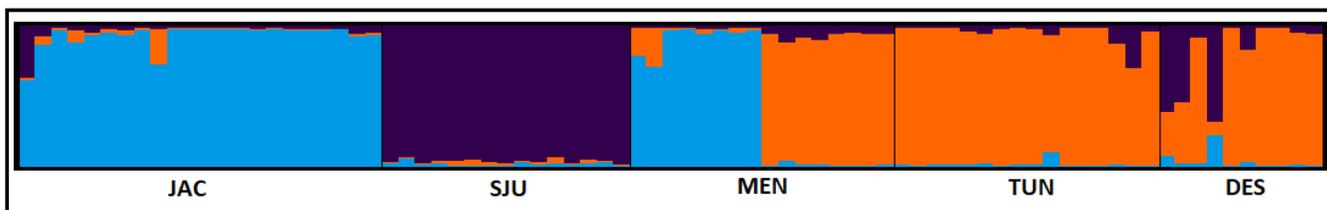


Figura 3.4- Gráfico de los agrupamientos $k= 3$ del análisis de estructura de microsatélites. Cada color (celeste, violeta, naranja) representa un clúster genético. JAC: Jachal, SJU: MEN: Mendoza, TUN: Tunuyán, DES: Desaguadero.

4.2 Árboles filogenéticos y distribución geográfica de haplotipos

La alta estructuración genética entre la mayoría de las subcuencas que mostró el análisis de F_{ST} con las evidencias de COII y EFa1, y también en el caso de los microsatélites, se observa con una señal más débil en los árboles filogenéticos para estos genes (Figura 3.5 y 3.6, respectivamente). Se puede observar, en el caso del gen nuclear, un agrupamiento de clados consistente a la localización geográfica de los sitios de muestreo. Por ejemplo, las muestras de las subcuencas Tunuyán y Desaguadero, que se encuentran más al sur geográficamente, se agrupan en un clado. Este clado está separado del subgrupo formado por las subcuencas San Juan, Mendoza y Jachal que se encuentran más al norte. Estos patrones geográficos no pueden visualizarse en el árbol filogenético mitocondrial, en donde las muestras de las diferentes subcuencas están mezcladas entre sí en los diferentes clados.

Sin embargo, cuando se contrasta la frecuencia de haplotipos por subcuenca y se comparan las evidencias en un mapa (Figura 3.7), las relaciones encontradas con las estadísticas se muestran mejor. En el análisis comparativo de la distribución geográfica de los haplotipos, el marcador nuclear parece mostrar una discrepancia con el mitocondrial, ya que se observa claramente que los haplotipos mitocondriales se hallan, en general, en varias subcuencas. En cambio, los haplotipos nucleares son más específicos de cada una, incluso un gran porcentaje es endémico de una sola subcuenca. Esta discrepancia es evidente especialmente en lo que refiere a la subcuenca del río San Juan, donde los resultados con el marcador mitocondrial muestran gran cantidad de haplotipos en comparación con el marcador nuclear, que solo tiene un único haplotipo nuclear. Este resultado, está corroborado además con el resultado obtenido con los microsatélites, donde la cuenca de San Juan tiene individuos pertenecientes sólo al clúster de color violeta, lo cual posiblemente está vinculado al hecho de que ambos marcadores se encuentran en el núcleo.

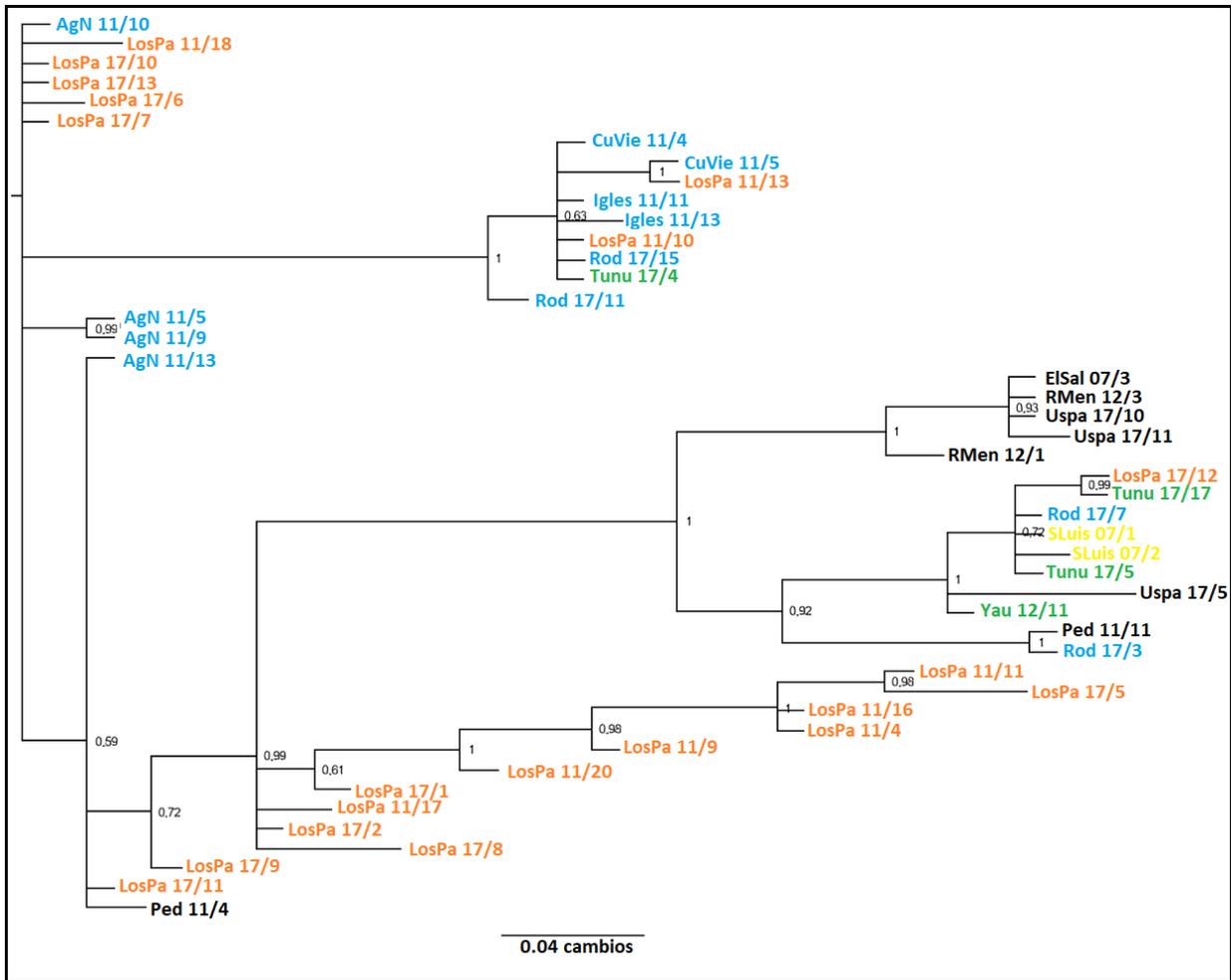


Figura 3.5- Árbol filogenético realizado con las secuencias de COII con haplotipos colapsados. Código de colores de las subcuencas: Celeste: Jachal; Naranja: San Juan; Negro: Mendoza; Amarillo: Desaguadero; Verde: Tunuyán

