



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



TESIS DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA

**Género *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) en
Uruguay: taxonomía y ecología**

Mag. Analisa Waller Panzardi

Orientadora: Dra. Ana Verdi

Co-orientadora: Dra. Ivanna Tomasco

Co-orientador: Dr. Exequiel González

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA)

-Biología- subárea Zoología-

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2023

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO (CAS)

Dr. Fernando Pérez Miles. Facultad de Ciencias. UdelaR

Dr. Miguel Simó. Facultad de Ciencias. UdelaR

Dr. Sergio Martínez. Facultad de Ciencias. UdelaR

TRIBUNAL DE TESIS

Dr. Fernando Pérez Miles. Sección Entomología. Facultad de Ciencias. UdelaR

Dr. Walter Norbis. Laboratorio de Fisiología de la Reproducción y Ecología de Peces.
Facultad de Ciencias. UdelaR

Dra. Berenice Trovant. Instituto de Diversidad y Evolución Austral. CCT CONICET-
CENPAT. Argentina.

DIFUSIÓN

Presentaciones en Congresos

Estudio preliminar del género *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) para el Uruguay. Waller y Verdi. V Congreso Uruguayo de Zoología. Montevideo, Uruguay 2018.

Estado de conocimiento del género *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) para el Uruguay. Waller y Verdi. II Congreso Nacional de Biociencias. Montevideo, Uruguay 2019.

Aspectos reproductivos de una población de *Hyaella curvispina* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) en Uruguay. Waller; Ramos y Verdi. VI Congreso Uruguayo de Zoología. Montevideo, Uruguay 2021.

Genus *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) in Uruguay: molecular diversity and provisional new species. Waller; Verdi y Tomasco. International Crustacean Conference -XI Congresso Brasileiro sobre Crustáceos/ The Crustacean Society (TCS) Summer Meeting. Santos, Brasil 2022.

Publicaciones científicas

Waller, A.; T. Ramos & A. Verdi. 2020. Estructura poblacional y aspectos reproductivos de una población de *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 de Uruguay. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay. 29 (2): 106-115. <https://doi.org/10.26462/29.2.7>

Waller, A.; González, E.R.; Verdi, A. & I.H. Tomasco. 2022. Genus *Hyaella* (Amphipoda: Hyaellidae) in Humid Pampas: molecular diversity and provisional new species. Arthropod Systematics & Phylogeny 80: 261–278. <https://doi.org/10.3897/asp.80.e79498>

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a PEDECIBA por permitir la realización de este trabajo. A CSIC y a la ANII por hacer posible la ejecución de este posgrado, gracias al apoyo financiero.

Al tribunal: Fernando, Berenice y Walter por haber aceptado corregir esta tesis y por los aportes que la mejoraron significativamente.

A mi querida tutora de tesis Ana Verdi, por su tiempo dedicado a orientar este trabajo, por compartir su vasta experiencia y conocimiento y sobre todo por el apoyo y la mucha paciencia que me ha tenido en el transcurso de estos años.

A mi co-orientadora Ivanna Tomasco, por la buena disposición que tuvo en todo momento, por sus valiosos aportes académicos y bibliográficos y también por su amistad. A mi co-orientador Exequiel González por sus aportes bibliográficos y académicos que enriquecieron el trabajo.

A mis compañeros de la Sección Entomología, por el apoyo, los aportes realizados y todo el tiempo compartido. Particularmente a Enrique, por sus consejos, colaboración y aliento; y a Taiara por su ayuda en la realización de los muestreos y estar dispuesta a colaborar en mi trabajo.

A mis familiares y seres queridos que me han acompañado siempre.

Finalmente y muy especialmente quiero agradecer a Germán por su apoyo cariñoso en todo momento y a nuestro niño Tabaré, lo mejor que nos ha pasado, que nació y se ha criado con padres tesistas.

A todas y todos ¡gracias, gracias, gracias!

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	11
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
CAPÍTULO 1	26
DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DEL GÉNERO <i>HYALELLA</i> (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE) PARA EL URUGUAY	26
INTRODUCCIÓN	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Recolección de ejemplares	27
Identificación morfológica	32
Análisis de datos	33
RESULTADOS	33
Identificación morfológica	33
Descripción enmendada de <i>H. curvispina</i>	34
Descripción de los morfotipos y diferenciación con respecto a <i>H. curvispina</i>	48
Longitud del cefalotórax	57
DISCUSIÓN	59
CAPÍTULO 2	63
DIVERSIDAD MOLECULAR Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO <i>HYALELLA</i> (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE) PARA EL URUGUAY	63
INTRODUCCIÓN	63
MATERIALES Y MÉTODOS	65
Recolección de ejemplares	65
Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	66
Edición de secuencias	68
Análisis filogenético y delimitación de especies	69
RESULTADOS	71
Composición de las secuencias	71
Distancias genéticas	73
Análisis de saturación	75
Análisis filogenético	75
Delimitación molecular de especies	82

DISCUSIÓN	84
CAPÍTULO 3	91
DESCRIPCIÓN DE DOS NUEVAS ESPECIES DE <i>HYALELLA</i> PARA EL URUGUAY	91
INTRODUCCIÓN	91
MATERIALES Y MÉTODOS	92
Procedencia de los especímenes	92
Sitios de recolecta	92
Trabajo de laboratorio	95
RESULTADOS	96
<i>Hyalella</i> sp. n. 1	96
<i>Hyalella</i> sp. n. 2	110
Clave de identificación de especies de <i>Hyalella</i> de Uruguay	124
DISCUSIÓN:	125
CAPÍTULO 4	126
ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE UNA POBLACIÓN DE <i>HYALELLA CURVISPINA</i> (SHOEMAKER, 1942) DE URUGUAY	126
INTRODUCCIÓN	126
MATERIALES Y MÉTODOS	127
Sitio de estudio y recolecta de ejemplares	127
Análisis en el laboratorio	128
Análisis de datos	131
RESULTADOS	131
Abundancia y parámetros fisicoquímicos	131
Largo de cefalotórax	134
Proporción sexual	137
Fecundidad	137
DISCUSIÓN	138
CONCLUSIONES GENERALES	142
BIBLIOGRAFÍA	144
MATERIAL ANEXO	162
ANEXO TABLAS	162
ANEXO FIGURAS	171

RESUMEN

Hyaella Smith 1874 (Crustacea, Amphipoda), es el único género de anfípodos epigeos presente en ambientes dulceacuícolas de América. El conocimiento taxonómico del género se encuentra en un estado incompleto, debido a que se trata de especies crípticas con una elevada complejidad, con variaciones morfológicas interespecíficas e interpoblacionales muy sutiles, lo que dificulta su identificación y diferenciación. En América del Sur, se ha sugerido la existencia de varios complejos de especies, uno de ellos el “complejo curvispina” caracterizado por *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942, única especie citada en Uruguay previo a este trabajo. El estudio que se presenta en esta tesis abordó por primera vez al “complejo curvispina” en Uruguay investigando aspectos taxonómicos a nivel morfológico y molecular, y aspectos ecológicos de la especie más representativa *Hyaella curvispina*. Se realizó un relevamiento del género en todo el país, morfológicamente se identificó a *H. curvispina* y nueve morfos con diferencias sutiles que comparten las características del “complejo curvispina”. A estos ejemplares se los caracterizó molecularmente utilizando cuatro marcadores: dos mitocondriales, COI y 12S, y dos nucleares, 28S y H3. Los resultados sugieren que en Uruguay el “complejo curvispina” es parafilético con respecto a algunas especies del altiplano andino. Éste complejo está integrado mayoritariamente por *H. curvispina* y dos nuevas especies, una de ellas registrada para la localidad de Aguas Blancas, Lavalleja, conviviendo en simpatria con *H. curvispina*; y otra registrada para Batoví, Tacuarembó. A su vez, este complejo está cercanamente relacionado con las especies *Hyaella kochi* y *Hyaella montforti* del altiplano andino. Por otra parte, la dinámica poblacional y los aspectos reproductivos de *H. curvispina* demostraron ser similares a tres especies de *Hyaella* de Rio Grande do Sul, Brasil, aunque se registraron diferencias en cuanto al tamaño y fecundidad, las cuales fueron mayores en *H. curvispina*. La información taxonómica y ecológica obtenida en este trabajo contribuye a la conservación de los ecosistemas de agua dulce en América del Sur, ya que estos organismos son endémicos e indicadores de calidad ambiental de estos ambientes que actualmente se consideran los más amenazados del planeta.

ABSTRACT

Hyalella Smith 1874 (Crustacea, Amphipoda), is the only genus of epigean freshwater amphipods endemic to the Americas. The taxonomic knowledge of the genus is in an incomplete state because they are cryptic species with high complexity, with very subtle interspecific and interpopulation morphological variations, which makes their identification and differentiation difficult. In South America, several species complexes have been suggested. One of them is the "curvispina complex" characterized by *Hyalella curvispina*, the only species cited in Uruguay before this work. The study presented in this thesis addressed for the first time the "curvispina complex" in Uruguay, investigating taxonomic aspects at the morphological and molecular level and ecological aspects of the most representative species, *H. curvispina*. A survey of the genus was carried out throughout the country, morphologically identifying *H. curvispina* and nine morphs with subtle differences that share the characteristics of the "curvispina complex." These specimens were molecularly characterized using four molecular markers: COI, 12S, 28S, and H3. As a result, it was obtained that in Uruguay the "curvispina complex" is paraphyletic regarding some species from Altiplano and is mainly composed of *H. curvispina* and two new species, one registered for Aguas Blancas locality in Lavalleja, occurring in sympatry with *H. curvispina*; and other recorded for Batoví in Tacuarembó. This complex is related to the species *H. kochi* and *H. montforti* from the Andean highlands. On the other hand, the population dynamics, and reproductive aspects of *H. curvispina* shown to be like three species of *Hyalella* from Rio Grande do Sul, Brazil. However, differences in size and fecundity were recorded, which were higher for *H. curvispina*. The taxonomic and ecological information obtained in this work contributes to the conservation of freshwater ecosystems in South America since these organisms are endemic and indicators of the environmental quality of these ecosystems that are currently considered the most threatened on the planet.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los ecosistemas dulceacuícolas

Los ecosistemas de agua dulce ocupan el 1% de la superficie de la Tierra y representan el 3% del total de los ecosistemas acuáticos del planeta. Mantienen una gran diversidad de organismos, incluso mayor que los terrestres, son considerados “hot spots” que sustentan el 10% de todas las especies conocidas (Strayer & Dudgeon, 2010). La biota que albergan presenta un fuerte valor ecológico dado que es responsable de la mayoría del trabajo de purificación del agua, descomposición y reciclado de nutrientes (Vásquez et al., 2006). Además, proveen de materias primas de valor económico (producción de peces y otros alimentos) y servicios a la sociedad (control de las inundaciones, transporte, recreación, purificación de residuos industriales y de desechos humanos), satisfaciendo necesidades y contribuyendo al bienestar humano. Actualmente, los ambientes de agua dulce se consideran los ecosistemas más amenazados en el mundo, debido a las actividades humanas que generan alteraciones y degradación de los hábitats causando eutrofización, acidificación, sedimentación, aumento de la turbidez, eliminación de vegetación de ribera, canalización; contaminación por sustancias tóxicas; introducción de especies exóticas; manipulaciones hidrológicas (reservorios, remoción de aguas subterráneas, uso en riego); sobreexplotación de especies con importancia económica y presiones globales (aumento de la incidencia de la luz ultravioleta, calentamiento global) (Dudgeon et al., 2006). Estos impactos han generado una pérdida de la biodiversidad dulceacuícola mucho mayor a la que ocurre en los ecosistemas marinos y terrestres (Nel et al., 2009). A su vez, para el caso de los invertebrados que comprenden gran parte de su diversidad no existen estimaciones adecuadas sobre su situación de amenaza (Abell, 2002; Dudgeon et al., 2006).

El conocimiento de la diversidad de invertebrados de agua dulce es precario y se encuentra subestimado, debido a que son extremadamente abundantes y a la falta de especialistas en estos grupos, siendo particularmente más conocidos en los trópicos con altos niveles de endemismo local y riqueza de especies, con grupos que se destacan como los moluscos, insectos y crustáceos (Dudgeon et al., 2006). Los crustáceos anfípodos de agua dulce del género *Hyaella* Smith, (1874) se ajustan a esta situación. Sus especies son sensibles a los impactos ambientales, se utilizan en ensayos de toxicidad y tienen

poblaciones endémicas con baja capacidad de dispersión, lo que las hace muy susceptibles de extinción por factores antrópicos. *Hyaella* ocurre sólo en las Américas y es muy poco conocida en América del Sur, tanto en su diversidad real como en su ecología. Además, *Hyaella* tiene especies con morfología muy similar, lo que dificulta identificar poblaciones, describir nuevas especies y conocer su distribución geográfica. Identificar las especies, sus relaciones de parentesco y su ecología es imprescindible para el conocimiento de la diversidad del género y su situación de amenaza efectiva.

Peracarida, Amphipoda: el género *Hyaella*

El superorden Peracarida comprende un grupo diverso de crustáceos que junto con el superorden Decapoda representan a la mayoría de los Malacostraca y de hecho a la mayoría de los Crustacea (Martin & Davis, 2003).

Los peracaridos se caracterizan por la presencia de marsupio en las hembras; bolsa ventral destinada a la incubación de los huevos hasta la emergencia de los prejuveniles; y por la presencia de la *lacinia mobilis*, proceso articulado y móvil de la mandíbula taxonómicamente importante para la determinación del superorden (Poore, 2005). Entre los peracáridos, el orden Amphipoda, es el segundo en importancia de acuerdo con el número de especies descritas, las que se distribuyen en seis subórdenes: Senticaudata, Hyperiidea, Pseudingolfiellidea, Colomastigidea, Hyperiopsidea y Amphilochidea (Lowry & Myers, 2017). De estos, el suborden Senticaudata es el más abundante y en él se incluyen a la mayoría de las especies de agua dulce. Sus integrantes se caracterizan, por la presencia de una seda robusta apical en la rama de los uropodos 1 y 2. Se encuentra formado por seis infraórdenes: Carangoliopsida, Hadziida, Corophiida, Bogidiellida, Gammarida y Talitrida (Lowry & Myers, 2013). El infraorden Talitrida está integrado por 15 familias, dentro de las que se encuentra Hyaellidae a la cual pertenece el género *Hyaella* Smith, 1874.

Los anfípodos *Hyaella* se caracterizan morfológicamente por tener el cuerpo lateralmente comprimido y por la ausencia de caparazón. El cefalotórax presenta un par de ojos compuestos sésiles, dos pares de antenas y piezas bucales que incluyen mandíbulas, maxilas I, maxilas II y maxilípedo. El tórax o pereon está compuesto por siete pares de apéndices o pereopodos, el primer y segundo par denominados gnatópodos, modificados en subquelas (Fig. 1). Las branquias se encuentran insertas en la porción

interna de las coxas y generalmente están presentes del segundo al sexto segmento torácico. Ventralmente sobre los esternitos del tórax y en número variable, están presentes evaginaciones denominadas “sternal gills” que se relacionan con el balance iónico a bajos niveles de salinidad (Eoff et al., 2009). El abdomen o pleon, está dividido en dos partes: una anterior con pleopodos típicos y una posterior, llamada urosoma con apéndices modificados en uropodos, el telson se encuentra unido al último urosomito (Barnard & Williams, 1995).

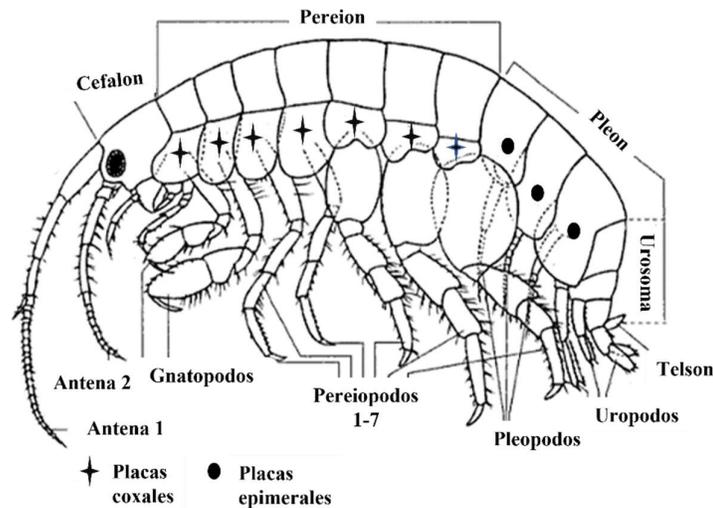


Figura 1. Morfología general de un anfípodo. Modificado de Barnard & Karaman, 1991.

Las distintas especies de *Hyalella* miden entre 2,5 a 20 mm desde el extremo del cefalon hasta el extremo del telson. Los caracteres exclusivos del género comprenden, la morfología entera del telson, las mandíbulas sin palpo y la ausencia de la rama interna (endopodito) del tercer uropodo. La mayoría de las especies de este género se encuentran en diversos hábitats de agua dulce, como lagos, estanques y arroyos, a menudo adheridas a macrófitas, nadando en la columna de agua o confinadas a sedimentos, siendo miembros importantes de la fauna bentónica (Grosso & Peralta, 1999; Wellborn, 1995). Excepcionalmente se han encontrado viviendo en cavernas como *Hyalella caeca* Pereira, 1989 o habitando en lugares húmedos como la especie *Hyalella rionegrina* Grosso & Peralta, 1999 la cual es semiterrestre (Grosso & Peralta, 1999). La mayor parte de este grupo son omnívoros y se alimentan principalmente de algas y bacterias asociadas al sedimento, macrófitas acuáticas, animales muertos y material vegetal (Cooper, 1965; Hargrave, 1970). Por sus hábitos alimenticios, juegan un papel fundamental en las redes

tróficas facilitando el flujo de energía de los ecosistemas acuáticos a través de la conversión directa de detritos en pequeñas partículas de materia orgánica y como fuente alimenticia para otros invertebrados, peces, anfibios y aves (da Silva Castiglioni & Bond Backup, 2008b; Giorgi & Tiraboschi, 1999). Algunas especies han sido estudiadas como huéspedes intermediarios o definitivos de parásitos (Casset et al., 2001).