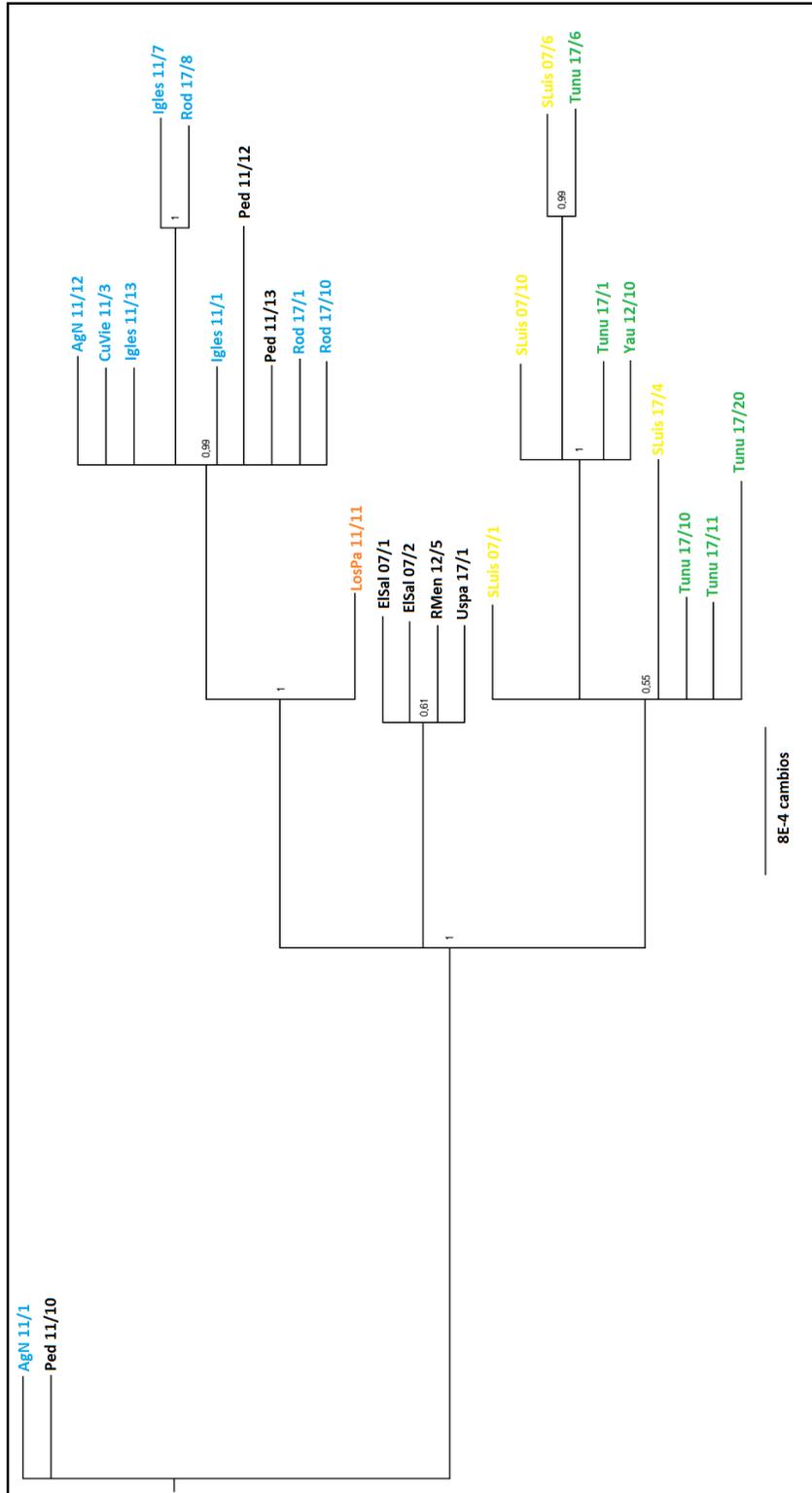


Figura 3.6- Árbol filogenético realizado con las secuencias de EF α 1 con haplotipos colapsados. Código de colores de las subcuencas: Celeste: Jachal; Naranja: San Juan; Negro: Mendoza; Amarillo: Desaguadero; Verde: Tunuyán

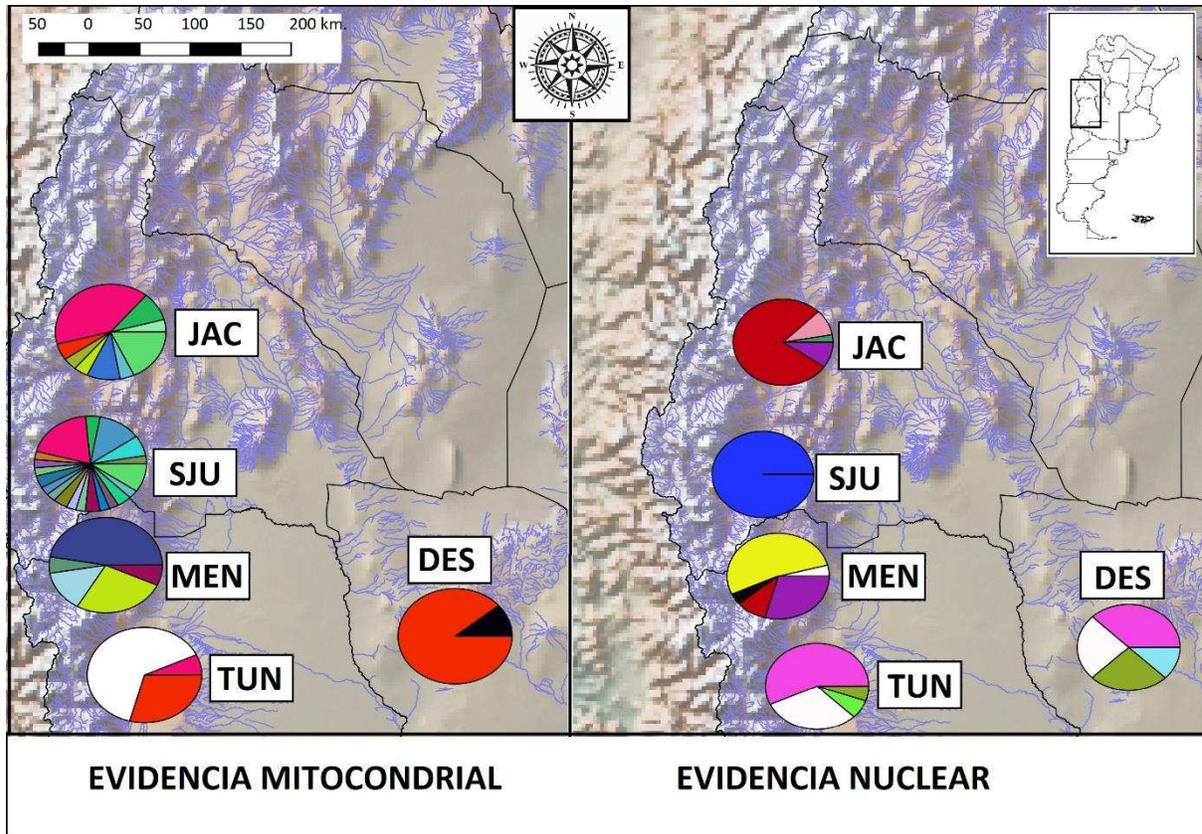


Figura 3.7. Mapa de la distribución de los haplotipos, comparando la evidencia nuclear y mitocondrial de las subcuencas bajo estudio. JAC: Jachal; SJU: San Juan; MEN: Mendoza; TUN: Tunuyán; DES: Desaguadero (Tramo I).

En síntesis, la estructura genética mostrada mediante los valores de F_{ST} de a pares es, en general, más profunda cuando se analiza el gen nuclear que el gen mitocondrial (esta tendencia se observa en sobre todo en la subcuenca San Juan). Además, el gen mitocondrial es más variable que el gen nuclear (la diversidad haplotípica y nucleotídica son mayores). Por otra parte, los microsatélites muestran una estructura significativa entre todas las subcuencas, más débil que en el caso del intrón, pero mayor que en el de mitocondrial, dado que los F_{ST} son menores a 0,3 en todos los casos. Esto indica que, si bien los tres marcadores utilizados comparten ciertos patrones, también brindan información diferente. Es probable que la información que nos brinda cada marcador esté mostrando evidencias de diferentes procesos históricos que atravesó la especie.

5. DISCUSIÓN

En este estudio, se compararon cangrejos dulceacuícolas de la especie *Aegla scamosa* de cinco subcuencas que comprenden toda el área de distribución de la especie, con el objetivo de esclarecer los patrones filogeográficos de la especie y considerar las posibles explicaciones geoclimáticas e históricas de dichos patrones. Para ello, se estudió la estructura genética entre las subcuencas donde la especie se encuentra mediante el análisis de secuencias de ADN de un gen mitocondrial (COII) y de un intrón nuclear (EF α 1) y de genotipos de microsatélites. De forma general, todas las evidencias muestran baja estructura entre las subcuencas del río Tunuyán y del río Desaguadero. Sin embargo, los resultados de las comparaciones entre las otras subcuencas indican diferencias dependiendo de la evidencia genética con la que se las analice. Por otra parte, la variabilidad del marcador mitocondrial fue mucho mayor a la del nuclear y muestra menor estructura que el intrón. Los microsatélites, si bien siguen la tendencia del intrón nuclear, revelan una baja estructura entre las subcuencas, detectando tres grupos genéticos dentro de las cinco cuencas.

Dejando por un momento las diferencias particulares, las evidencias, en general, sugieren que las subcuencas Jachal y San Juan forman un subgrupo separado del subgrupo formado por Mendoza, Tunuyán y Desaguadero. En concordancia con estos resultados, López *et al.* [163] hicieron una revisión bibliográfica de la biogeografía de peces dulceacuícolas de Argentina mediante un Análisis de Parsimonia de Endemismos (PAE, por sus siglas en inglés). Los autores sugieren que los ríos Mendoza, San Juan, Jachal, Desaguadero y Tunuyán forman una provincia biogeográfica a la que denominan Andeo-Cuyana. Sin embargo, el PAE mostró que, debido a la riqueza de especies que comparten, existen dos grupos dentro de la provincia: uno formado por los ríos Mendoza, Desaguadero y Tunuyán y, otro formado por ríos San Juan y Jachal. En el árbol filogenético del trabajo de López *et al.* [163], se observan dos clados bien diferenciados dentro de dicha provincia: por un lado, Jachal y San Juan (junto a Vinchina-Bermejo, Diamante y Atuel) a los que llama “hábitats más pobres” y, por otro lado, Tunuyán, Desaguadero y Mendoza (junto a Colorado y tributarios de la Laguna Llancanelo) a los que llama “hábitats más ricos”. Los resultados de la biogeografía de peces [163] y los obtenidos en este trabajo con *A. scamosa* muestran que existiría mayor conectividad entre algunas de las subcuencas que entre otras. Esta conectividad es la que restringe o permite la dispersión de individuos y, por ende, el flujo genético que está estrecha e inversamente relacionado a la estructura genética de las poblaciones [164] [165].