Simpatria

Varias especies de *Hyaella* son consideradas simpátricas ya que se encuentran habitando el mismo cuerpo de agua (da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a, 2009; da Silva Castiglioni & Bond Backup, 2008b; González et al., 2006; Wellborn & Cothran, 2004; Witt & Hebert, 2000). Las especies con sobreposición de distribución que tienen hábitos o morfología similares a menudo explotan diferentes recursos, presentando una diferenciación de nicho, o están activos en diferentes momentos, o deben mostrar diferencias morfológicas o de comportamiento (Odum, 1988). Tanto para el caso de *Hyaella castroi* Gonzalez et al. 2006 y *Hyaella pleoacuta* Gonzalez et al. 2006, como para *Hyaella gauchensis* Streck & Castiglioni, 2017 y *Hyaella sp.*, especies simpátricas estudiadas en el sur de Brasil, la coexistencia de las mismas es facilitada por diferencias de tamaño y estrategias reproductivas como la duración del período embrionario, y la cantidad y tamaño de huevos producidos (da Silva Castiglioni et al., 2020; da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a, 2008b, 2009).

Reproducción, desarrollo e historia de vida

Son individuos dioicos con dimorfismo sexual marcado, los machos tienen los segundos gnatopodos unas quince veces más grande que las hembras y los utilizan en el apareamiento (Fig.2). En algunas poblaciones de *Hyaella azteca* Saussure, 1858 se ha observado que el tamaño del apéndice puede influir en el éxito reproductivo (da Silva Castiglioni & Bond Backup, 2008a).

La maduración sexual en las hembras es visible externamente, por la presencia del marsupio y porque los ovarios maduros se tornan de color verde oscuro. En el caso de los machos, la maduración sexual está determinada por el alargamiento completo del propodito del segundo par de gnatopodos (Nelson & Brunson, 1995). El apareamiento incluye competición intrasexual por el acceso a la cópula, selección directa e indirecta en

la preferencia de las hembras y uso de canales sensoriales (Wellborn & Bartholf, 2005) 2007). La hembra está disponible para la cópula sólo durante un corto periodo en su ciclo de muda (Wen, 1993). Debido a esta limitación temporal para la fertilización de los huevos, los anfípodos desarrollaron un comportamiento de cuidado o vigilancia de la pareja previo a la cópula. El surgimiento del comportamiento pre copulatorio o amplexo (Fig.2) a través de la liberación de feromonas, es el indicador más preciso de que machos y hembras se encuentran aptos para la reproducción. Este comportamiento tiene una fase de búsqueda activa de la hembra por parte del macho, luego de la cual, éste se posiciona en la parte dorsal de la hembra sujetándose del tegumento de la región torácica con los gnatopodos. Mientras el macho transporta a la hembra durante varios días, ésta muda y al mismo tiempo los óvulos son liberados al marsupio donde son fertilizados. Los machos interrumpen el apareamiento poco después de la fertilización y las hembras no almacenan el esperma.

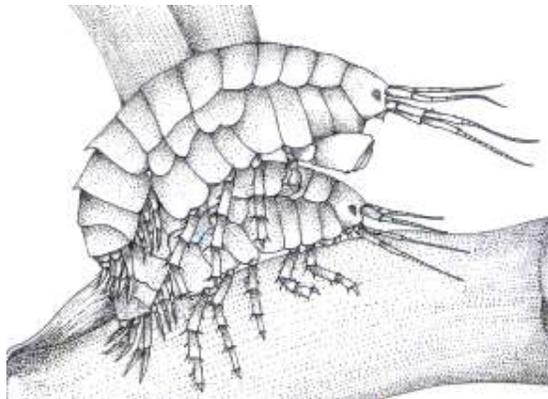


Fig.2. Macho (superior) y hembra (inferior) en pre-cópula.

Fuente: Wellborn & Cothran, 2007.

El desarrollo es directo y puede ser dividido en dos etapas: 1) de ovulación a eclosión: período embrionario y 2) de eclosión a emergencia de la prole: período postembrionario (Borowsky, 1991). Ocurre dentro del marsupio, bolsa formada por estructuras superpuestas llamadas oostegitos que se localizan sobre el lado interno de la coxa de los pereopodos 2 al 5. Esta cámara incubatriz le otorga a los embriones y a los juveniles marsupiales protección contra la depredación, existiendo una predisposición a producir menos embriones, pero más grandes, en comparación con las especies que no muestran ningún cuidado por su descendencia (da Silva Castiglioni, 2007a). Los juveniles son liberados al medio antes o durante la siguiente muda de la hembra, terminando así el

cuidado parental, aunque en algunas especies este cuidado se extiende denominándose cuidado parental prolongado representando un costo para los progenitores que se ve resarcido con el aumento de crecimiento y sobre vivencia de la prole (Thiel, 1999). Sainte-Marie (1991) sugiere que las poblaciones de anfípodos, entre ellos el género *Hyalella* presentan dos tipos básicos de historia de vida: pueden ser semélparos (un sólo evento reproductivo durante el ciclo vital), o iteróparos (varios eventos reproductivos durante la vida del organismo). A su vez, los ciclos de vida pueden ser semianuales (varias generaciones en un año), anuales (una generación por año), bienales (una generación cada dos años), o perennes (una generación cada varios años). El patrón reproductivo suele relacionarse con la latitud: las especies que habitan en latitudes altas se caracterizan, generalmente, por presentar ciclos bienales o perennes, tamaño corporal grande, madurez sexual tardía y uno o pocos eventos reproductivos, donde se producen embriones relativamente grandes. Las especies de latitudes bajas, en cambio, presentan ciclos semianuales o anuales, tamaño pequeño, alto potencial reproductivo, y producen embriones pequeños varias veces durante su ciclo vital.

Dinámica poblacional y factores ambientales

La mayoría de los trabajos sobre la dinámica poblacional de *Hyalella* se realizaron analizando las variaciones en densidad, biomasa y producción secundaria a lo largo de un año (Casset et al., 2001; da Silva Castiglioni et al., 2016; da Silva Castiglioni & Bond Buckup, 2008b; Colla & César, 2019). Para *Hyalella azteca* se registró a la temperatura como el factor más importante que afecta el crecimiento poblacional, reproducción y mortalidad de poblaciones naturales (Cooper, 1965; Lindeman & Momot, 1983; Edwards & Cowel, 1992). A su vez, estudios realizados en *H. curvispina* y *H. sp* en Argentina registran un aumento de la densidad poblacional relacionada con un aumento de la biomasa de macrofitas presentes en el hábitat (Casset et al., 2001). La cobertura vegetal y la densidad de las raíces de la capa flotante tienen un efecto negativo sobre la concentración de oxígeno en el área de las raíces (Poi de Neiff & Carignan, 1997), generando condiciones favorables para el género *Hyalella*, ya que son organismos medianamente tolerantes a bajos valores de oxígeno disuelto (Correa-Araneda et al., 2010).

Por otra parte, estudios con dos especies del complejo *Hyalella azteca*, mostraron que en lugares con presencia de peces, los anfípodos tienen un tamaño corporal menor y alcanzan

la madurez sexual más temprano en su desarrollo en comparación con otras poblaciones, debido a la presión selectiva que se ejerce sobre la población. En los charcos cuyos principales depredadores son los invertebrados acuáticos que se alimentan de organismos más pequeños, las *Hyaella* tienden a crecer más y alcanzar la madurez sexual en un tamaño mayor, siendo el riesgo de ser devorados mucho menor (Wellborn & Cothran, 2004).

Bioindicadores

Distintas especies de *Hyaella* son utilizadas como bioindicadores de condiciones ambientales y de contaminación (Casset et al., 2001). Presentan una serie de características que los tornan adecuados para la realización de bioensayos: son colectados con facilidad, se encuentran en altas abundancias, son fácilmente mantenidos en el laboratorio, presentan un ciclo de vida corto y gran sensibilidad a contaminantes (Sampaio, 1988). Aspectos como las estrategias reproductivas, así como respuestas conductuales en la alimentación, locomoción y comportamiento pre-cópula pueden demostrar cambios frente a la toxicidad de determinado ambiente y son importantes para la interpretación de datos en estudios sobre bioindicadores o para el desarrollo de estudios ecotoxicológicos (Rinderhagen et al., 2000). Se han realizado múltiples ensayos utilizando a *H. curvispina* como bioindicador en estudios sobre toxicidad (Anguiano et al., 2012; Bouvier & Muniz, 2021; Mugni et al., 2013; Peralta & Grosso, 2009). A su vez, en Norteamérica *Hyaella azteca* es un organismo estándar en bioensayos (Casset et al., 2001).

Origen y distribución del género *Hyaella*

La distribución del género *Hyaella* se restringe al continente americano, extendiéndose desde el Sur de la Patagonia hasta la región central de Canadá. Es el único género de anfípodos epigeos presente en ambientes dulceacuícolas de Sudamérica y es el más diverso en América del Norte donde convive con el género *Gammarus* (Casset et al., 2001).

De acuerdo con Bueno et al., (2014), el origen del género se encontraría a partir de un ancestro marino que vivió en la era Mesozoica en el mar de Tétis, localizado entre las masas continentales de Laurasia y Gondwana. Ese organismo ancestral habría surgido en

aguas templadas y se habría desplazado hacia el Este en la costa de la región Norte de América del Sur (González & Watling, 2001). La invasión hacia el agua dulce habría ocurrido en la época de los grandes mares epicontinentales, dispersándose primero hacia América del Sur y luego hacia América Central y América del Norte, antes del cierre del Istmo de Panamá. Análisis moleculares sugieren que las especies del género *Hyaella* que se encuentran en América del Norte y Central se han diversificado antes del surgimiento del Istmo en el Mioceno Medio con un mínimo de 11 millones de años atrás (Witt & Hebert, 2000). La dispersión en América del Sur debió ocurrir antes de que ésta estuviese geológicamente formada (González & Watling, 2001). El surgimiento de la cordillera de los Andes y los períodos de glaciaciones subsecuentes serían los principales factores vicariantes de muchas poblaciones, especialmente aquellas localizadas en la región Sur y Este de América del Sur. Estudios moleculares recientes realizados en el lago Titicaca, el más antiguo de Sudamérica, cuya edad se presume entre los 2 y 3 millones de años, han logrado identificar al menos cinco linajes presentes cuya diversificación se dio entre 12 y 20 millones de años, cada linaje representa al menos una colonización independiente del lago (Adamowicz et al., 2018). Zapelloni et al. (2021) realizaron un análisis molecular más amplio, identificaron los mismos clados que Adamowicz et al. (2018) pero sugieren que los linajes presentes en el lago se habrían diversificado recientemente alrededor de 2 a 4 millones de años.

Recientemente, en el trabajo realizado por Cannizzaro & Berg (2022) sobre la diversificación de los anfipodos dulceacuícolas sugieren un origen de Gondwana (Australasia + América) para las familias Hyaellidae y Chiltoniidae. A su vez, estas familias constituyen un grupo monofilético que diverge de sus ancestros marinos durante la era Mesozoica en el período Cretácico (110 Ma \pm 30 Ma). Esto sugiere que el grupo ingresó al agua dulce relativamente temprano, en lugar de invasiones marinas geológicamente recientes, como se había planteado anteriormente, ocupando aguas dulces continentales antes de los gammaridos en el Cenozoico y al mismo tiempo que los crangonyctidos en el Mesozoico. A su vez, se plantea la necesidad de realizar análisis adicionales que utilicen un conjunto más diverso de taxones de los reinos Neártico y Neotropical para poder hacer inferencias sólidas sobre la biogeografía histórica de los linajes, ya que probablemente el género *Hyaella* representa un linaje mucho más antiguo en América del Norte de lo que se pensaba anteriormente.

De los Ríos-Escalante et al. (2012), estudiaron el patrón de distribución de 36 especies Sudamericanas mediante una aproximación panbiogeográfica, llegando a la conclusión

de que las mismas se distribuyen en cinco trazos: (1) Norte de los Andes al Lago Titicaca (*Hyaella dielaii*, *Hyaella meinerti*, *Hyaella dybowskii*, *Hyaella jelskii*, *Hyaella lubominsky*, y *Hyaella pauperocavae*); (2) Lago Titicaca (*Hyaella armata*, *Hyaella cuprea*, *Hyaella latinamus*, *Hyaella lucifugax*, *Hyaella montforti*, *Hyaella neveulemairei*, *Hyaella robusta*, *Hyaella tiwanaku*, *Hyaella simplex simplex*, y *Hyaella solida*); (3) andes centrales (*Hyaella fossamancinii* y *Hyaella kochi*); (4) pampas (*Hyaella bonariensis*, *Hyaella caeca*, *Hyaella castroi*, *Hyaella longispina*, *Hyaella montenegrinae*, *Hyaella pampeana*, *Hyaella pernix*, *Hyaella pseudoazteca*, y *hyaella warmingii*) y (5) subantártico (*hyaella araucana*, *hyaella costera*, *hyaella curvispina*, *Hyaella chiloensis*, *Hyaella falklandensis*, *Hyaella franciscae*, *Hyaella neonoma*, *Hyaella patagonica*, y *Hyaella simplex*). Encontrándose un único nodo en el Lago Titicaca correspondiendo a la intersección de los trazos 1; 2 y 3, mientras que los trazos 4 y 5 no presentan intersección.

Clasificación del género *Hyaella*

La clasificación de *Hyaella* ha pasado por diferentes modificaciones a lo largo del tiempo (Bueno et al., 2014). El género fue creado por Smith (1874) e inicialmente asignado a la familia Orchestidae. Stebbing (1900) en su revisión de los anfípodos de América Central lo transfirió a la familia Talitridae que luego, debido a la gran diversidad de organismos incluidos fue elevada a la categoría de superfamilia por Bulycheva (1957), denominándose Talitroidea. A su vez, Bulycheva (1957) creó dos nuevas familias Hyalidae y Hyaellidae, ésta última incluyendo a *Hyaella*. Posteriormente, Bousfield, (1996) realizó una revisión sistemática de la familia Hyaellidae y propuso la subdivisión del género en tres subgéneros: *Austrohyaella* (para las especies de los Andes y regiones del Sur de América del Sur), *Mesohyaella* (para las especies de la región noreste de América del Sur, (incluido Brasil) y *Hyaella* (para las especies de América del Norte y Central). Serejo (2004) realiza una revisión de la familia y el género pasa a formar parte de la familia Dogielinotidae subfamilia Hyallelinae. Más tarde, Lowry & Myers (2013) realizaron una nueva revisión de la taxonomía del orden Amphipoda, restableciendo la familia Hyallellidae integrada por un único género, *Hyaella*, que cuenta hasta con 97 especies descritas hasta el momento de terminar el manuscrito (Limberger et al., 2022; Marrón-Becerra & Hermoso-Salazar, 2022; Vernica & Peralta, 2022). La mayor diversidad del género se puede encontrar en lagos templados a lo largo del norte de

Estados Unidos, en el lago Titicaca (Perú y Bolivia) y en Brasil, regiones donde la taxonomía y distribución del género ha sido estudiado con más detalle (Reis et al., 2020). Para Norteamérica y el Caribe, el número de especies registradas es de 13 (Soucek et al., 2015). Para la región del lago Titicaca, se han registrado 21 especies, de las cuales 15 son endémicas, aunque el número real de especies no se ha establecido y podría ser mucho mayor (Jaume et al., 2021). En Brasil, se han registrado 38 especies, siendo la distribución de estas muy desigual, ya que la región sur es la mejor documentada con 20 especies registradas (Limberger et al., 2022; Talhaferro et al., 2021a). Para el resto de los países de Sudamérica, el número es menor, Argentina cuenta con 13 especies registradas, siendo *Hyaella curvispina* la más común y abundante; Chile con ocho especies, Venezuela con cuatro, Colombia con tres, Ecuador con dos y Uruguay con una especie registrada (Alonso & Jaume, 2017; De los Ríos Escalante et al., 2013)

Especies crípticas en *Hyaella*

En los últimos años y tras la incorporación de herramientas moleculares se reveló una alta prevalencia de especies crípticas, grupos de especies genéticamente diferentes pero imposibles, o muy difíciles, de distinguir morfológicamente, lo que mantiene oculta una gran diversidad biológica dentro de este género (Dionne et al., 2011; Duan et al., 2000; González & Watling, 2003a; M. Peralta & Grosso, 2009; Vergilino et al., 2012; Witt et al., 2006; Witt & Hebert, 2000). Las especies crípticas se agrupan formando “complejos de especies” que generalmente, como en el caso de *Hyaella*, ocupan la misma región geográfica y/o la misma cuenca hidrográfica (Rodrigues, 2016).

Para el género *Hyaella*, estudios moleculares han revelado la existencia del “complejo azteca” caracterizado morfológicamente por la especie *Hyaella azteca*, que abarca 33 especies de América del Norte, algunas de las cuales se distribuyen también en América Central y en el Norte de América del Sur (Adamowicz et al., 2018; Major et al., 2013; Vergilino et al., 2012; Witt et al., 2006; Witt & Hebert, 2000; Worsham et al., 2017).

González & Watling (2001) basándose en caracteres morfológicos, sugieren la existencia para el sur de América del Sur de otros dos complejos el “patagónico” y el “curvispina”. El “complejo patagónico” caracterizado por *Hyaella patagónica*, abarcaría especies que se encuentran en el extremo sur de América del Sur y otras que ocurren a lo largo de la Cordillera de los Andes. El “complejo curvispina” caracterizado por *Hyaella curvispina*, incluiría especies presentes en Uruguay, Argentina y sur de Brasil.

La tradicional identificación taxonómica basada en caracteres morfológicos ha sido, y sigue siendo, la más empleada por los taxónomos para describir e identificar especies. Sin embargo, y dado que la especiación no siempre va acompañada de cambio morfológico, el uso exclusivo de estos caracteres puede conllevar a una subestimación de la biodiversidad real (Bickford et al., 2007). Cuando el uso de caracteres morfológicos no es suficiente para la delimitación de las especies, la obtención de datos moleculares se convierte en una importante herramienta. Este es el caso de las especies del género *Hyaella*, por lo que para su estudio se hace necesaria la integración de datos genéticos y morfológicos.

Filogenia molecular en el género *Hyaella*

Diversos trabajos sobre filogenia, identificación de especies crípticas y simpátricas en América del Norte fueron realizados utilizando principalmente y casi de forma exclusiva la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), ya sea de forma parcial o completa (Adamowicz et al., 2018; Major et al., 2013; Vergilino et al., 2012; Wellborn & Broughton, 2008; Witt et al., 2003; Witt & Hebert, 2000; Worsham et al., 2017), en menor medida se ha utilizado el gen mitocondrial 16S y el gen nuclear 28S (Adamowicz et al., 2018; Witt et al., 2006; Zapelloni et al., 2021).

Witt & Hebert (2000) utilizando secuencias parciales del gen COI revelaron la existencia de al menos siete especies crípticas consideradas morfológicamente como *H. azteca* y detectaron dos o más especies coexistiendo en más de la mitad de los hábitats relevados. Más tarde, Witt et al. (2006) a través de la secuenciación parcial de la COI (conocido como *Barcoding*) establecieron un umbral de selección de especies (SST, *Species Screening Threshold*) de 3.75% de divergencia, el cual les permitió identificar dos especies provisionales consideradas como *H. sandra* y 33 especies provisionales dentro de *H. azteca*, las cuales formaron grupos monofiléticos con alto apoyo estadístico. Hasta el momento, ninguna de estas especies ha sido descrita, probablemente (?) debido a la falta de taxónomos. Se estima que hay al menos 500 nuevas especies de *Hyaella* por descubrir solo en América del Norte, lo que haría que el género sea el más abundante entre los anfípodos de agua dulce de la región (Vainola et al., 2008).

Adamowicz et al. (2018) realizaron la primera caracterización molecular de especies de *Hyaella* del lago Titicaca, utilizando secuencias de COI y 28S, e incluyendo además, muestras de lagos conectados con el Titicaca y muestras de otros sitios de América del

Sur. Se registraron al menos cinco linajes evolutivamente distantes presentes dentro del lago Titicaca, los cuales se encuentran dispersos en la filogenia de las *Hyalella* sudamericanas. A su vez los resultados indican que el complejo del lago Titicaca es polifilético con una historia geográfica compleja. Jurado-Rivera et al. (2020) abordaron el estudio de la diversidad de especies de *Hyalella* del Altiplano Andino utilizando secuencias de COI y la implementación de diferentes criterios de delimitación de especies, mPTP (Kapli et al.,2017), GMYC (Pons et al.,2006) y ABGD (Puillandre et al.,2012). En este estudio se registraron cinco linajes para el Altiplano Andino, de los cuales uno (clado D) es endémico del Altiplano, mientras que el resto, ocurre también en otras regiones de América del Sur. A su vez, los distintos criterios de delimitación de especies identificaron 30, 34 y 56 posibles especies nuevas, respectivamente. Considerando un patrón de delimitación de especies conservador redujeron el número de entidades moleculares a 36 para América del Sur, mientras que 11 ocurren exclusivamente en el Altiplano Andino. Detectaron un notable desacuerdo entre la morfología y los datos genéticos, ocurriendo en varios casos que la misma morfoespecie correspondía a varias Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares (MOTU), en algunos con parentesco lejano y en otros, en los que una MOTU en particular es compartida por una variedad morfológicamente heterogénea de especies. Continuando en la línea de trabajos realizados en el lago Titicaca y en el Altiplano Andino, Zapelloni et al. (2021) centró su estudio en las 36 entidades moleculares de *Hyalella* utilizando mitogenómica, ADN ribosómico nuclear y secuencias de genes nucleares, obteniendo como resultado que los linajes sudamericanos del Mioceno se han diversificado recientemente en el lago Titicaca (Plioceno tardío o Pleistoceno temprano) con una destacada convergencia morfológica. Por lo tanto, la información sobre la historia evolutiva y distribución del género, y su uso en la conservación y preservación de los ecosistemas de agua dulce en este continente aún es escasa y poco explorada.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El género *Hyalella* se encuentra en un estado de conocimiento incompleto, ya que se compone de taxones con una elevada complejidad, con variaciones morfológicas interespecíficas e interpoblacionales muy sutiles, dificultando su identificación y

diferenciación (Charqueño-Celis et al., 2012). La mayoría de los estudios realizados en el género tratan de nuevas descripciones basadas exclusivamente en caracteres morfológicos y muy pocos en estudios genéticos y sobre la historia de vida.

La mayoría de los trabajos realizados sobre el género se refieren a *H. azteca*, especie ampliamente distribuida en América del Norte, América Central y el norte de Sudamérica hasta Venezuela (De los Ríos Escalante et al., 2013; González & Watling, 2002a). Esta especie ha sido objeto de numerosos estudios en ecología poblacional (Strong, 1972; Edwards & Cowell, 1992), selección sexual, reproducción y ciclo de vida (Kruschwitz, 1978; Othman & Pascoe, 2001), y principalmente, en bioensayos de supervivencia a distintos tipos de stress ambiental y estudios de toxicología (Pilgrim & Burt, 1993; Johanif et al., 2021).

En América del Sur el trabajo más amplio sobre clasificación fue realizado por González (2001) en su tesis de doctorado. El autor analizó ejemplares provenientes de distintos puntos de América del Sur y estudió la sistemática basada en la morfología y algunos aspectos del género describiendo nueve especies nuevas y redescubriendo otras 35. También consideró más de 13 especies como *nomen dubium* por ser especies con descripciones antiguas y con ilustraciones poco informativas. A su vez, el material tipo de muchas de esas especies se encuentra perdido, lo que dificulta la validación de esos taxones.

Se han realizado estudios sobre taxonomía, filogenia y biogeografía de *Hyaella* para Brasil (Zimmer, 2007; Cardoso, 2013; Rodrigues, 2016) y sobre historia de vida de diferentes poblaciones de Brasil y de Argentina (Castiglioni, 2007; Rodrigues, 2011; Torres, 2012; Colla, 2015). A pesar de las grandes reservas de agua dulce y de la abundancia de *Hyaella*, en nuestro país no se han realizado estudios taxonómicos ni ecológicos del género, sólo se cuenta con el registro de la especie *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 para Montevideo (Shoemaker, 1942) y un trabajo realizado sobre esta misma especie por Bouvier & Muniz (2021), en el que se estudian las respuestas comportamentales para la detección de toxicidad en el sedimento.

La sugerencia de complejos de especies crípticas para Sudamérica (González, 2001) específicamente el “complejo curvispina” para Uruguay hace necesaria la realización de estudios morfológicos y moleculares para dilucidar la diversidad de especies presentes en nuestro país, lo que será una gran herramienta para comprender mejor su diversidad, así como ayudar a preservar los únicos anfípodos epigeos de agua dulce en la región (¿).

HIPÓTESIS

- La diversidad de anfípodos dulceacuícolas de Uruguay se encuentra subestimada y esta enmascarada en forma de especies crípticas.
- Las especies de *Hyaella* de Uruguay son parte del “complejo curvispina” y forman un grupo monofilético.
- La estructura y los aspectos reproductivos de *Hyaella curvispina* presentan patrones similares a las poblaciones de *Hyaella* del Sur de Brasil.

OBJETIVO GENERAL

Ampliar el conocimiento del género *Hyaella* para Uruguay a partir de datos morfológicos y moleculares, y establecer la estructura y dinámica poblacional de la población tipo de *Hyaella curvispina*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a nivel morfológico las especies de *Hyaella* presentes en Uruguay.
- Confirmar la existencia del “complejo curvispina” en Uruguay.
- Delimitar especies a nivel molecular.
- Estimar la filogenia de las especies uruguayas y ubicarlas en el contexto filogenético del género.
- Describir nuevas especies del género.
- Realizar una clave dicotómica para las especies de *Hyaella* del Uruguay.
- Analizar aspectos poblacionales, estructura, proporción sexual, relaciones de tamaño y periodo reproductivo para la población de *Hyaella curvispina*.

Esta tesis se encuentra ordenada en cuatro capítulos. El capítulo 1 se centra en el relevamiento del género *Hyaella* para el Uruguay y en la identificación de las especies y morfos basada en caracteres morfológicos. El capítulo 2 trata sobre la diversidad

molecular de *Hyaella* para el Uruguay, la delimitación de especies crípticas dentro del “complejo curvispina” y la inferencia de la filogenia de las *Hyaella* uruguayas dentro del contexto filogenético propuesto para el grupo. En el capítulo 3, se describen dos nuevas especies de *Hyaella* y se realiza una clave dicotómica para la identificación de las especies en Uruguay. Por último, el capítulo 4 aborda aspectos ecológicos de una población *Hyaella curvispina* en la que se analizaron estructura poblacional, período reproductivo, tamaño corporal, proporción sexual y fecundidad.

Cabe destacar que esta tesis es pionera en el estudio del género *Hyaella* para el Uruguay y en el estudio molecular del “complejo curvispina” previamente caracterizado a nivel morfológico para el Este de los Andes. Ampliar el conocimiento de las especies es fundamental para programas de conservación de los ecosistemas de agua dulce ya que estos organismos son endémicos e indicadores biológicos de calidad ambiental.

DIVERSIDAD MORFOLÓGICA DEL GÉNERO *HYALELLA* (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE) PARA EL URUGUAY

INTRODUCCIÓN

Hyaella curvispina es la única especie de anfípodos dulceacuícolas epigeos citada para el Uruguay. Fue descrita inicialmente por Shoemaker en 1942 para la localidad tipo Paso de la Arena, Montevideo, y su descripción ha sido debatida hasta hace unos años. de Oliveira, (1953) describió *H. curvispina* forma *cangallensis* (Scheloenberg) debido a la presencia de una sola seta curva en la rama interna del uropodo 1. Posteriormente, Stock & Platvoet (1991) consideraron que la descripción de de Oliveira (1953) no fue atribuible a *H. curvispina* debido al grosor de los palpos del maxilar superior y a la presencia de una o dos setas curvas en el uropodo 1. Más recientemente, Grosso & Peralta, (1999) redescubrieron la especie con base en material chileno, pero pocos años después, González & Watling, (2003b) consideraron que este taxón corresponde a *H. simplex* debido a la presencia de branquias esternas en los segmentos 3 a 7 mientras que en *H. curvispina* están presentes en los segmentos 2 a 7.

Debido a la complejidad morfológica que presentan las especies de este género, González & Watling (2001) sugirieron la existencia de complejos de especies crípticas, es decir, grupos de especies con variaciones morfológicas sutiles y cuya distribución geográfica se asocia a las grandes cuencas fluviales de la región. Para América del Sur se propusieron tres complejos: el "azteca" endémico del lago Titicaca, el "patagónico" distribuido al extremo sur de América del Sur y el "curvispina" localizado al este de los Andes, caracterizados morfológicamente por *Hyaella azteca*, *Hyaella patagonica* y *Hyaella curvispina* respectivamente (Grosso & Peralta, 1999). Las características morfológicas diagnósticas del "complejo curvispina" incluyen una superficie corporal lisa, la presencia de seta curva en la rama interna del uropodo 1 y branquias esternas presentes en los segmentos 2 a 7. Las especies que comparten estas características con *H. curvispina* y que habitan al este de los Andes son: *H. pampeana* Cavalieri, 1968; *H. brasiliensis* Bousfield, 1996; *H. rionegrinae* Grosso & Peralta, 1999; *H. castroi* González et al., 2006; *H. bonariensis* Dos Santos et al., 2008; *H. gauchensis* Streck Marx et al., 2017; *H. giorginae* Streck Marx et al., 2017; *H. catariensis* Reis et al., 2020; *H. rioatensis* Reis et

al., 2020; *H. lagoana* Talhaferro et al., 2021a; *H. minuana* Talhaferro et al., 2021 y *H. sambaqui* Talhaferro et al., 2021a. Todas ellas, excepto *H. rionegrinae* han sido registradas para la región Sur de Brasil, lugar donde se ha reportado la mayor diversidad del género con 19 especies citadas hasta el momento (Talhaferro et al., 2021a).

En Uruguay existe un total desconocimiento del género, a pesar de que se cuenta con una extensa y ramificada red hidrográfica, así como un cordón de lagunas costeras y numerosos lagos artificiales de diverso tipo y tamaño (Conde et al., 2002); presentando variedad de microhábitats que albergan un elevado número de ejemplares de *Hyalella*.

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es realizar un relevamiento del género *Hyalella* para el Uruguay e identificar las especies en base al análisis de caracteres morfológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de ejemplares

El material analizado proviene de 107 sitios del Uruguay y corresponde a material presente en la Colección Científica de la Sección Entomología de la Facultad de Ciencias; aportado por proyectos de Limnología de Facultad de Ciencias y material recolectado en distintas campañas (Fig. 3). Para la recolecta de ejemplares, los lugares se seleccionaron a partir de la revisión del material depositado en la Colección científica de la Sección Entomología de FC, y del material aportado por proyectos de Limnología de FC, priorizando aquellos Departamentos con vacío de información. Los ambientes acuáticos muestreados fueron ecosistemas lénticos y lóticos que se seleccionaron en base a su ubicación geográfica y origen (asociados a los principales cursos de agua dulce de cada departamento). Todos los sitios tienen su localización geográfica determinada por el Sistema de Posicionamiento Global (GPS) (Tabla I).

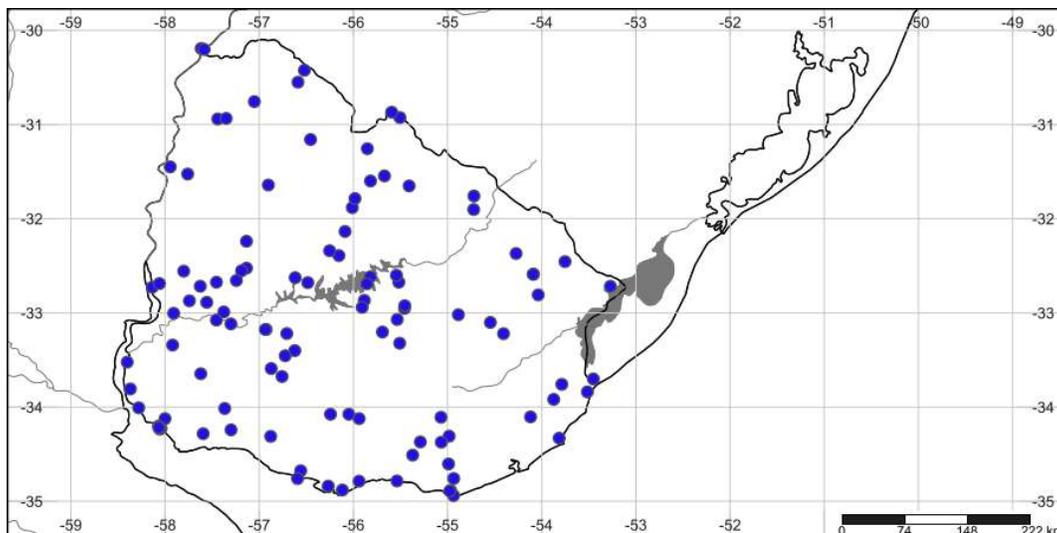


Figura 3. Mapa de los sitios muestreados en Uruguay.

Tabla I. Sitios de muestreo en Uruguay, ubicación por Departamento con sus respectivas coordenadas geográficas (GPS) e identificación de los sitios donde se recolectaron ejemplares de *Hyaella*.