A pesar del patrón general discutido en el párrafo anterior, es evidente que hay una discordancia entre la información que brindan ambos genomas. En primer lugar, los valores de F_{ST} reflejan una mayor estructura genética entre las subcuencas cuando se la analiza con el gen nuclear que con el

mitocondrial. En siguiente lugar, el mapa de distribución de los haplotipos y los árboles filogenéticos muestran que la diferenciación de las subcuencas entre sí es mayor con la evidencia nuclear. Además, el marcador mitocondrial es más variable en términos de diversidad haplotípica y nucleotídica, lo cual se debe a que tiene una tasa de mutación hasta diez veces mayor a los genes nucleares [165]. Por este motivo y porque el tiempo de coalescencia del ADN nuclear es cuatro veces más largo, el análisis de intrones nucleares detecta principalmente eventos vicariantes ocurridos en el pasado distante y el ADN mitocondrial refleja con precisión la divergencia reciente, o pasado intermedio [114] [166] [167]. Esto explicaría el hecho de que los marcadores utilizados en este estudio muestren dos tendencias distintas. En algunos casos, no es posible que los datos nucleares "confirman" los datos mitocondriales ya que el ADNmt es un indicador relativamente "adelantado" y el ADNnu un indicador "rezagado" [114]. La discordancia entre ADNmt y ADNnu puede definirse más ampliamente como una diferencia significativa en los patrones de diferenciación entre estos dos tipos de marcadores. Más comúnmente, estos conflictos pueden estar en la cantidad general de diferenciación o en cómo estos marcadores reconstruyen las relaciones entre los grupos [114] (Figura 3.8). Se espera este tipo de discordancia porque el genoma mitocondrial es haploide y se hereda uniparentalmente en la mayoría de los animales, y por lo tanto tiene un tamaño de población efectivo cuatro veces menor [114]. Como se observa en la Figura 3.8, el marcador mitocondrial COII sería un marcador "adelantado" y el intrón nuclear EF α 1 un marcador "rezagado", mientras que el árbol real de la especie permanece en incógnita. Debido a ello, se podría afirmar que lo que muestran los resultados de este trabajo no sería una real discordancia mito-nuclear, sino que cada genoma está mostrando la historia evolutiva de la especie en distintos momentos de su evolución.

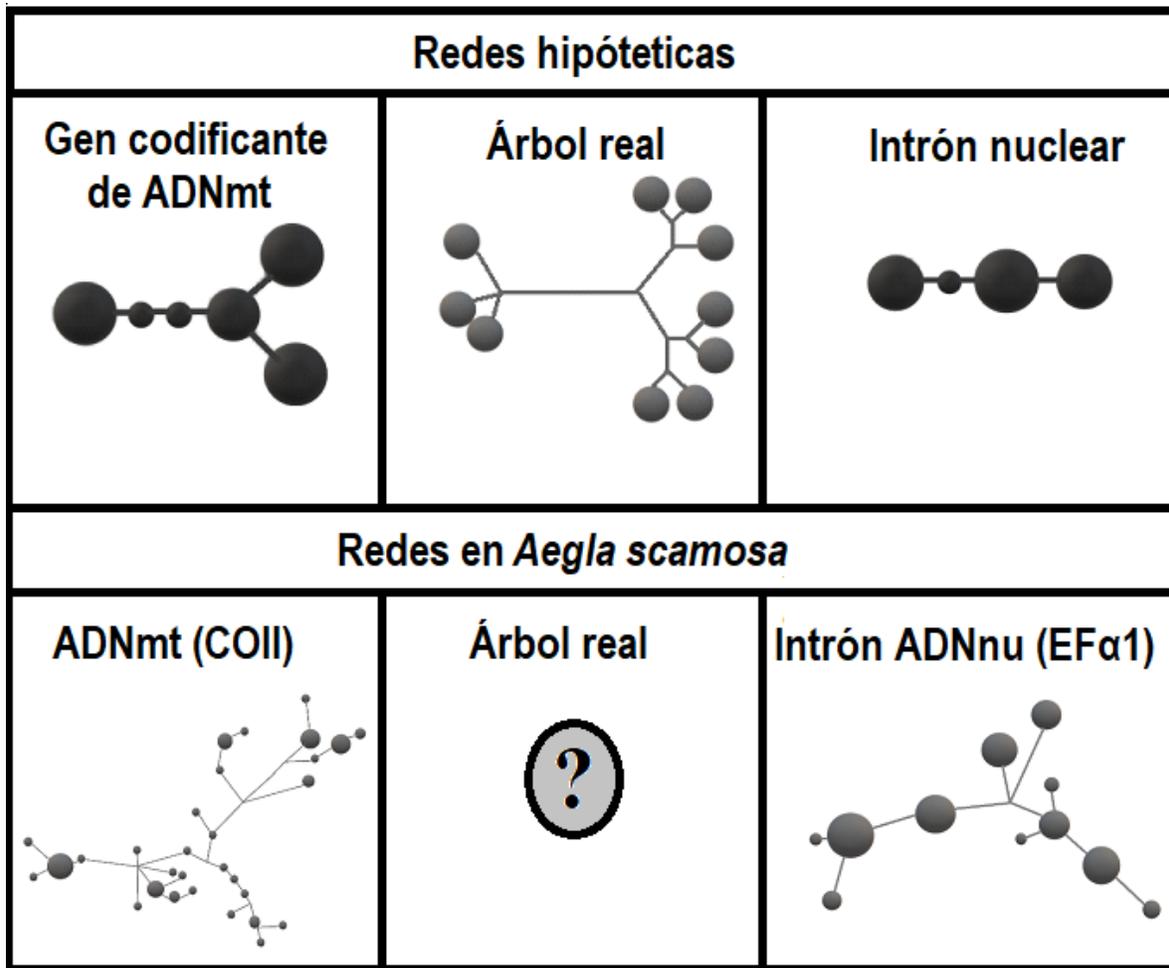


Figura 3.8- En la parte superior se muestran figuras hipótéticas modificadas de Zink y col., 2008 comparando las redes de haplotipos de un gen mitocondrial y un intrón nuclear encontradas para un mismo grupo de individuos, y como se vería el árbol evolutivo real. En la parte inferior se observan las redes obtenidas para *A. scamosa* en este trabajo, tanto para COII como para EFα1, el árbol real se desconoce (las redes se encuentran levemente modificadas para una mejor visualización, las redes sin retocar se encuentran en la sección A2 del Anexo)

Respecto a esto último, en términos biogeográficos, estos resultados podrían ser explicados por los cambios que sufrieron las cuencas hidrográficas en la región de los Andes Centrales en Argentina. El trabajo realizado por Pérez-Losada *et al.* [7] sugiere que la colonización de los ambientes dulceacuícolas del sur de Sudamérica por parte de los aéglicos ocurrió durante la ingresión marina del Cretácico Tardío, hace aproximadamente 70 millones de años. *Aegla scamosa* es considerada por estos autores una de las especies colonizadoras del actual territorio argentino, teniendo en cuenta el origen pacífico del grupo. Desde dicha colonización, las corrientes de los ríos y subcuencas de la

actual cuenca Desaguadero-Salado-Chadileuvú-Curacó han sufrido numerosos cambios debido a la intensa actividad sísmica y tectónica que caracteriza a la región de los Andes Centrales [154], modificando la conectividad entre los sistemas. El desvío de los ríos es consecuencia del levantamiento y del crecimiento lateral de las estructuras que componen las cadenas montañosas. Los ríos inicialmente corrían desde los picos altos hacia el este en canales aproximadamente paralelos. Antes de que los ríos se desviaran, el drenaje del flanco oriental de los Andes habría consistido en diez ríos que fluían hacia el este. Con el inicio del levantamiento andino hace 20 millones de años, los obstáculos comenzaron a levantarse, modificando el patrón de drenaje. Estos obstáculos desviaron y concentraron ríos que anteriormente se hallaban separados [154]. Si se contempla lo discutido anteriormente, el genoma nuclear estaría representando la estructura genética de los aéglicos cuando los ríos de las subcuencas se hallaban separados, lo que seguramente contribuía a una disminución del flujo génico entre las poblaciones. Por otra parte, el genoma mitocondrial, que muestra el pasado intermedio, evidencia la concentración de los ríos posterior al levantamiento de los Andes y el consiguiente aumento de la conectividad entre los sistemas. En aéglicos, Barber *et al.* [26], también encontraron discordancia entre las filogenias con marcadores mitocondriales y nucleares al testear la filogeografía de *A. neuquensis*. En dicho estudio, los loci nucleares develaron un antiguo evento de fragmentación y los loci mitocondriales proporcionaron mayor resolución en eventos evolutivos más recientes, al igual que en este trabajo.