Número del sitio	Departamento	Latitud	Longitud	Recolección de <i>Hyaella</i>
1	San José	34°45'58.6"	56°23'53.5"	SI
2	San José	34°40'33.8"	56°33'35.6"	SI
3	San José	34°45'58"	56°53'23"	SI
4	San José	34°18'39"	56°52'42"	SI
5	Montevideo	34°50'22"	56°16'03"	SI
6	Montevideo	34°52'50"	56°07'03"	SI
7	San José	34°18'54.1"	54°59'01.9"	SI
8	Durazno	33°38.8'79"	56°53.6'66"	SI
9	Lavalleja	34°30.4'36"	55°22.3'14"	SI
10	Lavalleja	34°06'47.6"	55°04'19.7"	SI
11	Lavalleja	34°22.4'71"	55°5.0'53"	SI
12	Lavalleja	34°21.9'99"	55°17.0'36"	SI
13	Cerro Largo	32°44.0'84"	53°15.3'05"	SI
14	Río Negro	32°43.2'02"	57°37.1'35"	SI
15	Salto	31°25.8'58"	57°55.7'42"	SI

16	Florida	34°3.6'33"	56°2.3'54"	SI
17	Durazno	33°12.8'76"	55°41.4'85"	SI
18	Tacuarembó	32°39.5'43"	56°28.7'03"	SI
19	Tacuarembó	32°23'49.4"	56°09'26"	SI
20	Tacuarembó	32°36.9'22"	55°49.7'78"	SI
21	Durazno	33°3.7'13"	55°32.1'07"	SI
22	Maldonado	34°45'28.7"	54°56'4.1"	SI
23	Rocha	34°19'48.7"	53°48'54.3"	SI
24	Rocha	33°50'18.5"	53°30'54.7"	SI
25	Colonia	34°14'30.2"	57°17'58.7"	SI
26	Colonia	34°0'51.6"	57°22'0.3"	SI
27	Soriano	33°38'44.6"	57°37'14.6"	SI
28	Soriano	33°48'26.1"	58°22'6.3'	SI
29	Colonia	34°0'27.4"	58°16'46.3"	SI
30	Colonia	34°7'22"	58°00'1.9"	SI
31	Colonia	34°16'56.9"	57°35'43.6"	SI
32	Tacuarembó	31°47'16.8"	55°58'59.6"	SI
33	Tacuarembó	31°52'55.7"	56°00'42.7"	SI
34	Tacuarembó	32°8'5.5"	56°05'20"	SI
35	Tacuarembó	31°35'57.9"	55°49'6.4"	SI
36	Tacuarembó	31°32'43.7"	55°40'13"	SI
37	Rivera	30°55'33.5"	55°30'21"	SI
38	Rivera	30°52'14.1"	55°35'59.1"	SI
39	Canelones	34°47'20.45"	55°56'39.2"	SI
40	Durazno	33° 27' 30"	56° 43' 42"	SI
41	Florida	34°04'54.8"	56°14'59"	SI
42	Durazno	33°35'44.5"	56°52'21"	SI
43	Canelones	34°07'35"	55°56'36"	SI
44	Salto	31°09'55"	56°27'31"	SI
45	Salto	31°38'53.5"	56°54'20"	SI
46	Maldonado	34°53'15.0"	54°58'06.0"	SI
47	Maldonado	34°47'07.0"	55°32'25.0"	SI
48	Maldonado	34°56'36.0"	54°56'20.0"	SI

49	Maldonado	34°53'44.0"	54°58'55.0"	SI
50	Paysandú	32°31'48.0"	57°08'12.0"	SI
51	Colonia	34°13'59.0"	58°02'53.0"	SI
52	Colonia	34°12'12.0"	58°04'13.0"	SI
53	Río Negro	33°31'34.5"	58°24'10.4"	SI
54	Colonia	34°14'03.0"	58°03'38.0"	SI
55	Colonia	34°13'37"	58°03'57"	SI
56	Paysandú	32°33'19.0"	57°11'26.0"	SI
57	Paysandú	32°14'36.0"	57°08'12.0"	SI
58	Paysandú	32°39'34.0"	57°14'56.0"	SI
59	Rocha	34°06'24.9"	54°07'13.4"	SI
60	Rocha	33°45'50.1"	53°47'23.3"	SI
61	Rocha	33°55'08.6"	53°52'39.7"	SI
62	Paysandú	32°43'36"	58°08'07"	SI
63	Paysandú	32°41'31.0"	58°03'58.0"	SI
64	Maldonado	34°36'24.0"	54°59'38.0"	SI
65	Artigas	30°11'54.6"	57°37'00.0"	SI
66	Artigas	30°12'16.0"	57°35'11.2"	SI
67	Durazno	33°10'54.0"	56°55'59.0"	SI
68	Durazno	33°10'58.0"	56°56'06.0"	SI
69	Soriano	33°04'57.2"	57°27'30.9"	SI
70	Soriano	33°07'01.5"	57°18'07.3"	SI
71	San José	34°45'56.4"	56°35'58.1"	SI
72	Durazno	33°00'27.9"	56°42'43.5"	SI
73	Durazno	32°57'13.5"	55°27'45.1"	SI
74	Durazno	32°52'02.9"	55°53'06.7"	SI
75	Tacuarembó	32°56'46.4"	55°54'42.1"	SI
76	Tacuarembó	32°55'43.7"	55°27'27.8"	SI
77	Tacuarembó	32°52'30.3"	57°44'50.6"	SI
78	Río Negro	32°40'43.0"	57°27'27.6"	SI
79	Durazno	33°19'33.0"	55°30'51.9"	SI
80	Tacuarembó	32°59'39.3"	57°22'59.7"	SI
81	Durazno	32°40'45.9"	55°31'06.3"	SI

82	Durazno	32°36'09.4"	55°32'57.3"	SI
83	Rivera	31°15'38.4"	55°51'11.3"	SI
84	Soriano	33°20'50.1"	57°55'21.5"	SI
85	Flores	33°40'50.6"	56°45'48.8"	SI
86	Flores	33°24'01.4"	56°37'32.1"	SI
87	Durazno	32°37'58.1"	56°37'10.7"	SI
88	Durazno	32°20'40.2"	56°15'14.5"	SI
89	Cerro Largo	32°35'26.0"	54°05'26.0"	NO
90	Cerro Largo	32°33.4'94"	57°48.1'74"	NO
91	Cerro Largo	32°35'26"	54°05'26"	NO
92	Cerro Largo	32°48'31"	54°02'14"	NO
93	Treinta y Tres	33°06'05"	54°32'43"	NO
94	Salto	31°31'54.6"	57°45'6.5"	NO
95	Treinta y Tres	33°01'17.7"	54°53'12.2"	NO
96	Rivera	31°45'51.3"	54°43'20.4"	NO
97	Artigas	30°56'46.2"	57°26'43.7"	NO
98	Artigas	30°56'12.3"	57°21'07.5"	NO
99	Cerro Largo	32°22'15.7"	54°16'35.6"	NO
100	Artigas	30°25'43.4"	56°31'22.5"	NO
101	Artigas	30°45'39.2"	57°03'10.5"	NO
102	Treinta y Tres	33°13'24.6"	54°24'35.1"	NO
103	Cerro Largo	32°27'34.9"	53°45'16.9"	NO
104	Rivera	31°54'14.9"	54°43'37.2"	NO
105	Rivera	31°39'10.2"	55°24'50.4"	NO
106	Cerro Largo	32°41'50.5"	55°51'42.1"	NO
107	Artigas	30°33'02.2"	56°35'32.2"	NO

La recolecta fue realizada entre los meses de marzo y junio durante los años 2016, 2017 y 2018. Se muestrearon todos los microhábitats dentro de cada sitio de muestreo incluyendo diferentes profundidades, distancia del margen y presencia o ausencia de vegetación. Los ejemplares fueron recolectados con una red de agua con diámetro de 20 cm y malla de 250 µm con un esfuerzo de 1 persona durante 15-90 minutos dependiendo

del tamaño de cada sitio. En el sitio de recolecta las muestras fueron lavadas utilizando un tamiz de 3mm de malla para remover el sedimento más fino. La selección de los individuos fue realizada a simple vista (Stenert et al., 2004; Rodrigues, 2011). Los ejemplares de *Hyaella* fueron separados de los demás macroinvertebrados acuáticos y acondicionados en etanol 70%. A su vez, en cada sitio, se separaron 5 ejemplares que fueron depositados en alcohol 95% para posteriores estudios moleculares. Luego, el material fue trasladado al laboratorio de Entomología de la Facultad de Ciencias.

Determinación morfológica

La identificación taxonómica se realizó seleccionando cinco machos adultos de cada punto de muestreo, los que previo a la disección fueron teñidos durante 48 hs en Rosa de Bengala (Rodrigues, 2011) para facilitar la observación de los detalles morfológicos.

Utilizando una lupa binocular Olympus Premiere, se realizó la disección total de los ejemplares, los que fueron luego montados para su posterior observación bajo microscopio óptico Nikon BM2100. De acuerdo con Cardoso et al. (2011); Dos Santos et al. (2008) y González et al. (2006), los caracteres morfológicos que se tuvieron en cuenta en la identificación de las especies y/o morfos de *Hyaella* fueron: longitud de las antenas, morfología de las piezas bucales (setación de las maxilas 1 y 2; número de dientes en la *lacinia mobilis* de la mandíbula y morfología de los maxilípedos); forma, tamaño y setación de los gnatopodos y uropodos; número y disposición de las branquias coxales y esternales; y forma y número de setas del telson. La identificación de las especies y morfos se realizó mediante claves de identificación específicas y descripciones taxonómicas de Cardoso et al. (2011); Colla & César (2015); Dos Santos et al. (2008); González et al. (2006); Streck Marx & da Silva Castiglioni (2020) y Talhaferro et al. (2021a).

Las especies y/o morfos identificadas fueron dibujadas bajo cámara clara. Las imágenes fueron escaneadas y editadas a través de la aplicación Gimp 2.10.22 para posteriormente realizar su descripción. Como base para la descripción se consultó la bibliografía utilizada en la identificación taxonómica y para la terminología de las setas, el trabajo de Zimmer et al. (2009). Posteriormente, se acondicionó un ejemplar macho de los previamente identificados para ser fotografiados bajo microscopio electrónico de barrido (SEM). Para ello primero se le realizó punto crítico de secado (Leistikow, 2001), posteriormente,

fueron bañados en oro para luego disecarlos. Las partes disecadas fueron preparadas en tacos que luego se volvieron a bañar en oro para fotografiar.

Se seleccionaron 15 machos y 15 hembras de los identificados por especie y por morfo a los que se les midió la longitud del cefalotorax (LC), desde el extremo del rostro hasta la región posterior de la cabeza, de acuerdo con da Silva Castiglioni & Bond-Buckup (2008a), y el largo total (LT), desde el extremo del rostro hasta la base del telson de acuerdo con Marrón-Becerra et al. (2018). Para esto, fue utilizado un microscopio estereoscópico con un objetivo ocular complementado con un micrómetro de 0,1 mm de apreciación.

Análisis de datos

Mediante un análisis de varianza paramétrico (ANVA) (Zar, 2010), se compararon entre *H. curvispina* y los morfos las medidas del LC y del LT para machos y para hembras por separado, previa verificación de los supuestos de normalidad y de homogeneidad de varianzas, utilizando los tests de Shapiro – Wilk y Levene, respectivamente (Zar, 2010). En caso de no verificarse los supuestos del ANVA paramétrico, se utilizó el análisis de varianza no – paramétrico de Kruskal Wallis (Zar, 2010). Se relacionó el LC con el LT para machos y para hembras a través del coeficiente de correlación de Pearson (r) (Zar, 2010). Para el análisis de datos se utilizó la aplicación PAST versión 4.03 (Hammer et al., 2001) y en todos los casos se utilizó un $p = 0,05$.

RESULTADOS

Determinación morfológica

Se encontraron individuos de *Hyaella* en 88 de los 107 sitios muestreados y se analizaron 440 ejemplares. Se identificó a *H. curvispina* en 80 sitios y 9 morfos similares a ella en los 8 sitios restantes y sólo en la localidad de Aguas Blancas, Lavalleja, coexistiendo con el morfo H4 (ver más adelante).

***H. curvispina* Shoemaker, 1942**

Localidad tipo: Uruguay, Montevideo, Paso de la Arena (34°50'22"S 56°16'3"W) arroyo Pantanoso.

Material examinado: Macho adulto, Talla: (LC): largo cefalotórax 0,8mm, (LT): largo total 9mm. CCSEFC 383. Col: A. Waller & cols. Paratipos: 15 hembras, 14 machos. Mismos datos de colecta del holotipo.

Diagnosis enmendada:

Superficie corporal lisa. Antena 1 más corta que antena 2. Ojos pigmentados circulares y bien delimitados. Mandíbula con proceso molar desarrollado y de tres a cinco setas plumosas entre el molar y el proceso incisivo. Maxila 1 con lóbulo externo provisto de nueve setas serradas, con un pliegue longitudinal medio semejante a un aguijón que llega hasta el palpo, lóbulo interno con dos setas plumosas terminales bien desarrolladas. Maxila 2 con lóbulos sub iguales, lóbulo interno con diez setas papposerradas dispuestas en dos filas y con dos setas plumosas en el extremo interno; lóbulo externo con dos filas de setas simples cortas y largas. Gnatopodo 1, placa coxal más alta que ancha, propodo con borde palmar recto y provisto de finos denticulos, cara externa con diez setas simples cortas y largas próximas al borde palmar. Cara interna del propodo con una fila oblicua de cinco setas serradas. Gnatopodo 2, coxa más alta que ancha, propodo ovado con el borde palmar regularmente convexo, área del ángulo palmar notablemente sobresalida con denticulos "comb scale" con tres setas cuspidadas. Pereiopodos 3 y 4, margen posterior del mero y carpo con un grupo de entre dos y tres setas simples; margen posterior del propodo con dos setas simples. Uropodo 1, rama interna del macho con una seta curva en el margen interior. Uropodo 3, con el pedúnculo más largo que la rama externa con seis setas cuspidadas, dos largas y cuatro cortas; extremo apical de la rama externa con un grupo de entre cuatro y seis setas simples y dos setas cuspidadas. Telson cuadrangular, aboveado, con dos grupos de dos setas cuspidadas con seta accesoria en el extremo superior. Branquias esternales tubulares presentes en segmentos 2 a 7.

Descripción enmendada

Macho CCSEFC 383 (Fig. 4a y 5a) Talla (LC): 0,8 (LT): 9 mm . Variación: Paratipos:15
Talla media \pm desvío estándar: (LC): $0,8 \pm 0,1$ mm (LT): $9 \pm 1,3$ mm .

Superficie corporal lisa. Placas epimerales lisas y acuminadas. Coxa 1 a 4 sub iguales en tamaño y forma contiguas. Ausencia de acuminación en las coxas. Coxa 1 similar a la 2 y a la 3. Coxa 4 más ancha que las anteriores. Coxa 5 y 6 más anchas que largas excavadas ventralmente. Coxa 6 más pequeña que las anteriores. Cabeza más pequeña que el primer y segundo segmento torácico, rostro ausente. Ojos pigmentados, medianos, ovoides y localizados detrás de la inserción de las antenas 1 y 2.

Antena 1 (Fig. 4c) más corta que la antena 2; segmento 1 del pedúnculo de similar longitud que el segmento 2 y 3 con una seta cuspidada y escasas setas simples distales; segmento 2 y 3 con setas simples distales; flagelo de once antenitos con setas simples terminales y una seta plumosa en el extremo del último antenito. “Aesthetascs” (Fig. 4b y 5b) presentes desde el antenito 4 hasta el extremo distal.

Antena 2 (Fig. 4d) más larga que la antena 1; pedúnculo delgado más largo que la cabeza con escasas setas simples distales, articulo 4 más corto que el artículo 5 del pedúnculo; flagelo con trece antenitos, más largo que el artículo 5 del pedúnculo.

Labro (Fig. 4e y 5c) redondeado con borde anterior piloso.

Mandíbula (Fig. 4f y 5d) mandíbula básica de anfípodo (de acuerdo a Watling, 1993); ambas mandíbulas bien desarrolladas; sin palpo; incisivo dentado, con tres setas plumosas entre el incisivo y el proceso molar; *lacinia mobilis* izquierda tricuspidada.

Labio inferior (Fig. 4g y 5e) con lóbulos rectangulares de bordes redondeados, más largos que anchos con pilosidad en el borde interno y terminal.

Maxila 1 (Fig. 4h y 5f) lóbulo externo en su mitad proximal provisto de un pliegue donde nace el palpo, con nueve setas serradas, con un pliegue longitudinal medio semejante a un agujijón que llega hasta el palpo; lóbulo interno con dos setas plumosas terminales bien desarrolladas; palpo corto, unisegmentado, con una seta simple más larga que el resto.

Maxila 2 (Fig. 4i y 5g) lóbulos subiguales, lóbulo interno con diez setas papposerradas dispuestas en doble fila y dos setas plumosas dispuestas en el extremo interno; lóbulo externo con dos filas de setas simples cortas y largas.

Maxilipedo (Fig. 4j y 5h) lóbulo interno provisto de tres setas cuspidadas y cinco setas papposas dispuestas en dos filas en el borde superior y dos filas de entre cinco y seis setas papposas una de ellas sobre el borde interno; lóbulo externo más corto que el extremo del primer segmento del palpo, con setas cuspidadas en el borde distal y hasta más de la mitad del margen interno; palpo con 3 segmentos, el 2do y el 3ro con el borde interno expandido y una serie de setas simples; borde distal externo del 2do segmento con dos setas simples y largas y del 3er segmento con diez setas simples y una plumosa; 4to segmento más corto que el 3ro con setas simples y una seta terminal más fuerte y larga.