Por otra parte, los marcadores microsatélites muestran un patrón similar al intrón nuclear, lo cual es coherente por ser ambos marcadores que se hallan en el genoma nuclear. Sin embargo, la estructura encontrada es más bien débil, con valores de F_{ST} mucho menores a los del intrón y esto es consistente con el hecho de que los microsatélites evolucionan a tasas muy rápidas y, a menudo revelan ideas adicionales en escalas de tiempo recientes y entre poblaciones que exhiben relaciones filogeográficas superficiales [168] [169]. En este caso, sin embargo, el análisis de clústeres de los microsatélites revela que las subcuencas Jachal y San Juan tienen una composición homogénea de individuos (representados por los clústeres celeste y violeta, respectivamente. Figura 3.4). Las subcuencas Desaguadero y Tunuyán se comportan de forma similar con todas las evidencias; los individuos provenientes de esos cuerpos de agua no mostraron estructura genética entre los sitios, al igual que ocurre con las secuencias nucleares y mitocondriales. Ambas están representadas por individuos que pertenecen a los tres clústeres, aunque predomina el clúster genético representado por el color naranja. La subcuenca del río Mendoza, también muestra una mezcla de individuos de los clústeres (naranja y celeste). Estos resultados son consistentes con el patrón general encontrado con los marcadores del intrón y del gen mitocondrial: Desaguadero y Tunuyán se comportan como una unidad y, junto al río Mendoza, son las tres subcuencas que tienen representantes de los tres clústeres.

Sin embargo, en cuanto las relaciones entre las subcuencas Jachal y San Juan y con el resto de las subcuencas, la evidencia de los microsátélites se condice con los resultados encontrados con el marcador EF α 1.

Por último, la mayor diferencia entre las evidencias nucleares y mitocondriales se observa en la subcuenca del río San Juan. Si bien esta subcuenca está representada por un solo sitio de muestreo (el río Los Patos), las colectas fueron realizadas en dos años distintos (2011 y 2017), por lo que resulta llamativo que en el caso del ADN nuclear se encontró un solo haplotipo. Hay que tener en cuenta que la cuenca del río San Juan corre de oeste a este atravesando la Precordillera [170] lo que presenta innumerables obstáculos para los organismos de escasa capacidad de dispersión como los aéglicos. Debido a la gran actividad tectónica, orogénica y volcánica de la zona, es probable que haya ocurrido un evento de deriva genética que provocara un cuello de botella, fijando este haplotipo en la población. Además, según Aguilée *et al.* [171], los eventos volcánicos, los cambios repetidos del nivel del agua, la fragmentación producida por actividades humanas y, en general, los cambios en la estructura del paisaje causarían cuellos de botella y la posterior fijación/pérdida de alelos en poblaciones naturales. Como ya se discutió con anterioridad, el área de distribución de *A. scamosa* es vulnerable a todos estos procesos espaciales por lo que ésta podría ser la explicación para el fenómeno observado en nuestro trabajo.

Los resultados obtenidos en este capítulo muestran la alta complejidad genética que caracteriza a los cangrejos aéglicos y la importancia de estudiarlos bajo variedad de metodologías. Las subcuencas que habita la especie *Aegla scamosa* tienen historias evolutivas también complejas debido a la intensa actividad orogénica y tectónica típica de la zona, por lo que el estudio de la filogeografía de esta especie permitió establecer patrones de estructura genética de las poblaciones. Debido a que la diversidad genética es un componente fundamental de la biodiversidad y su conservación es crítica para el mantenimiento de los procesos evolutivos [145] [146], es importante complementar los resultados de este trabajo con información de otras especies que habiten en la cuenca para que pueda ser utilizada en programas de manejo y conservación.

6. CONCLUSIONES

- Las evidencias utilizadas muestran diferentes patrones filogeográficos en *A. scamosa*. Los loci nucleares develaron un antiguo evento de fragmentación (cuando los ríos de las subcuencas estuvieron separados) y los loci mitocondriales proporcionaron mayor resolución en eventos evolutivos más recientes (luego de la fusión de los ríos).
- La filogeografía de la especie es coherente con la complejidad de la historia evolutiva de las subcuencas bajo estudio, debido a la intensa actividad orogénica y tectónica típica de la zona.
- Las diferencias entre los resultados de los genes nucleares y mitocondriales en la subcuenca del río San Juan, se deben probablemente a un evento de deriva genética que fijó un alelo nuclear en dicha población.

Conclusiones finales

Esta tesis ha abordado el estudio de la filogeografía de especies del género *Aegla* que habitan cuerpos de agua continentales de Argentina, tanto el noreste como la zona de Cuyo. Los estudios fueron llevados a cabo utilizando diferentes herramientas moleculares, combinadas con morfometría geométrica, con el fin de corroborar los resultados encontrados a la luz de distintas evidencias. A modo de cierre, se presentan las siguientes conclusiones que sintetizan los aportes realizados por esta tesis doctoral.

- La evidencia molecular y de morfometría geométrica utilizada en los diferentes capítulos fue adecuada para responder a las hipótesis y objetivos planteados, tanto generales como particulares. Por otra parte, se demostró la importancia de utilizar variedad de herramientas. En los estudios sobre *A. singularis* y *Aegla sp.*, las evidencias se complementaron para responder a la pregunta de investigación y en el estudio de *A. scamosa*, pudieron explicar dos patrones filogeográficos de distintos momentos geológicos. Asimismo, esta combinación de herramientas resultó útil para definir linajes diferentes dentro de una misma especie, como en el caso de *A. singularis*.

- La filogeografía de las especies del género *Aegla* abordada en esta tesis mostró que las poblaciones de *A. singularis* conforman dos linajes diferentes que estarían en proceso de especiación, y que, en caso de continuar aisladas geográfica y reproductivamente, las poblaciones de cada cuenca evolucionarán a especies diferentes. Asimismo, la población incógnita *Aegla sp.*, que mostraba caracteres diagnósticos intermedios entre dos especies, mostró ser una variación intraespecífica del linaje de *A. singularis* “Uruguay”. Por otra parte, la especie *A. scamosa* presentó una compleja historia evolutiva que se condice con los eventos geoclimáticos que ocurrieron en su área de distribución.

- El estudio de la filogeografía de la familia Aeglidae, en general, demuestra que su actual diversidad de especies fue producto, en parte, de los eventos geoclimáticos que afectaron su área de distribución. Sin embargo, la gran diversidad genética y variación morfológica que tienen estos cangrejos también fueron un elemento necesario para la gran radiación y colonización de ambientes que marcaron la historia evolutiva de la familia.

Perspectivas futuras:

- Sería interesante realizar análisis filogeográficos comparativos en especies que compartan la misma zona de distribución para determinar cómo responden las distintas especies frente a los mismos eventos geoclimáticos, dada la variedad de caminos evolutivos que se han observado la familia.

- Por otra parte, se podría incorporar la tecnología NGS (*Next Generation Sequencing*) mediante marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), por ejemplo, para estudiar eventos filogeográficos ocurridos en el pasado reciente.

ANEXO

Sección A1

Tabla A1. Información de los marcadores microsatélites probados en *A. singularis*, diseñados por Roratto 2007.

Nombre	Repetición	Secuencia de los <i>primers</i> 5'-3'
AL 135	AC	F-CATCTCGCTCACGTGCTTTA
		R-TATGAGGGAATGGGGGTGTA
AL 138	GA	F-GATTTAGCACCCTGCCACA
		R-TGAGTGAACGAATGGGTGAA
AL 128	CA	F-TTTACTGGTGATCATTCTGTGG
		R-GTAGCACCATTTTCTTTGTTTC
AL 136	CTCA	F-CGAACTGGGTCTAGCAGAATG
		R-GACCTCACGTCGTCTGACTG
AL 140	CA	F-CAGGCACCTTTAAAGCCAAG
		R-CCCACACAAAGCTTCACTCA
AL 145	CA	F-CAAGGGACATACATGCCTCA
		R-AGGGTGAGGTTGCGTATTTG
AL 159	CA	F-CCTGTCTTGACCCAATGCTT
		R-TCAAACAGGAAGAGGGGCTA

Sección A2

Figura 1. Red de *A. scamosa* con EFa1

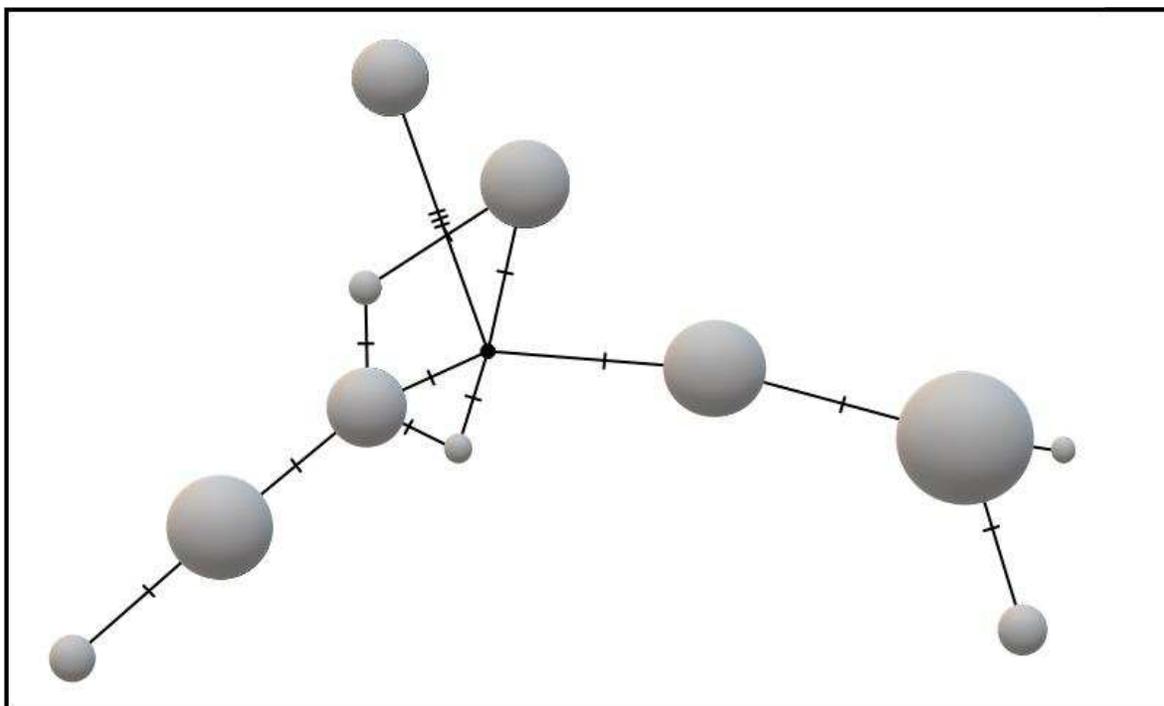
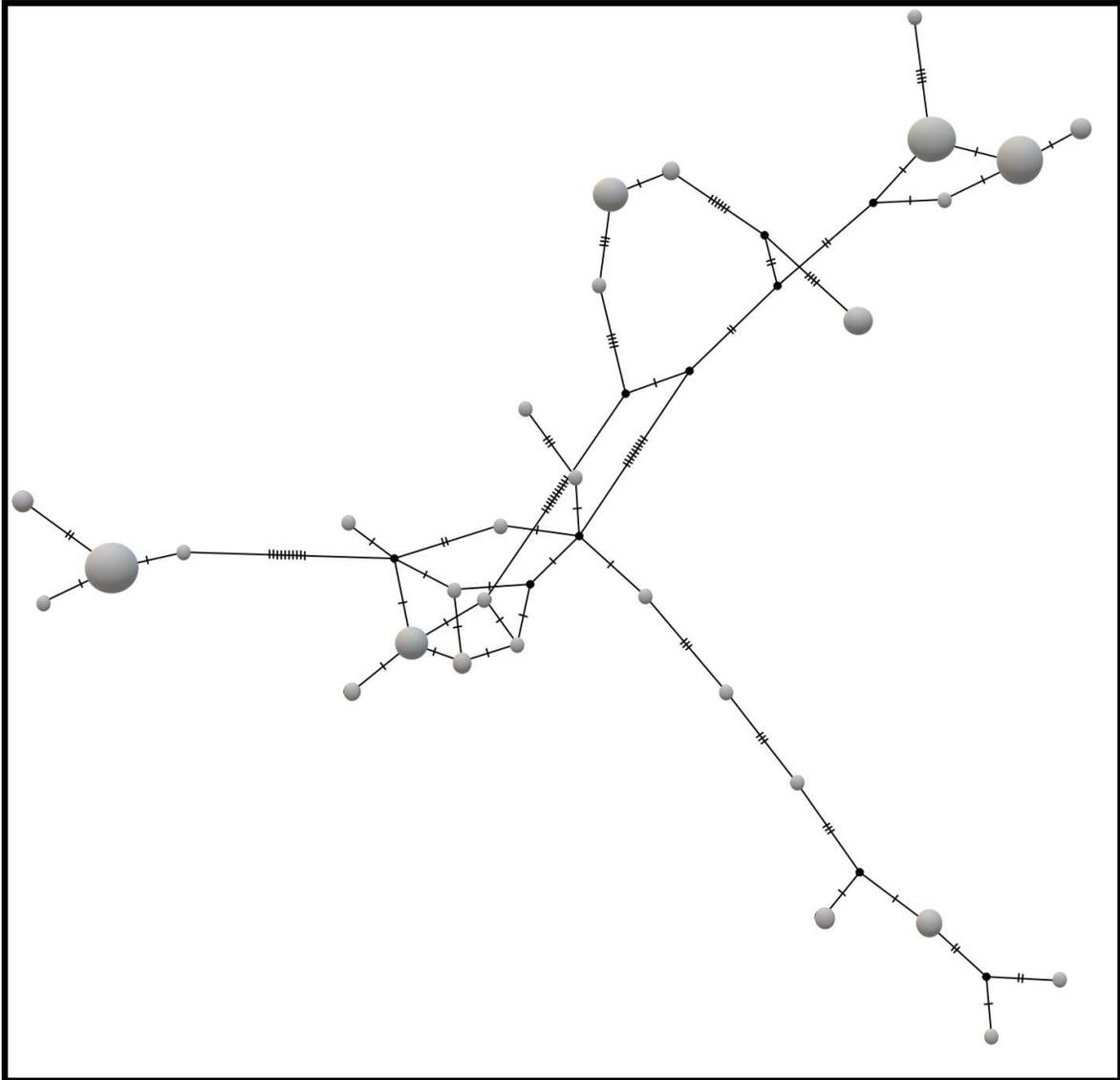


Figura 2. Red de *A. scamosa* con COII



Bibliografía

[1] PE Potter (1997) The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a natural history. *Journal of South American Earth Sciences* 10: 331-344.

[2] JG Lundberg, LG Marshall, J Guerrero, B Horton, MCSL Malabarba, F Wesselingh. (1998) The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. *Phylogeny and classification of Neotropical fishes* 27: 13-48.

[3] PA Collins, F Giri, V Williner (2011) Biogeography of the freshwater decapods in the La Plata basin, South America. *Journal of Crustacean Biology* 31 (1): 179-191.

[4] F Giri, P Collins (2014) Clinal variation in carapace shape in the South American freshwater crab, *Aegla uruguayana* (Anomura: Aeglididae). *Biological Journal of the Linnean Society* 114(4): 914-930.

[5] JJ Wiens (2004) Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution* 58(1): 193-197.

[6] JW Martin, LG Abele (1988) External morphology of the genus *Aegla* (Crustacea: Anomura: Aeglididae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 453: 1-46.

[7] M Pérez-Losada, G Bond-Buckup, CG Jara, KA Crandall (2004) Molecular systematics and biogeography of the southern South American freshwater “crabs” *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglididae) using multiple heuristic tree search approaches. *Systematic Biology* 53(5): 767-780.

[8] S Santos, G Bond-Buckup, AS Gonçalves, ML Bartholomei-Santos, L Buckup, CG Jara (2017) Diversity and conservation status of *Aegla* spp. (Anomura, Aeglididae): an update. *Nauplius* 25.

[9] JJ Morrone, EC Lopretto. (1994) Distributional patterns of freshwater Decapoda (Crustacea: Malacostraca) in southern South America: a panbiogeographic approach. *Journal of Biogeography* 97-109.

[10] WL Schmitt (1942) The species of *Aegla*, endemic South American freshwater crustaceans. *Proceeding of the United States National Museum* 91: 1-520.

[11] RA Ringuelet (1949) Los “cangrejos” argentinos del género *Aegla* de Cuyo y la Patagonia. *Revista del Museo de la Plata (N.S.) Zoología* 5: 297-347.

[12] AE Ortmann (1902) The geographical distribution of freshwater decapods and its bearing upon ancient geography. *Proceedings of the American Philosophical Society* 41: 267-400.

[13] RM Feldmann (1984) *Haumuriaegla glaessneri* n. gen. and sp. (Decapoda; Anomura; Aeglidae) from Haumurian (late Cretaceous) rocks near Cheviot, New Zealand. *New Zealand journal of geology and geophysics* 27(3): 379-385.

[14] RM Feldmann (1986), Paleogeography of two decapod taxa in the Southern Hemisphere: global conclusions with sparse data. En *Crustacean biogeography* (Eds.: Gore, R.H. y Heck, K.L.) Balkema, Rotterdam and Boston, p. 5-19.

[15] M López M (1965) Estudios biológicos en *Aegla odebrechtti paulensis*, Schmittc(Crustacea, Decapoda, Anomura). *Boletim de Zoologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP* 25: 301-314.

[16] J Xu, M Pérez-Losada, CG Jara, KA Crandall (2009) Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. *Molecular ecology* 18(5): 904-918. [17] SL de Siqueira Bueno, RM Shimizu, JCB Bond-Buckup (2016) A remarkable anomuran: the taxon *Aegla* Leach, 1820. Taxonomic remarks, distribution, biology, diversity and conservation. En *A global overview of the conservation of freshwater decapod crustaceans* Springer, Cham, P. 22-64.