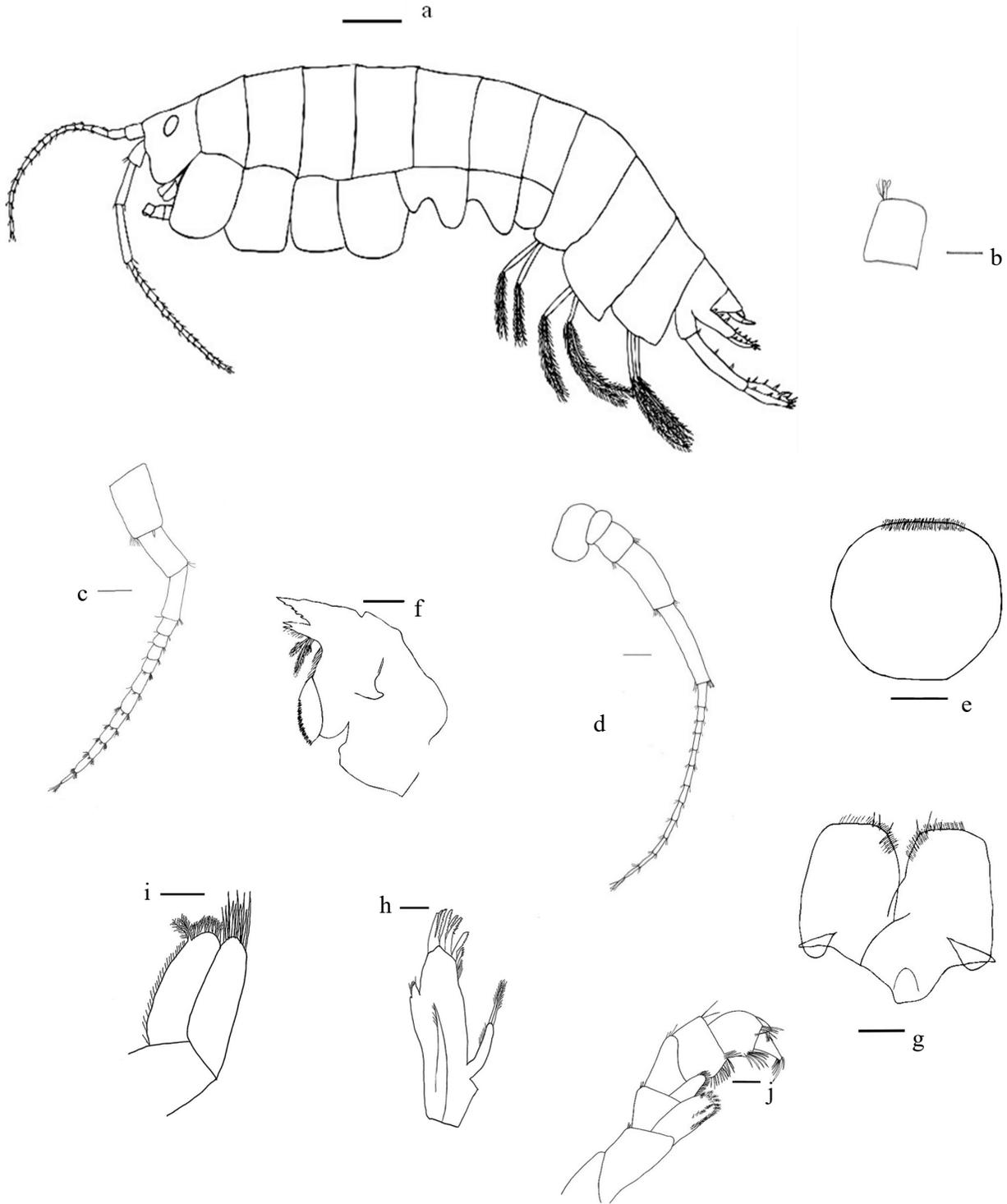


Figura 4. *Hyalella curvispina*. Macho. a: habitus; b: “aesthetasc” en antenito 4 de antena 1; c: antena 1; d: antena 2; e: labro; f: mandíbula; g: labio inferior; h: maxila 1; i: maxila 2; j: maxilipedo. Escala: (a): 1mm; (b): 0,01mm, (c-j): 0,1m.

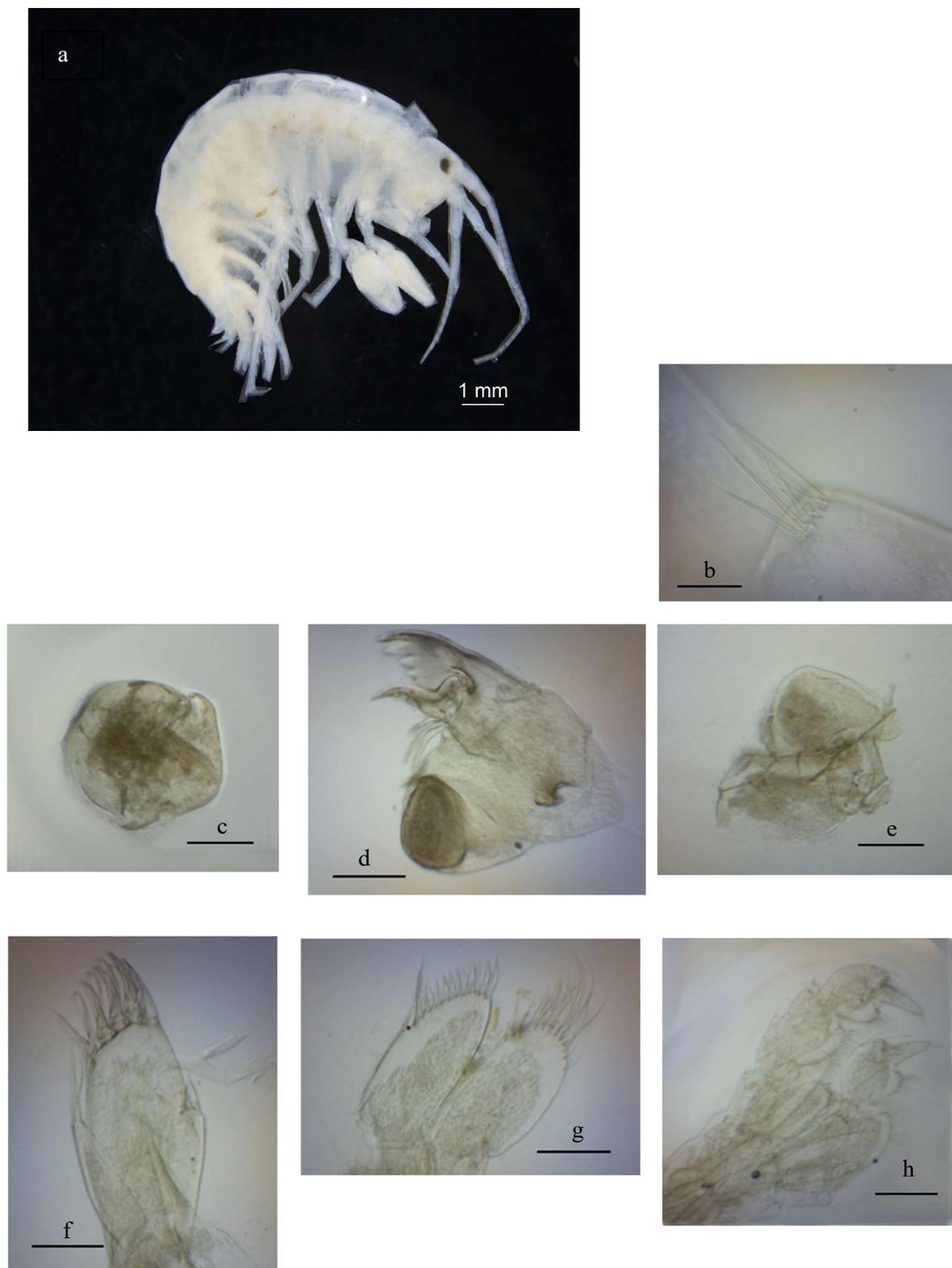


Figura 5. *Hyalella curvispina*. Macho. a: habitus; b: ; b: “aesthetascs” en antenito 4 de antena 1; c: labro; d: mandíbula; e: labio inferior; f: maxila 1; g: maxila 2; h: maxilipedo. Escala: (b): 0,01mm, (c-h): 0,1m.

Gnatopodo 1 (Fig. 6a, b y 7 a, b) subquelado; basi, isquio y mero con setas simples; carpo con el lóbulo distal posterior provisto de setas serradas largas y cortas dispuestas en fila seguidas de setas cuspidadas seguida de área con denticulos “comb scale”; borde distal anterior provisto de una fila de setas serradas; propodo con el borde palmar recto en cara externa con una fila de setas simples cortas y largas, ángulo palmar con dos setas cuspidadas, una de ellas con seta accesoria, seguida de cuatro setas simples; cara interna con una fila oblicua con cinco setas serradas, áreas con denticulos próximas a los bordes proximal y distal, borde distal con una seta simple y una plumosa, ángulo antero proximal provisto de entre seis y ocho setas simples; dáctilo robusto con una seta simple en el borde superior.

Gnatopodo 2 (Fig. 6c y 7c) subquelado; basi más largo que el resto de los segmentos con setas simples; isquio con seis setas simples en el borde del ángulo antero distal; mero con tres setas simples en el borde del ángulo antero distal; carpo con el lóbulo posterior cóncavo y de longitud igual a la máxima del segmento, bordeando el extremo distal con diez setas cuspidadas, área del extremo con denticulos; propodo amplio con el borde palmar convexo con una fila de setas simples y tres setas simples oblicuas, área del ángulo palmar sobresalida, trapezoidal con denticulos “comb scale” y con tres setas cuspidadas; extremo proximal del propodo con tres setas simples; dáctilo robusto.

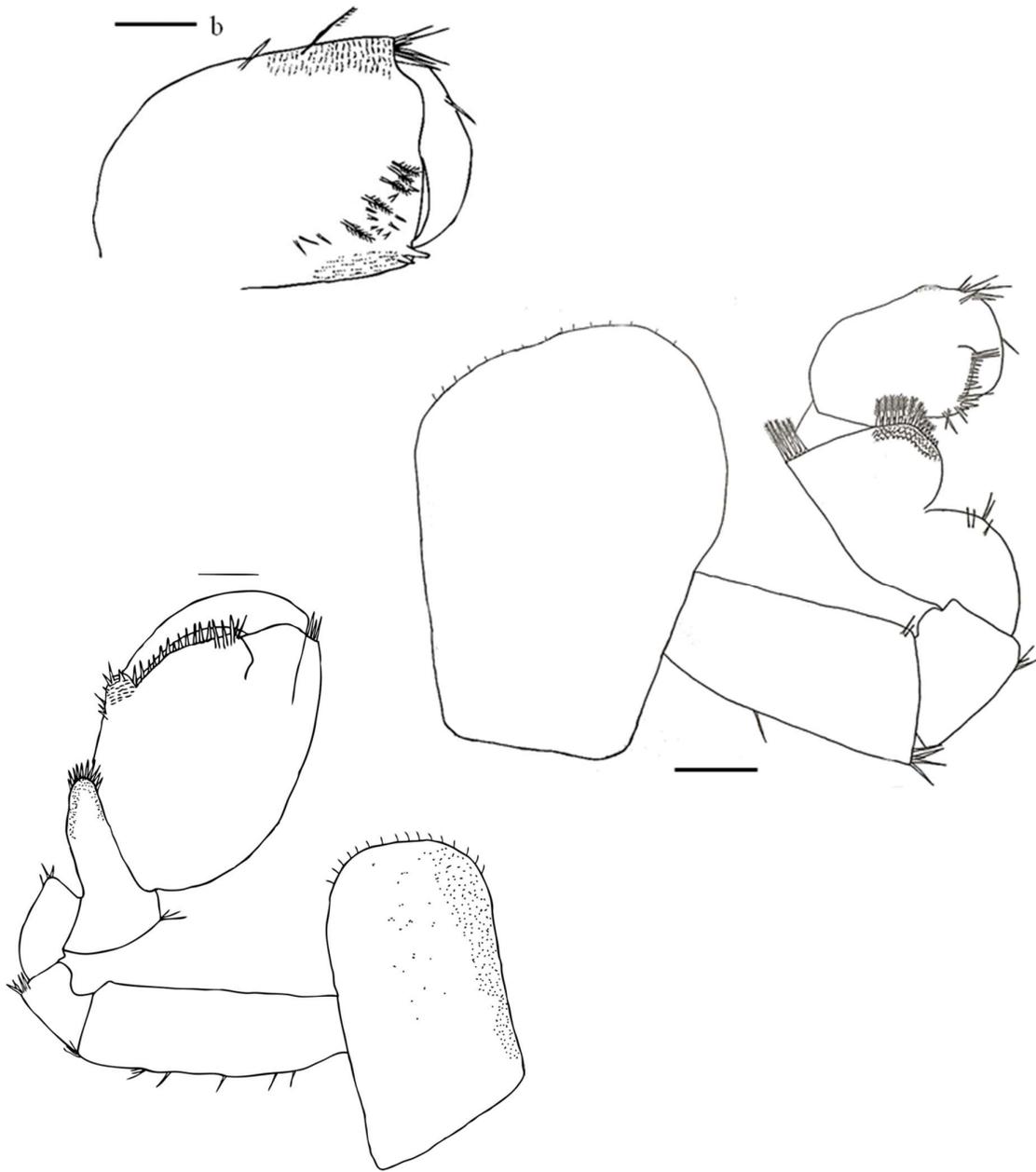


Figura 6. *Hyalella curvispina*, macho. a, gnatopodo 1; b, detalle cara ventral de propodito y dactilo de gnatopodo 1; c, gnatopodo 2. Escala: (a) 0,2 mm; (b-c): 0,1mm.

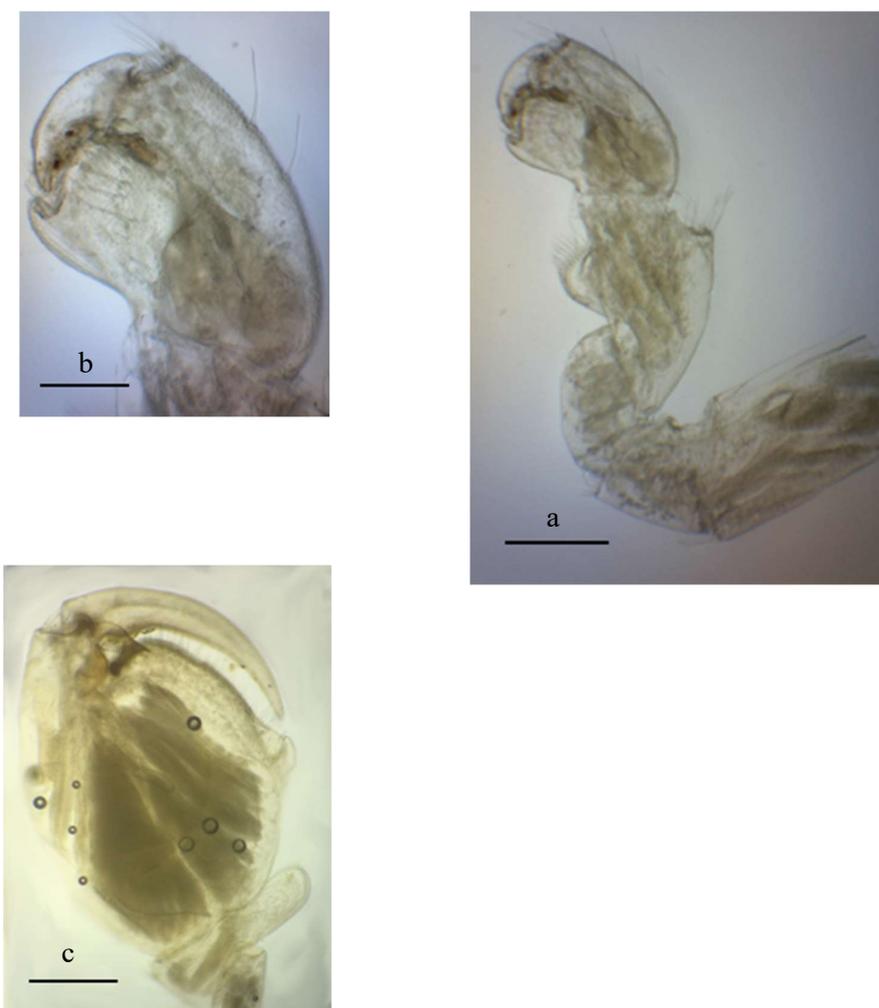


Figura 7. *Hyalella curvispina*, macho. a, gnatopodo 1; b, detalle cara ventral de propodito y dactilo de gnatopodo 1; c, gnatopodo 2. Escala: (a) 0,2 mm; (b-c): 0,1mm.

Pereiopodos 3 a 7 (Fig. 8d y e) pereopodos 3 y 4 de similar constitución con dos setas simples en margen posterior del mero y con dos setas simples en el ángulo posteroinferior, carpo y propodo sin setas en el margen posterior y con dos o tres setas simples en el ángulo posteroinferior; dácilo menos de la mitad de la longitud del propodo con dos setas basodactilares. Pereiopodos 5 a 7 de similar estructura, mero con tres setas simples en el margen posterior y un grupo de tres o cuatro setas simples en el ángulo posteroinferior, carpo y propodo sin setas en el margen posterior y con un grupo de entre tres y cinco setas simples en el ángulo posteroinferior; dácilo menos de la mitad de la longitud del propodo con entre dos y tres setas basodactilares.

Pleopodos (Fig. 8f y 9f) pedúnculo más corto que las ramas; ramas externa e interna de igual desarrollo (17 y 19 segmentos) con setas plumosas en los márgenes.

Uropodo 1 (Fig. 8g y 9g) pedúnculo más largo que las ramas, con cuatro setas cuspidadas sobre el margen interno y dos setas cuspidadas en el margen distal; exopodito con tres setas cuspidadas equidistantes a lo largo del margen interno y tres setas cuspidadas en el extremo apical, una de ellas más larga; endopodito con tres setas cuspidadas equidistantes a lo largo del margen interno, con una seta curva apical seguida de tres setas cuspidadas en el extremo apical, una de ellas más larga.

Uropodo 2 (Fig. 8h y 9h) pedúnculo más corto que las ramas, con tres setas cuspidadas laterodistales exopodito con tres setas cuspidadas laterales y con una seta cuspidada y una seta simple y pequeña en el extremo apical; endopodito con entre cuatro y cinco setas cuspidadas laterales laterales y con tres setas cuspidadas de diferentes tamaños en el extremo apical.

Uropodo 3 (Fig. 8i y 9i) con el pedúnculo de similar longitud a la rama externa pero más ancho, rama interna ausente; con un grupo de seis setas cuspidadas, cuatro cortas y dos largas en el borde superior interno del pedúnculo y con un grupo de entre cuatro y seis setas simples y dos setas cuspidadas en el extremo apical del exopodito.

Telson (Fig. 8j y 9j) cuadrangular, abovedado, con dos grupos de dos setas cuspidadas con seta accesoria en el extremo superior y grupos de setas plumosas a cada lado.

Branquias coxales en los segmentos 2 a 6, branquias esternales en los segmentos 2 a 7.