[18] JCB Moraes, JM Terossi, RC Buranelli, M Tavares, FL Mantelatto, SLDS Bueno (2016) Morphological and molecular data reveal the cryptic diversity among populations of *Aegla paulensis* (Decapoda, Anomura, Aeglidae), with descriptions of four new species and comments on dispersal routes and conservation status. *Zootaxa* 4193(1): 1-48.

[19] G Bond-Buckup, CG Jara, M Pérez-Losada, L Buckup, KA Crandall (2008) Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 267-273.

[20] G Tumini, F Giri, V Williner, PA Collins, JJ Morrone (2019) Selecting and ranking areas for conservation of *Aegla* (Crustacea: Decapoda: Anomura) in southern South America integrating biogeography, phylogeny and assessments of extinction risk. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 29(5): 693-705.

[21] JC Avise, J Arnold, RM Ball, E Bermingham, T Lamb, JE Neigel, NC Saunders (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics* 18(1): 489-522.

[22] ME D'amato, D Corach D (1997) Population genetic structure in the fresh-water anomuran h by RAPD analysis. *Journal of Crustacean Biology* 17: 269-274.

[23] F Giri, G Ojeda, E Rueda, P Amavet, V Williner, P Collins (2014) Population genetic structure of the freshwater anomuran *Aegla uruguayana* Schmitt, 1942 (Decapoda, Aeglidae) in the central region of Argentina. *Crustaceana* 87(4): 414-429.

[24] MS Crivellaro, BL Zimmermann, ML Bartholomei-Santos, M. L KACrandall, M Pérez-Losada, G Bond-Buckup, S Santos. (2018) Looks can be deceiving: species delimitation reveals hidden diversity in the freshwater crab *Aegla longirostri* (Decapoda: Anomura). *Zoological Journal of the Linnean Society* 182(1): 24-37.

[25] M Pérez-Losada, J Xu, CG Jara, KA Crandall (2011) Comparing phylogeographic patterns across the Patagonian Andes in two freshwater crabs of the genus *Aegla* (Decapoda: Aeglidae). *Phylogeography and Population Genetics in Crustacea* 19: 291-303.

[26] BR Barber, J Xu, M Pérez-Losada, CG Jara, KA Crandall (2012) Conflicting evolutionary patterns due to mitochondrial introgression and multilocus phylogeography of the Patagonian freshwater crab *Aegla neuquensis*. *PLoS One*, 7(6).

[27] BL Zimmermann, MS Crivellaro, CB Hauschild, ML Bartholomei-Santos, KA Crandall, M Pérez-Losada, S Santos (2018) Phylogeography reveals unexpectedly low genetic diversity in a widely distributed species: the case of the freshwater crab *Aegla platensis* (Decapoda: Anomura). *Biological Journal of the Linnean Society* 123(3): 578-592.

[28] MP Hare (2001) Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution* 16(12): 700-706.

[29] JWO Ballard, MC Whitlock (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology* 13(4): 729-744.

[30] C Held, S Koenemann, CD Schubart (2016) *Phylogeography and population genetics in Crustacea*. (Eds.). CRC Press.

[31] F Giri, PA Collins (2004) A geometric morphometric analysis of two sympatric species of the family Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura) from the La Plata basin. *Italian Journal of Zoology* 71(1): 85-88.

[32] F Giri, A Loy (2008) Size and shape variation of two freshwater crabs in Argentinean Patagonia: the influence of sexual dimorphism, habitat, and species interactions. *Journal of Crustacean Biology* 28(1): 37-45.

- [33] LU Hepp, R Fornel, RM Restello, A Trevisan, S Santos (2012). Intraspecific morphological variation in a freshwater crustacean *Aegla plana* in Southern Brazil: effects of geographical isolation on carapace shape. *Journal of Crustacean Biology* 32: 511-518.
- [34] JC Aldrich (1993) The identification of biota through the analysis of their two-dimensional shapes, and the recognition of local forms in *Carcinus maenas* L, En: *Quantified phenotypic responses in morphology and physiology*, (Ed: Ashford: JAPAGA), p. 55-64.
- [35] A Trevisan, S Santos (2012) Morphological sexual maturity, sexual dimorphism and heterochely in *Aegla manuinflata* (Anomura). *Journal of Crustacean Biology* 32: 519-527.
- [36] MM RufiNO, P Abelló, AB Yule (2006) Geographic and gender shape differences in the carapace of *Liocarcinus depurator* (Brachyura: Portunidae) using geometric morphometrics and the influence of a digitizing method. *Journal of Zoology* 269: 458-465.
- [37] AB Marchiori, ML Bartholomei-Santos, S Santos (2014) Intraspecific variation in *Aegla longirostri* (Crustacea: Decapoda: Anomura) revealed by geometric morphometrics: evidence for ongoing speciation? *Biological Journal of the Linnean Society* 112: 31-39.
- [38] WM Brown, M George Jr., AC Wilson (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(4): 1967-1971.
- [39] WD Stansfield (1992) Genética. (Ed. McGraw- Hill) México p. 305-316
- [40] A Di Rienzo, AC Wilson (1991) Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(5): 1597-1601.
- [41] JWO Ballard, M Kreitman (1995) Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in Ecology & Evolution* 10(12): 485-488.
- [42] A Rokas, BL Williams, N King, SB Carroll (2003) Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425(6960): 798-804.
- [43] GD Hurst, FM Jiggins (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272(1572): 1525-1534.
- [44] TL Shearer, MJH Van Oppen, SL Romano, G Wörheide (2002) Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular ecology* 11(12): 2475-2487.

- [45] YX Fu, WH Li (1999) Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. *Theoretical population biology* 56(1): 1-10.
- [46] G Maroni (1993) An atlas of Drosophila genes: sequences and molecular features. Oxford University Press, p. 126–134
- [47] JA Lenstra, A Van Vliet, AC Arnberg, FJ Van Hemert, W Möller (1986) Genes coding for the elongation factor EF-1 α in Artemia. *European journal of biochemistry* 155(3): 475-483.
- [48] SW Cho, A Mitchell, JC Regier (1995) A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics -elongation factor-1-alpha recovers morphology-based tree for heliothine moths. *Molecular Biology and Evolution* 12: 650-656.
- [49] N Nahavandi, V Ketmaier, R Tiedemann (2012) Intron structure of the Elongation Factor 1-Alpha gene in the Ponto-Caspian amphipod *Pontogammarus maeoticus* (Sowinsky, 1894) and its phylogeographic utility. *Journal of crustacean biology* 32(3): 425-434.
- [50] G Tóth, Z Gáspári, J Jurka (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res* 10: 967–981.
- [51] JR Freeland (2001) Molecular ecology. *Wiley & Sons*, p.1-403
- [52] M Strand, TA Prolla, RM Liskay, TD Petes (1993) Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 365: 274--276.
- [53] JF Dallas (1992) Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse. *Mammalian Genome* 3: 452-456.
- [54] WH Li (1997) Molecular Evolution. *Sinauer Associates*, Sunderland, p1-670
- [55] M Kimura, T Ohta (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(6): 2868-2872.
- [56] M Kimura, JF Crow (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49(4): 725.
- [57] A Estoup, JM Cornuet, F Rousset, R Guyomard (1999) Juxtaposed microsatellite systems as diagnostic markers for admixture: theoretical aspects. *Molecular Biology and Evolution* 16(7): 898-898.

- [58] ML Bartholomei-Santos, PA Roratto, S Santos (2011) High genetic differentiation of *Aegla longirostri* (Crustacea, Decapoda, Anomura) populations in southern Brazil revealed by multi-loci microsatellite analysis. *Genetics and Molecular Research* 10(4): 4133-4146.
- [59] N Gouin, J Bórquez, PB Samollow, KC Douglas, M Jasti, A Bertin (2012) Isolation of microsatellite markers for two Chilean freshwater anomuran species (*Aegla araucaniensis* and *Aegla pewenchaë*) using PCR-based methods. *Conservation genetics resources* 4(1): 93-96.
- [60] PA Roratto, D Buchmann, S Santos, ML Bartholomei-Santos (2008) PCR-mediated recombination in development of microsatellite markers: mechanism and implications. *Genetics and Molecular Biology* 31(1): 58-63.
- [61] SM Aljanabi, I Martinez (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25(22): 4692-4693.
- [62] O Folmer, M Black, W Hoeh, R Lutz, R Vrijenhoek (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.
- [63] M Pérez-Losada, CG Jara, G Bond-Buckup, KA Crandall (2002) Phylogenetic relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglidæ) freshwater crabs from Chile. *Journal of Crustacean Biology* 22(2): 304-313.
- [64] RJ Van Syoc (1995) Barnacle mitochondrial DNA: determining genetic relationships among species of *Pollicipes*. *Crustacean Issues* 10: 269-296.
- [65] S Kumar, G Stecher, K Tamura (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 33(7):1870–1874
- [66] RC Edgar (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* 32(5): 1792-1797.
- [67] MA Larkin, G Blackshields, NP Brown, R Chenna, PMHF McWilliam, IM Valentin, A Wallace, R Wilm, JD Lopez, TJ Thompson, TJ Gibson and DG Higgins (2007) ClustalW and ClustalX version 2.
- [68] J Rozas, A Ferrer-Mata, JC Sánchez-DelBarrio, S Guirao-Rico, P Librado, SE Ramos-Onsins, A Sánchez-Gracia (2017) DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution* 34(12): 3299-3302.

- [69] L Excoffier, G Laval, S Schneider (2006) An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Arlequin ver 3.5. 1.3 user manual.
- [70] S Wright (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-128
- [71] L Excoffier (1993) Analysis of molecular variance (AMOVA) version 1.55. *Genetics and Biometry Laboratory*, University of Geneva, Switzerland.
- [72] HJ Bandelt, P Forster, A Röhl (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16(1): 37-48.
- [73] JP Huelsenbeck, F Ronquist (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8): 754-755.
- [74] JAA Nylander (2004) MrModeltest (version 2.2). [http://www. abc. se/~ nylander/](http://www.abc.se/~nylander/).
- [75] A Rambaut (2009) FigTree, version 1.3.1. *Computer program distributed by the author, website: <http://treebioedacuk/software/figtree/>[accessed January 4, 2011]*.
- [76] S Metz, JM Cabrera, E Rueda, F Giri, P Amavet (2016) FullSSR: microsatellite finder and primer designer. *Advances in bioinformatics*
- [77] TG Burland (2000) DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. En *Bioinformatics methods and protocols*. Humana Press. p. 71-91).
- [78] ROD Peakall, PE Smouse (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes* 6(1): 288-295.
- [79] M Slatkin (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462
- [80] JK Pritchard, W Wen, D Falush (2003) Documentation for STRUCTURE software: Version 2.
- [81] RS Waples, O Gaggiotti (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular ecology* 15(6): 1419-1439.
- [82] MA Beaumont, B Rannala (2004) The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics* 5(4), 251-261.

- [83] DC Adams (1999) Methods for shape analysis of landmark data from articulated structures. *Evolutionary Ecology Research* 1: 959-970.
- [84] FL Bookstein (1997) Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, p436.
- [85] FJ Rohlf, D Slice (1990) Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology* 39: 40-59.
- [86] F Rohlf (1996) Morphometric spaces, shape components and the effects of linear transformations. En: *Advances in Morphometrics*. (Naylor eds.), Plenum Press, p. 117-129.
- [87] F Rohlf (2017) tpsDig (v. 2.30), tpsUtil (v. 1.74). *Department of Ecology and Evolution*. State University of New York, Stony Brook, Nueva York.
- [88] CP Klingenberg (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources* 11(2): 353-357.
- [89] F Rohlf (2007). tpsRelw version 1.45. *Department of Ecology and Evolution*. State University of New York, Stony Brook.
- [90] S Gavrilets (2003) Perspective: models of speciation: what have we learned in 40 years? *Evolution* 57(10): 2197-2215.
- [91] T Dobzhansky (1937) Genetics and the origin of species. New York: Columbia University Press.
- [92] C Dutech, VL Sork, AJ Irwin, PE Smouse, FW Davis (2005) Gene flow and fine-scale genetic structure in a wind-pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 92(2): 252-261.
- [93] C Darwin (1859) On the origins of species by means of natural selection. London: John Murray.
- [94] TC Barr Jr, JR Holsinger (1985) Speciation in cave faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16(1): 313-337.
- [95] K Mashiko (2000). Insights into the mechanism of speciation in gammarid crustaceans of Lake Baikal using a population-genetic approach. *Advances in Ecological Research* 31: 221-235.

[96] MI Stevens, ID Hogg (2004) Population genetic structure of New Zealand's endemic corophiid amphipods: evidence for allopatric speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 81(1): 119-133.

[97] ML Worsham, EP Julius, CC Nice, PH Diaz, DG Huffman (2017) Geographic isolation facilitates the evolution of reproductive isolation and morphological divergence. *Ecology and Evolution* 7(23): 10278-10288.

[98] EM Barría, RD Sepúlveda, CG Jara (2011) Morphologic variation in *Aegla* Leach (Decapoda: Reptantia: Aeglidae) from central-southern Chile: interspecific differences, sexual dimorphism, and spatial segregation. *Journal of Crustacean Biology* 31(2): 231-239.

[99] T Karanovic, S Lee, W Lee (2018) Instant taxonomy: choosing adequate characters for species delimitation and description through congruence between molecular data and quantitative shape analysis. *Invertebrate Systematics* 32(3): 551-580.

[100] JC Avise (2009) Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36(1): 3-15.

[101] C Fernandes, M Bichuette (2013) Shape variation of *Aegla schmitti* (Crustacea, Decapoda, Aeglidae) associated to superficial and subterranean stream reaches. *Subterranean Biology* 10: 17.

[102] M Amsler (2000) El río Paraná en su tramo medio: contribución al conocimiento y prácticas ingenieriles en un gran río de llanura. Tomo I. Centro de publicaciones. Secretaría de Extensión. Universidad Nacional del Litoral.

[103] AA Hoffmann, J Shirriffs (2002) Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. *Evolution* 56(5): 1068-1073.

[104] AJ Drummond, MA Suchard, D Xie, A Rambaut (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8): 1969-1973.

[105] A Rambaut, AJ Drummond, D Xie, G Baele, MA Suchard (2018) Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5): 901.

[106] I Manolopoulou, A Hille, B Emerson (2016) BPEC: An R package for Bayesian phylogeographic and ecological clustering. *arXiv preprint arXiv:1604.01617*.

- [107] R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing, reference index version. 2(0). Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- [108] VE Viau, LS López Greco, G Bond-Buckup, EM Rodríguez (2006) Size at the onset of sexual maturity in the anomuran crab, *Aegla uruguayana* (Aeglidae). *Acta Zoologica* 87(4): 253-264. 111.
- [109] F Rohlf (1998) TPS reg for Windows version 1.15. Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Book.
- [110] S Turner, M Regelous, S Kelley, C Hawkesworth, M Mantovani (1994) Magmatism and continental break-up in the South Atlantic: high precision ^{40}Ar - ^{39}Ar geochronology. *Earth and Planetary Science Letters* 121(3-4): 333-348.
- [111] VA Ramos (1999) Las provincias geológicas del territorio argentino. *Geología Argentina* 29(3), 41-96.
- [112] VG Roig, JMAM Cei (1961) Relaciones biogeográficas entre Misiones y el sistema de la Serra Geral. *Boletín de Estudios Geográficos* 8.
- [113] RM Hernández, TE Jordan, AD Farjat, L Echavarría, BD Idleman, JM Reynolds (2005) Age, distribution, tectonics, and eustatic controls of the Paranense and Caribbean marine transgressions in southern Bolivia and Argentina. *Journal of South American Earth Sciences* 19(4): 495-512.
- [114] RM Zink, GF Barrowclough (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular ecology* 17(9): 2107-2121.
- [115] SC Choi (2016) Methods for delimiting species via population genetics and phylogenetics using genotype data. *Genes & Genomics* 38(10): 905-915.
- [116] RJ Petit, L Excoffier (2009) Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & evolution* 24(7): 386-393.
- [117] S Santos, G Bond-Buckup, L Buckup, ML Bartholomei-Santos, M Pérez-Losada, CG Jara, KA Crandall (2015) Three new species of Aeglidae (Aegla Leach, 1820) from Paraná State, Brazil. *Journal of Crustacean Biology* 35: 839-849.

[118] S Santos, G Bond-Buckup, L Buckup, TG Loureiro, AS Gonçalves, A Verdi, F Scarabino, C Clavijo (2014) The Aeglidae of Uruguay (Decapoda, Anomura), with the description of a new species of *Aegla*. *Crustaceana Monographs* 19: 195-205.

[119] S Santos, G Bond-Buckup, L Buckup, M Pérez-Losada, M Finley, KA Crandall (2012) Three new species of *Aegla* (Anomura) freshwater crabs from the Upper Uruguay River hydrographic basin in Brazil. *Journal of Crustacean Biology* 32: 529-540.

[120] S Santos, G Bond-Buckup, M Pérez-Losada, ML Bartholomei-Santos, L Buckup (2009) *Aegla manuinflata*, a new species of freshwater anomuran (Decapoda: Anomura: Aeglidae). *Zootaxa* 2088: 31-40.

[121] S Santos, CG Jara, ML Bartholomei-Santos, M Pérez-Losada, KA Crandall (2013) New species and records of the genus *Aegla* Leach, 1820 (Crustacea, Anomura, Aeglidae) from the West-Central region of Rio Grande do Sul, Brazil. *Nauplius* 21: 211-223.

[122] JCB Moraes, M Tavares, SLDS Bueno (2017) Taxonomic review of *Aegla marginata* Bond-Buckup & Buckup, 1994 (Decapoda, Anomura, Aeglidae) with description of a new species. *Zootaxa* 4323(4): 519-533.