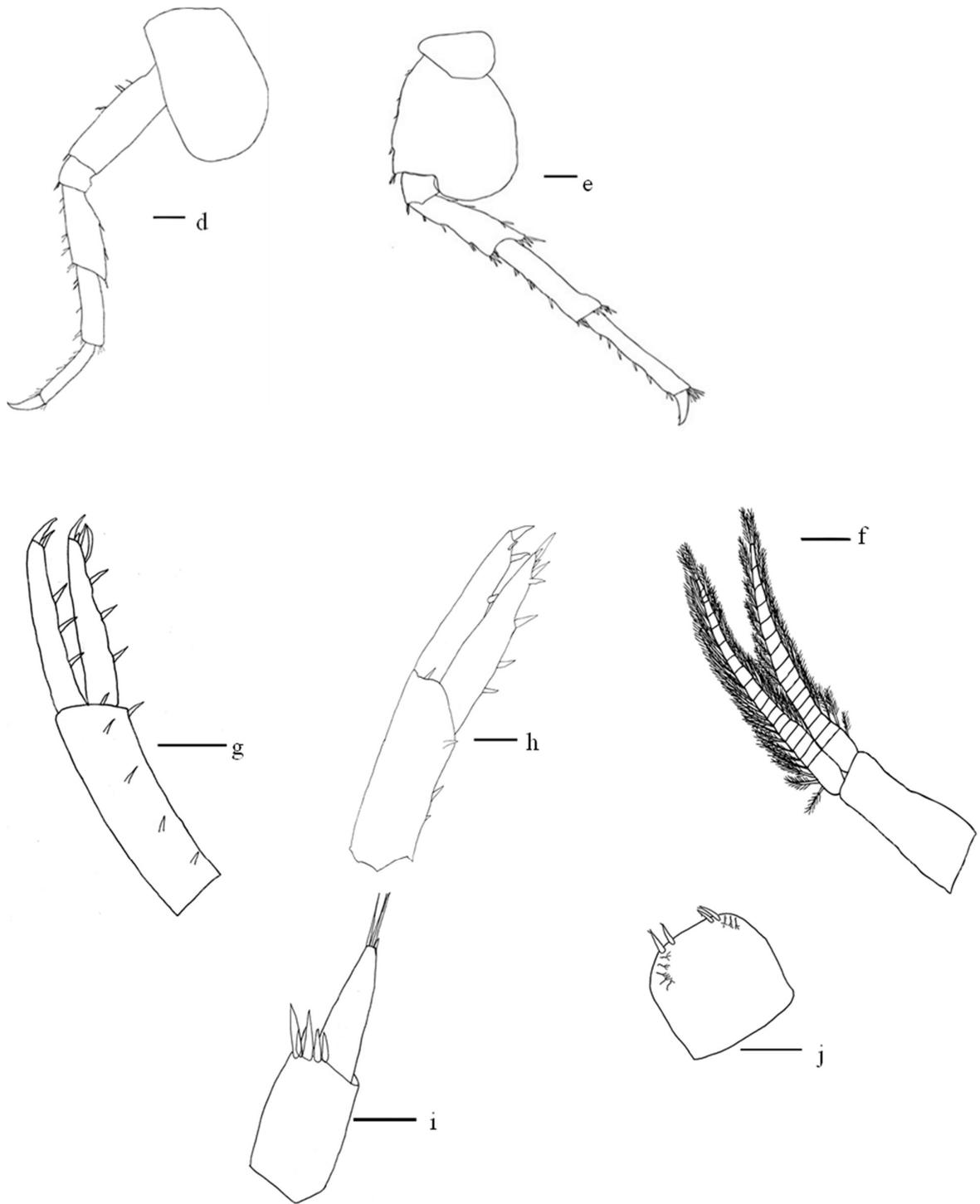


Figura 8. *Hyalella curvispina*, macho. d, pereopodo 3; e, pereopodo 7; f, pleopodo; g, uropodo 1; h, uropodo 2; i, uropodo 3; j, telson. Escala: (a-c): 0,2 mm; (d-g): 0,1mm.



Figura 9. *Hyalella curvispina*, macho. f, pleopodo; g, uropodo 1; h, uropodo 2; i, uropodo 3; j, telson. Escala: (a-c): 0,2 mm; (d-g): 0,1mm.

Hembra. Paratipo CCSEFC 382. Talla (LC): 0,6mm; (LT): 6 mm. Variación: Paratipos:14. Talla media \pm desvío estándar (LC): $0,6 \pm 0,1$ mm; (LT): $6 \pm 0,99$ mm.

Habitus (Fig. 11a) similar al del macho exceptuando las siguientes características: Gnatopodo 1 (Fig. 10a y 11a) menos robusto, carpo más largo que ancho con el lóbulo distal posterior provisto de setas serradas cortas y largas dispuestas en filas y con seis setas plumosas internas en la base del lóbulo; propodo con el borde palmar levemente convexo, ángulo palmar con una espina bífida, cara interna con una fila de seis setas serradas sobre la mitad distal, áreas con dentículos “comb scale” sobre los márgenes externos e internos. Gnatopodo 2 (Fig. 10b y 11b) similar al gnatopodo 1, carpo con el lóbulo posterior más desarrollado y con el propodo más largo y angosto que el gnatopodo 1. Uropodo 1 (Fig. 10c y 11c) sin seta curva en el endopodito.

Información molecular

Se han generado secuencias parciales de los genes 12S, 28S y H3 disponibles en GenBank (Números de acceso: MZ750902; MZ750891; MZ73685).

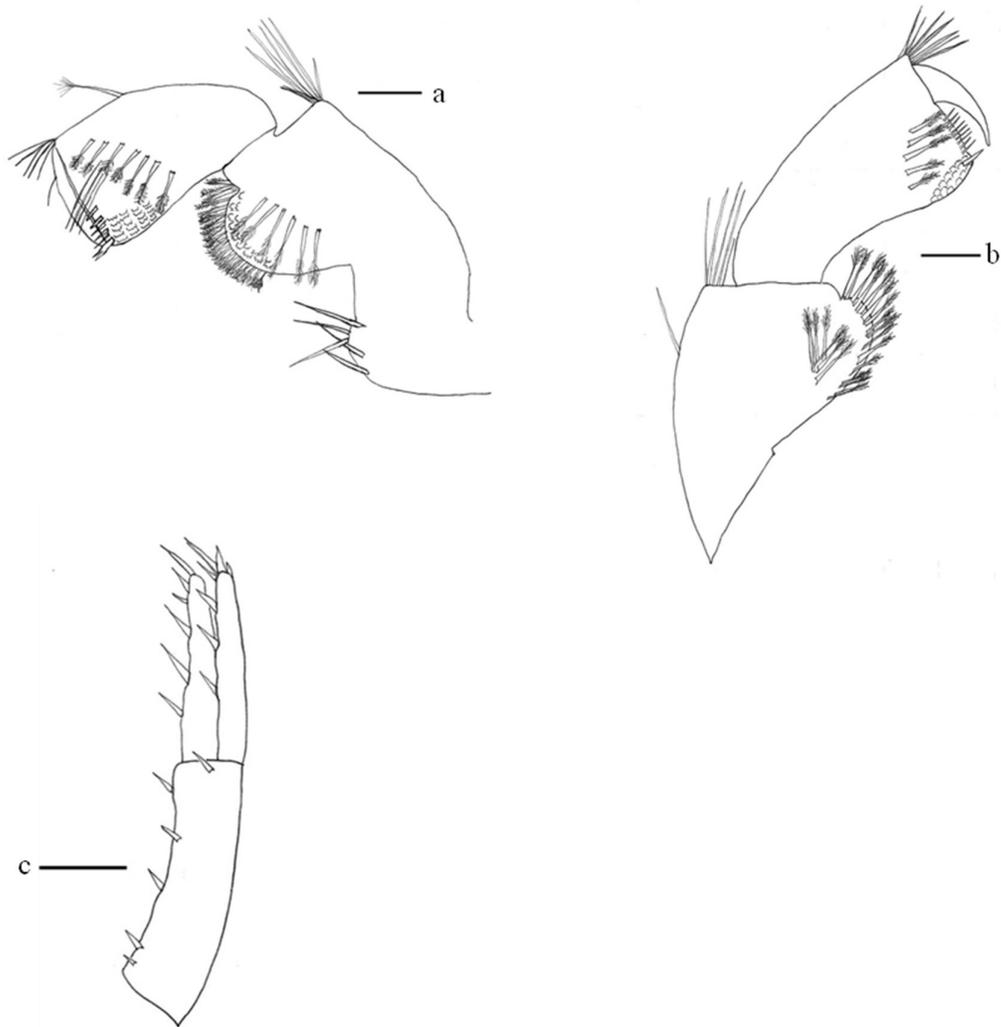


Figura 10. *Hyalella curvispina*. Hembra. a: gnatopodo 1; b: gnatopodo 2; c: uropodo 1. Escala (a-c): 0,1mm.

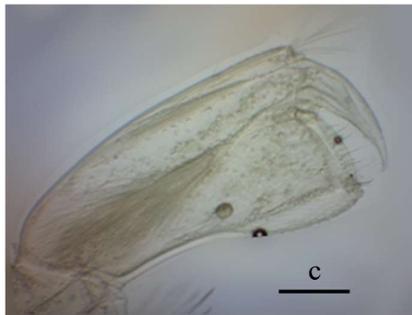


Figura 11. *Hyalella curvispina*. Hembra. a: habitus; b: gnatopodo 1; C: gnatopodo 2; d: uropodo 1. Escala (b-d): 0,1mm.

Descripción de los morfos y diferenciación con respecto a *H. curvispina*

Los 9 morfos reconocidos se asemejan a *H. curvispina* ya que presentan ojos redondos, la antena 1 más corta que la antena 2 con once y trece antenitos (excepto H7 con quince antenitos) en cada flagelo respectivamente. En el lóbulo externo de la maxila 1 presentan un pliegue longitudinal medio semejante a un agujón que llega hasta el palpo. En el lóbulo interno de la maxila 2 presentan dos setas plumosas. En el meropodito de los pereopodos 3 y 4 presentan entre dos y tres setas simples. En el propodo del gnatopodo 1 presentan una fila oblicua de entre cuatro y seis setas serradas. En el uropodo 1 la seta curva de la rama interna está bien desarrollada y en el ápice de las ramas internas y externas presentan una o dos setas cuspidadas. En el uropodo 2 la rama interna y externa presentan en el ápice tres setas cuspidadas de diferentes tamaños y en el uropodo 3 la rama externa presenta setas sólo en el ápice. El telson presenta entre dos y seis setas distribuidas simétricamente excepto en el morfo H7 que presenta múltiples setas distribuidas uniformemente.

Morfo H1

Localidad: Colonia. Colonia del Sacramento (34°26'03.1"S 57°49'28.3"W) en Cantera Ferrando.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $1 \pm 0,17$ mm; (LT): $8,4 \pm 1,49$ mm; n:11. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H1). Cara ventral del propodo con fila oblicua de cinco setas serradas.

Uropodo 1 (Fig.13-H1). Pedúnculo con cinco setas cuspidadas en margen interno; exopodito más corto que endopodito cada uno con cuatro setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H1). Pedúnculo de similar longitud con doce setas cuspidadas con seta accesoria cortas y largas en el borde. Rama externa con grupo de diez setas simples cortas y largas.

Telson (Fig. 15-H1). Redondeado con dos grupos de setas, un grupo con tres setas cuspidadas de diferentes tamaños y al otro lado una seta cuspidada.

Morfo H2

Localidad: Durazno. Colonia Rosell y Rius (33°12.8'76"S 55°41.4'85"W) en charco temporal.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $1 \pm 0,2$ mm; (LT): $10 \pm 1,2$ mm; n:15. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H2). Cara ventral del propodo con una fila oblicua de cuatro setas serradas.

Uropodo 1 (Fig.13-H2). Pedúnculo con cinco setas cuspidadas en margen interno; exopodito y endopodito de similar tamaño cada uno con tres setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H2). Pedúnculo más largo y ancho que la rama externa, con doce setas cuspidadas cortas y largas, dos de ellas más largas que pasan la mitad del segmento apical; rama externa con grupo de siete setas simples largas y cortas.

Telson (Fig.15-H2). Hexagonal, con dos grupos de tres setas cuspidadas con seta accesoria de diferentes tamaños.

Morfo H3

Localidad: Durazno. Ciudad de Durazno (33°38.8'79"S 56°53.6'66"W) en laguna.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $1,2 \pm 0,2$ mm; (LT): $9 \pm 1,7$ mm; n:12. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H3). Cara ventral del propodo con fila oblicua de cuatro setas serradas.

(Fig.13-H3). Pedúnculo con cinco setas cuspidadas en margen interno; exopodito y endopodito de similar tamaño cada uno con cuatro setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H3). Pedúnculo más ancho y corto que la rama externa, con seis setas cuspidadas, rama externa con grupo de diez setas simples largas y cortas.

Telson (Fig.15-H3). Cuadrangular, abovedado con 2 grupos de dos setas cuspidadas con seta accesoria una corta y una larga a cada lado.

Morfo H4

Localidad: Lavalleja. Aguas Blancas (34°30.4'36"S 55°22.3'14"W), en laguna de la represa Aguas Blancas.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $0,8 \pm 0,2$ mm; (LT): $6,8 \pm 1,8$ mm; n:15. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H4). Cara ventral del propodo con una fila oblicua de seis setas serradas.

Uropodo 1 (Fig.13-H4). Pedúnculo con seis setas cuspidadas en margen interno, exopodito más corto que endopodito, con cinco setas cuspidadas y endopodito con cuatro setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H4). Pedúnculo de similar longitud a la rama externa pero más ancho, con seis setas cuspidadas cortas y largas, con una seta cuspidada corta en ángulo superior externo y con una seta plumosa en la mitad externa; rama externa con entre cuatro y seis setas simples y una seta cuspidada.

Telson (Fig.15-H4). Más largo que ancho, abovedado, con dos setas cuspidadas con seta accesoria a un lado y con una seta cuspidada con seta accesoria al otro lado en el borde superior; con tres setas plumosas a lo largo de los bordes laterales.

Morfo H5

Localidad: Tacuarembó. Paso de los Toros (32°39.5'43"S 56°28.7'03"W) en laguna.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $0,8 \pm 0,1$ mm; (LT): $8,4 \pm 0,8$ mm; n:15. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H5). Cara ventral del propodo con fila oblicua de cinco setas serradas.

Uropodo 1 (Fig.13-H5). Pedúnculo con tres setas cuspidadas en margen interno; exopodito y endopodito de similar tamaño con tres setas cuspidadas y endopodito con dos setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H5). Pedúnculo de similar longitud a la rama externa con cuatro setas cuspidadas, rama externa con dos setas simples y dos setas cuspidadas en el ápice.

Telson (Fig.15-H5). Redondeado con borde superior recto, con una seta simple a cada lado y una fila de tres setas plumosas a cada lado.

Morfo H6

Localidad: Tacuarembó. Achar (32°23'49.4"S 56°09'26"W) en laguna.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $0,8 \pm 0,2$ mm; (LT): 6 ± 1 mm; n:15. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H6). Cara ventral del propodo con fila oblicua de cuatro setas serradas.

Uropodo 1 (Fig.13-H6). Pedúnculo con dos setas cuspidadas en margen interno; exopodito y endopodito de similar tamaño cada uno con dos setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H6). Pedúnculo de similar longitud que la rama externa, con seis setas cuspidadas con seta accesoria cortas y largas en el borde; rama externa con cuatro setas simples cortas y largas y dos setas cuspidadas.

Telson (Fig.15-H6). Más ancho que largo con el borde apical recto y dos grupos de dos setas cuspidadas de similar tamaño y una corta a cada lado; y con dos setas plumosas en los bordes laterales.

Morfo H7

Localidad: Tacuarembó. Batoví (31°52'55.7"S 56°0'42.7"W) en laguna temporal.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $1 \pm 0,2$ mm; (LT): 9 ± 1 mm; n:10. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H7). Cara ventral del propodo con fila oblicua de seis setas serradas.

Uropodo 1 (Fig.13-H7). Pedúnculo con seis setas cuspidadas en margen interno; exopodito más corto que endopodito con cuatro setas cuspidadas y endopodito con tres setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H7). Pedúnculo de similar longitud a la rama externa con seis setas cuspidadas con seta accesoria en el borde y con una seta cuspidada con seta accesoria larga ubicada por encima de la mitad del pedúnculo; rama externa con grupo de setas simples en el ápice.

Telson (Fig.15-H7). Redondeado, con múltiples setas cuspidadas y dos setas plumosas en cada extremo del borde.

Morfo H8

Localidad: San José. Paraje Chamizo (34°09'22.0"S 56°41'17.4"W) en arroyo Chamizo.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $1,2 \pm 0,3$ mm; (LT): $10 \pm 2,9$ mm; n:10. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H8). Cara ventral del propodo con fila oblicua de cinco setas serradas.

Uropodo 1 (Fig.13-H8). Pedúnculo con cuatro setas cuspidadas en margen interno; exopodito y endopodito de similar tamaño con dos setas cuspidadas y endopodito con 3 setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H8). Pedúnculo y rama externa de similar tamaño, con seis setas cuspidadas con seta accesoria cortas y largas, rama externa con cuatro setas simples cortas y largas y una seta cuspidada.

Telson (Fig.15-H8). Más ancho que largo, abovedado con un grupo de tres setas cuspidadas con seta accesoria, dos de similar tamaño y una corta a un lado y una seta cuspidada con seta accesoria al otro lado.

Morfo H9

Localidad: Tacuarembó. Curtina (32°08'05.5"S 56°05'20.0"W) en charco temporal.

Material examinado: Macho. Talla \pm desvío estándar (LC): $0,6 \pm 0,1$ mm; (LT): $5 \pm 0,9$ mm; n:7. Col: A. Waller & cols.

Gnatopodo 1 (Fig.12-H9). Cara ventral del propodo con fila oblicua de cinco setas serradas.

Uropodo 1 (Fig.13-H9). Pedúnculo con cinco setas cuspidadas en margen interno; exopodito más corto alcanza la mitad del tamaño del endopodito sin setas en el margen interno, endopodito dos setas cuspidadas en margen interno.

Uropodo 3 (Fig.14-H9). Pedúnculo y rama externa de similar tamaño, con setas cuspidadas con seta accesoria de diferentes tamaños, rama externa con dos setas simples, una seta cuspidada y una seta cuspidada con seta accesoria.