[123] CG Jara, M Pérez-Losada, KA Crandall (2018) *Aegla chilota*, new species of anomuran freshwater crab from Chiloé Island, western Patagonia. *Nauplius* 26.

[124] FP Paez, IC Marcal, LSouza-Shibatta, RA Gregati, SH Sofia, GM Teixeira (2018) A new species of *Aegla* Leach, 1820 (Crustacea, Anomura) from the Iguazu River basin, Brazil. *Zootaxa* 4527(3): 335-346.

[125] Z Yang, B Rannala (2010) Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(20): 9264-9269.

[126] Z Yang, B Rannala (2014) Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Molecular Biology and Evolution* 31(12): 3125-3135.

[127] G Bond-Buckup, L Buckup (1994). A família Aeglidae (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Arquivos de zoologia* 32(4): 159-346.

[128] R Vaz-Ferreira, R Gary, M Vaz-Ferreira (1945) Notas biométricas sobre los crustáceos decapodos dos del género *Aegla* Leach, I. La variacion de algunas magnitudes em *Aegla uruguayana* Schmitt. *Comunicaciones Zoologicas del Museo Historia del Natural del Montivideo* 1: 1-6

[129] SI Williamson, E Martinez Fontes (1955) *Aegla franca* Schmitt (Crust. Dec. Anomura): ampliación de su distribución geográfica y estudio biométrico comparativu. Comun. Inst. Nac. Invest. Cienc. Nat. Mus. Argent. Cienc. Nat. 'Bernardino Rivadavia', *Ciencias Zoológicas* 3: 55-92

[130] EC Lopretto (1978) Las especies de *Aegla* Leach del centro-oeste argentino en base a la morfología comparada del quinto par de pereiópodos (Crustacea, Anomura, Aeglidae). *Neotropica* 24(71): 57-68.

[131] EC Lopretto (1979) Estudio comparativo del quinto par de pereiópodos en los representantes del género *Aegla* de la Patagonia Argentina (Crustacea Anomura). *Neotropica*, 25(73), 9-22.

[132] CG Jara (1982) *Aegla bahamondei*, new Species (Crustacea: Decapoda: Anomura) from the coastal mountain range of Nahuelbuta, Chile. *Journal of Crustacean Biology*, 2(2), 232-238.

[133] MP Schuldt, W Nuñez, AV Mersing, M Mancediño (1988) *Aegla* (Crustacea, Anomura) en el lago Huechulafquen (Neuquén Argentina) y algunas implicancias filogenéticas para Aeglidae del centro oeste de Argentina. *Anales de la Sociedad Científica Argentina* 217(50): 27-37.

[134] RA Ringuelet (1959) Notas sobre *Aegla* de la Argentina y Paraguay (Crust. Decap. Anomura). *Physis* 21: 231-239

[135] SR Daniels, BA Stewart, G Gouws, M Cunningham, CA Matthee (2002) Phylogenetic relationships of the southern African freshwater crab fauna (Decapoda: Potamonautidae: Potamonautes) derived from multiple data sets reveal biogeographic patterning. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25(3): 511-523.

[136] JA Darling (2011) Interspecific hybridization and mitochondrial introgression in invasive *Carcinus shore* crabs. *Plos One* 6(3).

[137] JA Darling, MJ Bagley, J Roman, CK Tepolt, JB Geller (2008) Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Molecular Ecology* 17: 4992–5007

[138] GM Capelli, JF Capelli (1980) Hybridization between cray-fish of the genus *Orconectes*: morphological evidence (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* 39:121–132.

[139] WA Bray, AL Lawrence, LJ Lester, LL Smith (1990) Hybridization of *Penaeus setiferus* (Linnaeus, 1767) and *Penaeus schmitti* Burkenroad, 1936 (Decapoda). *Journal of Crustacean Biology* 10(2): 278-283.

[140] LJ Rissler, JJ Apodaca (2007) Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic biology* 56(6): 924-942.

[141] KL Shaw (2002) Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(25): 16122-16127.

[142] JC Avise (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates 684

[143] WL Perry, JL Feder, G Dwyer, DM Lodge (2001) Hybrid zone dynamics and species replacement between *Orconectes* crayfishes in a northern Wisconsin lake. *Evolution* 55(6): 1153-1166.

[144] AB Marchiori, R Fornel, S Santos (2015) Morphometric variation in allopatric populations of *Aegla platensis* (Crustacea: Decapoda: Anomura): possible evidence for cryptic speciation. *Zoomorphology* 134(1): 45-53.

[145] C Moritz, DP Faith (1998) Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular ecology* 7(4): 419-429.

[146] R Frankham, DA Briscoe, JD Ballou (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge university press.

[147] JC Avise (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard university press.

[148] R Rocha, A López-Baucells, FZ Farneda, M Groenenberg, PE Bobrowiec, M Cabeza, CF Meyer (2017) Consequences of a large-scale fragmentation experiment for Neotropical bats: disentangling the relative importance of local and landscape-scale effects. *Landscape Ecology* 32(1): 31-45.

[149] NI Richman, M Böhm, SB Adams, F Alvarez, EA Bergey, JJ Bunn, KL Dawkins (2015) Multiple drivers of decline in the global status of freshwater crayfish (Decapoda: Astacidea). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370(1662): 20140060.

[150] C Revenga, I Campbell, R Abell, P De Villiers, M Bryer (2005) Prospects for monitoring freshwater ecosystems towards the 2010 targets. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1454): 397-413.

[151] D Dudgeon, AH Arthington, MO Gessner, ZI Kawabata, DJ Knowler, C Lévêque, CA Sullivan (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews* 81(2): 163-182.

[152] W Darwall, K Smith, D Allen, M Seddon, GN Reid, V Clausnitzer, VJ Kalkman (2009) Freshwater biodiversity: a hidden resource under threat. *Wildlife in a changing world—An Analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species* 43.

[153] B Collen, F Whitton, EE Dyer, JE Baillie, N Cumberlidge, WR Darwall, M Böhm (2014) Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. *Global ecology and Biogeography* 23(1): 40-51.

[154] GM Suvires, R Mon, AA Gutiérrez (2012) Tectonic effects on the drainage disposition in mountain slopes and orogen forelands. A case study: the Central Andes of Argentina. *Brazilian Journal of Geology* 42(1): 229-239.

[155] HW Cazenave (2015) LA CUENCA DEL RÍO DESAGUADERO: un caso de desertificación por acción antropica. *InterEspaço: Revista de Geografia e Interdisciplinaridade* 1(2): 225-236.

[156] DK Yeates, P Bouchard, GB Monteith (2002) Patterns and levels of endemism in the Australian Wet Tropics rainforest: evidence from flightless insects. *Invertebrate Systematics* 16(4): 605-619. 104

[157] YHE Tsai (2011) PhyloGeoViz: A web-based program that visualizes genetic data on maps. *Molecular Ecology Resources* 11(3): 557-561.

[158] G Sherman, T Sutton, R Blazek, S Holl, O Dassau, B Morely, L Luthman (2014) QGIS Geographic Information System. *Open Source Geospatial Foundation Project. Disponível em: Acesso em, 25.*

[159] M Matschiner, W Salzburger (2009) TANDEM: integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics* 25(15): 1982-1983.

[160] C van Oosterhout, WF Hutchinson, DPM Wills, PF Shipley (2003) Micro-checker. *Department of Computer Sciences, University of Hull: Hull, UK.*

[161] DA Earl (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources* 4(2): 359-361.

[162] NM Kopelman, J Mayzel, M Jakobsson, NA Rosenberg, I Mayrose (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources* 15(5): 1179-1191.

[163] HL López, RC Menni, M Donato, AM Miquelarena (2008) Biogeographical revision of Argentina (Andean and Neotropical Regions): an analysis using freshwater fishes. *Journal of Biogeography* 35(9): 1564-1579.

[164] JP Metzger, H Décamps (1997) The structural connectivity threshold: an hypothesis in conservation biology at the landscape scale. *Acta Oecologica* 18(1): 1-12.

[165] VM Brown (1983) Evolution of animal mitochondrial DNA. *Evolution of genes and proteins* 62-88. 105

[166] RR Hudson, M Turelli (2003) Stochasticity overrules the “three-times rule”: genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. *Evolution* 57(1): 182-190.

[167] DP Toews, A Brelsford (2012) The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21(16): 3907-3930.

[168] B Angers, I Bernatchez (1998) Combined use of SMM and non-SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidea) populations from microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* 15: 143–159.

[169] B Hänfling, B Hellemans, FAM Volckaert, GR Carvalho (2002) Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio*, revealed by microsatellites. *Molecular Ecology* 11(9): 1717-1729.

[170] F Colombo, P Busquets, E Ramos, J Vergés, D Ragona (2000) Quaternary alluvial terraces in an active tectonic region: the San Juan River valley, Andean ranges, San Juan Province, Argentina. *Journal of South American Earth Sciences* 13(7): 611-626.

[171] R Aguilée, D Claessen, A Lambert (2009) Allele fixation in a dynamic metapopulation: founder effects vs refuge effects. *Theoretical population biology* 76(2): 105-117.