Telson (Fig.15-H9). Aboveado con una seta cupidada en cada extremo.

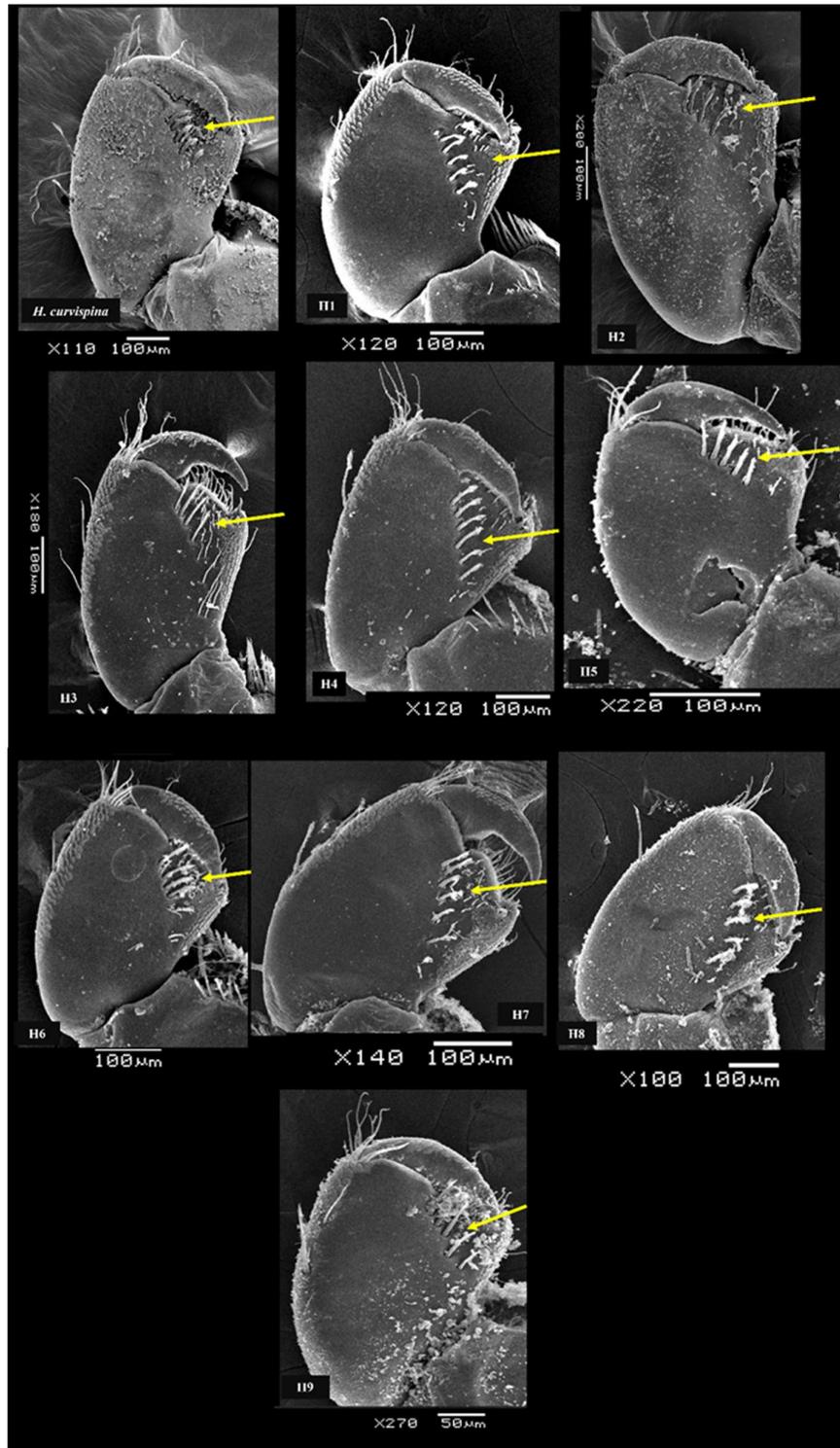


Figura 12. Gnatopodo 1 de *H. curvispina* y de los morfos identificados: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9. Flecha amarilla: fila oblicua de setas serradas. Morfología de la seta de acuerdo con Zimmer et al. 2009.

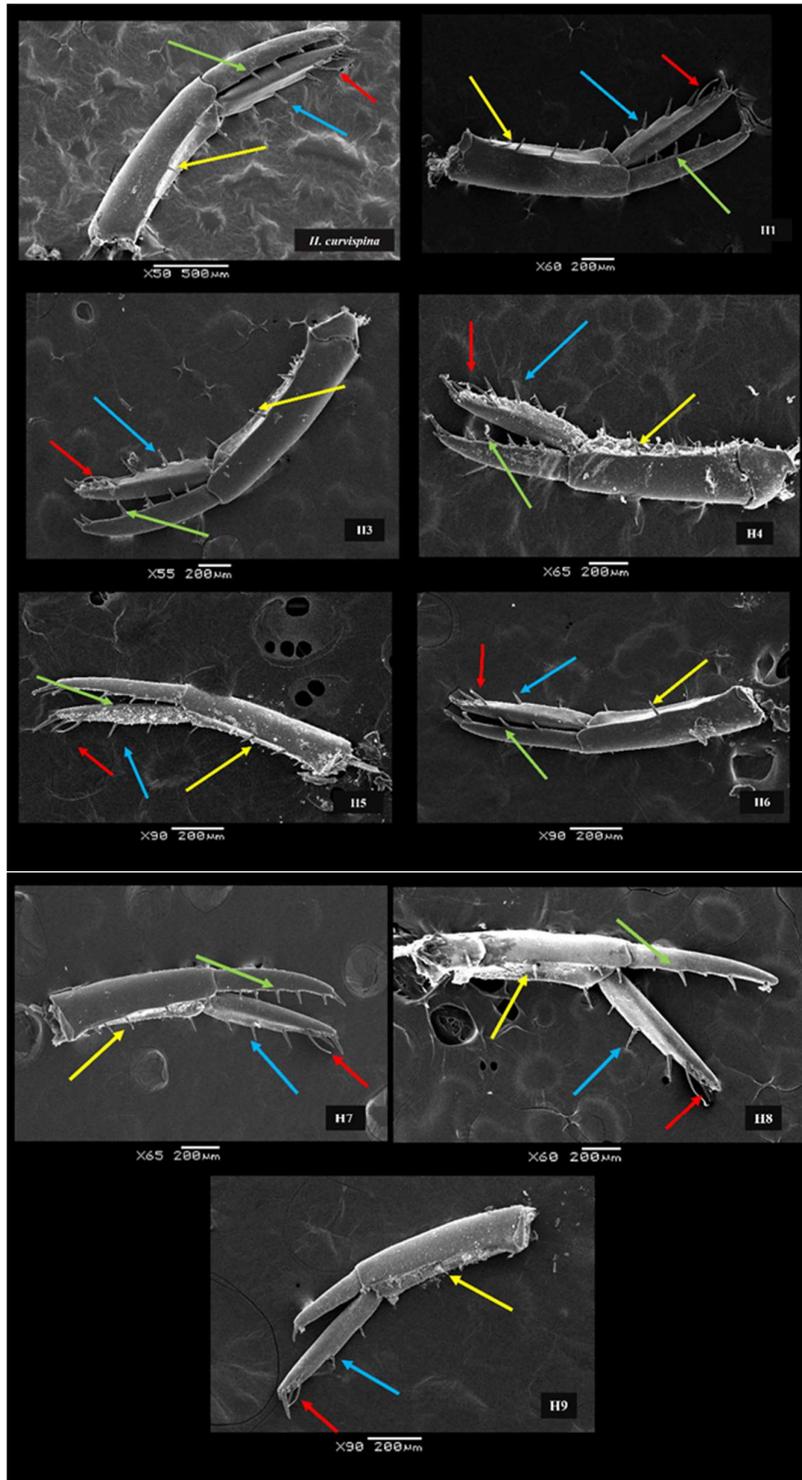


Figura 13. Uropodo I de *H. curvispina* y de los morfos identificados: H1, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9. Flecha amarilla: seta cuspidada en margen interno del pedúnculo; flecha verde: seta cuspidada en margen interno de exopodito; flecha azul: seta cuspidada en margen interno del endopodito; flecha roja: seta curva en endopodito. Morfología de las setas de acuerdo con Zimmer et al.,2009.

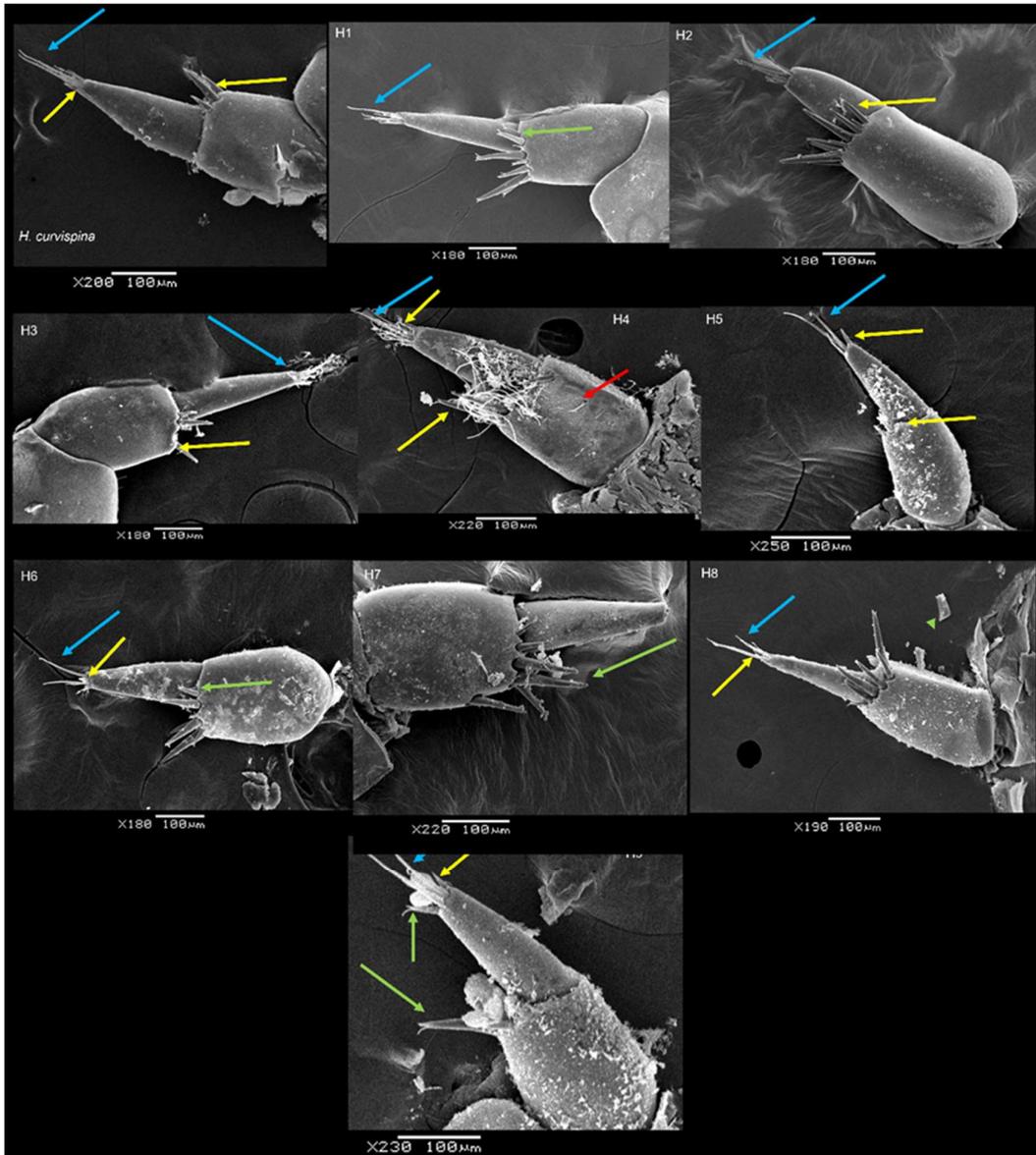


Figura 14. Uropodo 3 de *H. curvispina* y de los morfos identificados: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9. Flecha amarilla: seta cuspidada; flecha verde: seta cuspidada con seta accesoria; flecha azul: seta simple, flecha roja: seta plumosa. Morfología de las setas de acuerdo con Zimmer et al.,2009.

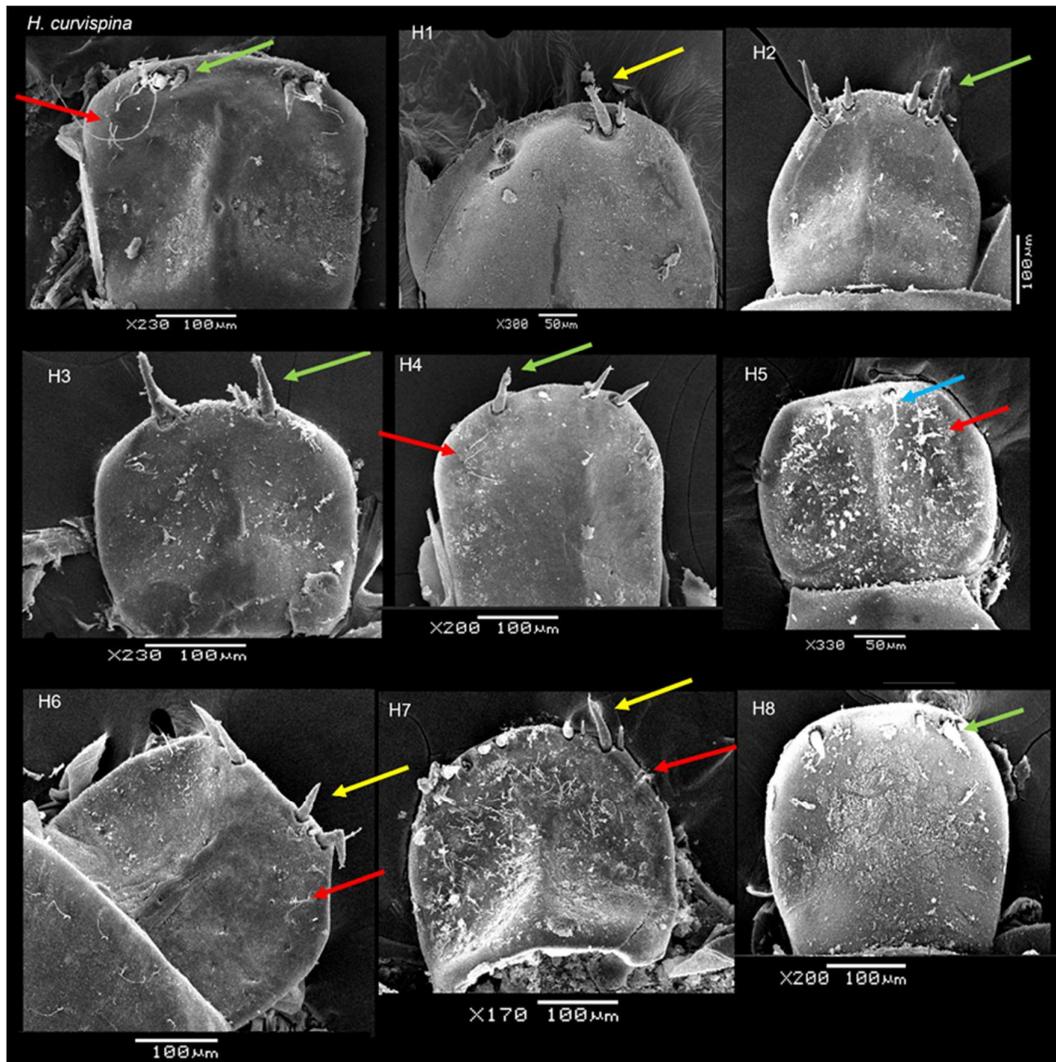


Figura 15. Telson de *H. curvispina* y de los morfos identificados: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8. Flecha amarilla: seta cuspidada; flecha verde: seta cuspidada con seta accesoria; flecha azul: seta simple, flecha roja: seta plumosa. Morfología de las setas de acuerdo con Zimmer et al.,2009.

Longitud del cefalotórax

Las medidas del largo del cefalotórax (LC) y largo total (LT) para machos de *H. curvispina* y los 9 morfos se observan en la tabla II. Los machos no presentan diferencias significativas con respecto al LC (ANVA, F: 1,18; p: 0,31), mientras que para el LT los machos presentaron diferencias significativas (ANVA, F: 3,9; p:0,0001), las diferencias están dadas entre *H. curvispina* y los morfotipos H6 (p:0,01) y H9 (p:0,02) y entre el

morfotipo H2 y los morfotipos H6 (p: 0,003) y H9 (p:0,004). Se registró una correlación positiva entre el LC y el LT (r:0,89, p:2,18E-39).

Tabla II. Medidas del largo del cefalotórax LC (mm) y largo total (LT) para machos de *H. curvispina* y de los 9 morfotipos identificados. Media \pm error estándar, rango y número de individuos (N).

Especie/morfo	LC		LT		N
	Media \pm E.S	Rango	Media \pm E.S	Rango	
<i>H. curvispina</i>	0,8 \pm 0,04	0,6-1	8,4 \pm 0,4	5-10	15
H1	0,8 \pm 0,04	0,6-1,2	7,6 \pm 0,5	5,4-11	11
H2	0,8 \pm 0,04	0,6-1	8,6 \pm 0,3	6,4-10	15
H3	0,7 \pm 0,06	0,4-1,2	7 \pm 0,5	4-9	12
H4	0,8 \pm 0,04	0,6-1	6,9 \pm 0,5	4,2-9,6	15
H5	0,7 \pm 0,03	0,6-1	6,8 \pm 0,2	5,4-8,4	15
H6	0,7 \pm 0,04	0,4-1	6 \pm 0,3	4,6-9	15
H7	0,8 \pm 0,05	0,6-1	7,2 \pm 0,3	9,2-6	10
H8	0,8 \pm 0,1	0,4-1,2	7,4 \pm 0,9	11-3	10
H9	0,7 \pm 0,04	0,6-0,8	6,1 \pm 0,3	5-7	7

Las medidas del largo del cefalotórax (LC) y largo total (LT) para hembras de *H. curvispina* y los 9 morfos se observan en la tabla III. Con respecto al LC las hembras no presentan diferencias significativas (ANVA, F: 1,5, p: 0,14). Mientras que para el LT las hembras presentan diferencias significativas (H: 21,7, p:0,009) las diferencias están dadas entre H6 con respecto a H2 (p:0,02) a H5 (p:0,03) y a H7 (p:0,03), a su vez H7 presenta diferencias con respecto a *H. curvispina* (p:0,02) a H1 (p:0,02) a H6 (p:0,0008) y a H9 (p:0,01), por otra parte H8 presenta diferencias con respecto a H7 (p:0,04) y H9 presenta diferencias con respecto a *H. curvispina* (p:0,01) a H3 (p:0,003) a H4 (p:0,01) a H5 (p:0,006) y a H7 (p:0,0002). Se registró una correlación positiva entre el LC y el LT (r:0,85, p:4,96E-35).

Tabla III. Medidas del largo del cefalotórax LC (mm) y largo total (LT) para hembras de *H. curvispina* y de los 9 morfotipos identificados. Media \pm error estándar, rango y número de individuos (N).

Especie/morfo	LC		LT		N
	Media \pm E.S	Rango	Media \pm E.S	Rango	
<i>H. curvispina</i>	0,6 \pm 0,04	0,4-1	6,2 \pm 0,3	8,2-4,6	15
H1	0,5 \pm 0,03	0,4-0,6	5,8 \pm 0,4	4,2-6,8	8
H2	0,7 \pm 0,03	0,4-0,8	6,4 \pm 0,2	8,8-4,8	15
H3	0,7 \pm 0,05	0,4-1	6,2 \pm 0,4	8,6-4,2	15
H4	0,7 \pm 0,03	0,6-0,8	6,4 \pm 0,3	8,2-4,6	15
H5	0,7 \pm 0,04	0,4-1	6,8 \pm 0,4	10-4,8	15
H6	0,6 \pm 0,02	0,4-0,8	5,6 \pm 0,3	7,6-4	15
H7	0,7 \pm 0,03	0,6-0,8	6,6 \pm 0,15	8-5,4	15
H8	0,6 \pm 0,05	0,4-1	5,6 \pm 0,5	3,2-10	15
H9	0,6 \pm 0,01	0,6-0,7	5,2 \pm 0,2	6-4,4	8

DISCUSIÓN

Se corroboró la presencia de *H. curvispina* para la localidad tipo y para 80 sitios de los muestreados en Uruguay y la presencia de 9 morfos similares a *H. curvispina* con diferencias que ponen en duda el estatus de nueva especie. Se confirma por primera vez la presencia del “complejo curvispina” en Uruguay, propuesto por González & Watling (2001) y Peralta & Grosso, (2009). A su vez, los morfos identificados se diferencian del resto de las especies que forman el “complejo curvispina” (Colla & César, 2015; Dos Santos et al., 2008; González et al., 2006; Reis et al., 2020; Streck Marx & da Silva Castiglioni, 2020; Talhaferro et al., 2021a) las diferencias están dadas en cuanto a: tamaño corporal, forma de los ojos, tamaño de las antenas 1 y 2, morfología y setación de las maxilas 1 y 2, setación de la cara interna del gnatopodo 1, setación de los pereopodos 3

y 4, setación de los uropodos 1, 2 y 3 y del telson. Dentro del “complejo curvispina” hay nueve especies que están registradas para el sur de Brasil, entre las que se destacan *H. brasiliensis* (Bousfield, 1996) registrada para el estado de Paraná, los morfos se diferencian de ella ya que presenta ojos levemente reniformes, la antena 1 más corta que la antena 2 con catorce y diecinueve antenitos en cada flagelo respectivamente y el meropodito de los pereopodos 3 y 4 presentan entre siete y diez setas simples. *H. castroi* (González et al., 2006) registrada para Río Grande do Sul, esta especie se diferencia ya que presenta en el lóbulo interno de la maxila 2, una seta papposerrada robusta. La antena 1 más corta que la antena 2 con diez-dieciséis y catorce-dieciocho antenitos en cada flagelo respectivamente. En la cara interna del propodo del gnatopodo 1 la fila oblicua presenta más de diez setas serradas. Por último, el telson presenta ocho setas distribuidas asimétricamente. *H. giorginae* (Streck Marx et al., 2017) registrada para Rio Grande do Sul, esta especie se diferencia ya que en el lóbulo externo de la maxila 1 no presenta el pliegue longitudinal medio semejante a un agujón. En el lóbulo interno de la maxila 2 presenta dos setas papposerradas robustas. La antena 1 y 2 presentan catorce y dieciséis antenitos en cada flagelo respectivamente. En la cara interna del propodo del gnatopodo 1 la fila oblicua es de nueve setas serradas. En el uropodo 1, las ramas interna y externa presentan cuatro y cinco setas cuspidadas en el ápice respectivamente. En el uropodo 2, las ramas interna y externa presentan cinco y seis setas cuspidadas en el dorso respectivamente y siete-cinco setas cuspidadas en el ápice respectivamente. En el uropodo 3, el pedúnculo presenta nueve setas cuspidadas y rama externa con dos setas cuspidadas con seta accesoria y setas simples distribuidas a lo largo de la rama. *H. gauchensis* (Streck Marx et al., 2017) registrada para Rio Grande do Sul, esta especie se diferencia ya que en el lóbulo externo de la maxila 1 no presenta el pliegue longitudinal medio semejante a un agujón. La antena 1 y 2 presentan once y quince antenitos en cada flagelo respectivamente. La cara interna del propodo del gnatopodo 1 la fila oblicua presenta de nueve-veinte setas serradas. El telson presenta con seis setas cuspidadas en el borde superior y seis setas plumosas lateralmente. *H. catariensis* (Reis et al., 2020) registrada para el estado de Santa Catarina, esta especie se diferencia por no presentar en lóbulo externo de la maxila 1 un pliegue longitudinal medio semejante a un agujón. En el lóbulo interno de la maxila 2 presenta una seta papposerrada bien desarrollada. La antena 1 es similar o más larga que la antena 2 y presentan catorce y once-catorce antenitos en el flagelo respectivamente. *H. rioatensis* (Reis et al., 2020) registrada para Santa Catarina, las principales diferencias con esta especie son la antena 1 es similar o más corta que la

antena 2 y presentan catorce y catorce-dieciocho antenitos en el flagelo respectivamente. En el lóbulo externo de la maxila 1 no está presente el pliegue longitudinal medio semejante a un agujón. En el lóbulo interno de la maxila 2 presenta una seta papposerrada bien desarrollada. En la cara interna del propodo del gnatopodo 1 la fila oblicua presenta una seta simple. *H. minuana* (Talhaferro et al., 2021a) registrada para Rio Grande do Sul, esta especie se diferencia ya que en el lóbulo externo de la maxila 1 no presenta el pliegue longitudinal medio semejante a un agujón. En la cara interna del propodo del gnatopodo 1 la fila oblicua presenta nueve setas serradas. *H. lagoana* (Talhaferro et al., 2021a) registrada para Rio Grande, esta especie presenta un tamaño corporal que alcanza los 7mm. El lóbulo externo de la maxila 1 no presenta el pliegue longitudinal medio semejante a un agujón. La antena 1 es más corta que la antena 2 con trece y catorce-quinze antenitos en el flagelo respectivamente. *H. sambaqui* (Talhaferro et al., 2021a) registrada para Santa Catarina esta especie presenta un tamaño corporal que alcanza los 5mm. El lóbulo externo de la maxila 1 no presenta el pliegue longitudinal medio semejante a un agujón. La antena 1 es más corta que la antena 2 con nueve y trece antenitos en el flagelo respectivamente.

Otras especies del “complejo curvispina” que se encuentran registradas para Argentina y que se diferencian de los morfos son, *H. pampeana* (Cavaliere, 1968) registrada para la provincia de Buenos Aires, la diferencia está dada ya que esta especie presenta un tamaño corporal de hasta 5mm, la antena 1 más corta que la antena 2 con doce y dieciocho antenitos en cada flagelo respectivamente y la seta curva de la rama interna del uropodo 1 poco desarrollada. *H. rionegrinae* (Grosso & Peralta, 1999) registrada para la Provincia de Río Negro, Argentina, la principal diferencia está dada en el tamaño de las antenas 1 y 2 ya que esta especie presenta cuatro y cinco antenitos en cada flagelo respectivamente. *H. bonariensis* (Dos Santos et al., 2008) registrada para la Provincia de Buenos Aires, esta especie se diferencia por presentar un tamaño corporal máximo de 8,3mm. En el lóbulo externo de la maxila 1 ausencia del pliegue longitudinal medio semejante a un agujón. Antena 1 y 2 con nueve-doce y doce-quinze antenitos en cada flagelo respectivamente.

Los 9 morfos identificados al igual que *H. curvispina* presentan un largo de cefalotórax (LC) similar, las diferencias en los tamaños se presentaron sólo para el largo total (LT) y fueron tres para el caso de los machos y doce diferencias en las hembras. Ambas medidas LC y LT presentaron una correlación positiva ($y:7,8x1,3$; $r^2:0,8$ para machos; $y:7,5x1,3$;

$r^2:0,7$ para hembras) dicha correlación también ha sido registrada para *Hyaella azteca* (Edwards & Coweel, 1992; Pickard & Benke, 1996), por lo que el LC es utilizado como reemplazo para estimar el tamaño de los individuos ya que es una medida más precisa que el LT (Edwards & Coweel, 1992; Pickard & Benke, 1996; da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a).

Dado que las diferencias morfológicas en los ejemplares de *Hyaella* de Uruguay son sutiles se hace necesario realizar estudios genéticos posteriores para conocer la diversidad existente en el género. Estudios genéticos han sido realizados con especies de *Hyaella* norteamericanas (Major et al., 2013; Vergilino et al., 2012; Witt et al., 2006; Witt & Hebert, 2000; Worsham et al., 2017) y del lago Titicaca (Adamowicz et al., 2018; Jurado-Rivera et al., 2020; Zapelloni et al., 2021) y los resultados evidencian la existencia de especies crípticas y endémicas que podrían estar ocurriendo en otras partes de Sudamérica.

DIVERSIDAD MOLECULAR Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *HYALELLA* (CRUSTACEA, AMPHIPODA, HYALELLIDAE) PARA EL URUGUAY

Waller, A.; González, E.R.; Verdi, A. & I.H. Tomasco. 2022. Genus *Hyaella* (Amphipoda: Hyaellidae) in Humid Pampas: molecular diversity and provisional new species. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 80: 261–278. <https://doi.org/10.3897/asp.80.e79498>

INTRODUCCIÓN

A pesar de las 97 especies del género *Hyaella* citadas hasta la fecha (Limberger et al., 2022; Marrón-Becerra & Hermoso-Salazar, 2022; Vernica & Peralta, 2022), el conocimiento taxonómico de las mismas se encuentra en un estado incompleto, debido a que se trata de especies crípticas con una elevada complejidad, con variaciones morfológicas interespecíficas e interpoblacionales muy sutiles, lo que dificulta su identificación y diferenciación (Alonso & Jaume, 2017; Charqueño-Celis et al., 2012; Worsham et al., 2017). Tradicionalmente, la descripción taxonómica y la identificación de especies se han basado exclusivamente en caracteres morfológicos (Alonso & Jaume, 2017; Andres, 1988; Baldinger, 2004; Bastos-Pereira et al., 2018; Bastos-Pereira & Bueno, 2012, 2013; Bond-Buckup & Araujo, 1998; Bousfield, 1996; Brehm-Lunz, 1925; Bueno et al., 2013, 2019; Cardoso et al., 2014, 2011; Cavalieri, 1968, 1959; Chevreux, 1907, 1904; Cole & Watkins, 1977; Coleman & Gonzalez, 2006; Colla & César, 2015; Dos Santos et al., 2008; Drumm & Knight-Gray, 2019; Faxon, 1876; González et al., 2008, 2006; González & Coleman, 2002; González & Watling, 2003c, 2003a, 2003b, 2003d, 2002c 2002b, 2002a, 2001; Grosso & Peralta, 1999; Marrón-Becerra et al., 2020, 2014; Monod, 1970; Peralta & Miranda, 2019; Pereira & Goulart, 2004, 1989, 1985; Reis et al., 2020; Rodrigues et al., 2017, 2014, 2012; Ruffo, 1947; Schellenberg, 1943; Shoemaker, 1942; Smith, 1875; Soucek et al., 2015; Stevenson & Peden, 1973; Stock & Platvoet, 1991; Streck Marx et al., 2017; Streck Marx & Castiglioni, 2020; Talhaferro et al., 2021a; Weckel, 1907). Sin embargo, la especiación no siempre va acompañada de cambios morfológicos, es probable que el número real de especies biológicas sea mayor

que el recuento actual de especies nominales (Bickford et al., 2007). Estudios recientes que incorporan datos moleculares muestran una alta tasa de convergencias morfológicas y especies crípticas (Adamowicz et al., 2018; Zapelloni et al., 2021), lo que evidencia la necesidad de integrar datos genéticos y morfológicos para la delimitación de las especies de este género.

En las últimas décadas se ha comenzado a estudiar el género aplicando herramientas de sistemática molecular. Se ha utilizado mayoritariamente el gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), tanto de forma parcial (Adamowicz et al., 2018; Limberger et al., 2022; Major et al., 2013; Vergilino et al., 2012; Wellborn & Broughton, 2008; Witt et al., 2003; Witt & Hebert, 2000; Worsham et al., 2017) como completa (Major et al., 2013), siendo utilizado también para *Barcoding* (Babin-Fenske et al., 2012; Dionne et al., 2011; Jurado-Rivera et al., 2020; Witt et al., 2006). Recientemente, se ha empleado el genoma mitocondrial completo para resolver relaciones filogenéticas entre un conjunto de especies (Juan et al., 2016; Zapelloni et al., 2021). Han sido utilizados otros marcadores independientes, como el gen mitocondrial 16S (Limberger et al., 2022), el gen nuclear 28S (Adamowicz et al., 2018; Witt et al., 2006; Zapelloni et al., 2021), el gen de la histona H3 (Jurado-Rivera et al., 2020), alozimas (Duan et al., 2000; Witt & Hebert, 2000) y decenas de secuencias de genes ortólogos nucleares de copia única, lo que ha permitido comenzar a esclarecer la problemática del género, identificando diferentes clados (Zapelloni et al., 2021).

Se han propuesto diferentes criterios para delimitar especies. Witt et al. (2006) propusieron el método *Species Screening Threshold* (SST), que emplea una divergencia máxima dentro de la especie del 3,75% para delimitar las relaciones entre *H. azteca* utilizando la distancia K2P (Kimura, 1980), la cual fue aplicada en otros estudios para *Hyaella* (Dionne et al., 2011; Vergilino et al., 2012). Adamowicz et al. (2018) utilizaron *Barcode Index Numbers* (BINs). Este método implementa un valor de umbral de especie del 2% para detectar 48 BINs en el conjunto de datos de *Hyaella* de América del Sur, doce de ellos en el área del Titicaca, incluidos seis muestreados únicamente en este lago. Finalmente, Jurado-Rivera et al. (2020) utilizaron distancias genéticas mediante el método K2P y *Multi-rate Poisson Tree Processes method* (mPTP) (Kapli et al. 2017) para delimitar especies también del lago Titicaca.

Hasta el momento todos los trabajos que aplican herramientas moleculares para delimitar especies y establecer relaciones filogenéticas han sido realizados para ejemplares de

Hyaella de Norteamérica y del altiplano andino. A pesar de que datos morfológicos (González & Watling, 2001) sugieren un complejo de especies al Este de los Andes caracterizado por *H. curvispina* (Peralta & Grosso, 2009) no se han incluido en las filogenias moleculares hasta la fecha. En el capítulo anterior se ha revelado la presencia de diferentes morfos de *H. curvispina* con diferencias sutiles que ponen en duda el estatus de nuevas especies. Este complejo de especies “curvispina” habita en áreas geográficas mucho más recientes e inestables que los complejos estudiados. El bloque continental que incluye a Uruguay se formó en el Holoceno, hace entre 5000-7000 años (del Puerto et al., 2011). El área presenta lagunas poco profundas y estanques temporales con secado periódico (Laufer et al., 2009) que podrían generar cuellos de botella poblacionales, con consecuencias evolutivas medibles.

En este capítulo se presenta el estudio de la identificación de los diferentes morfos de *Hyaella* sp. registrados para Uruguay. Para ello se evaluó la diversidad molecular de *Hyaella* sp. por primera vez, utilizando cuatro marcadores genéticos y se analizó su posición sistemática en el marco de las hipótesis filogenéticas disponibles para el género. Específicamente, i) se evaluó el número de especies crípticas de *Hyaella* en Uruguay y ii) se infirió la filogenia de *Hyaella* comparando *H. curvispina* con morfos similares y diferentes, y se ubicó a las *Hyaella* uruguayas dentro del clado identificado por Zapelloni et al. (2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de ejemplares

A partir de la identificación de los nueve morfos similares a *H. curvispina*, en otoño de 2020 se muestreó nuevamente los puntos del país donde fueron registrados, siendo posible recolectar en 8 de ellos, San José Colonia, Durazno; Colonia Rosell y Rius, Lavelleja, Paso de los Toros, Batoví y Achar. Además, se recolectó nuevamente *H. curvispina* en dos localidades de Montevideo: FC y localidad tipo Montevideo (Fig16; Anexo Tabla S I).

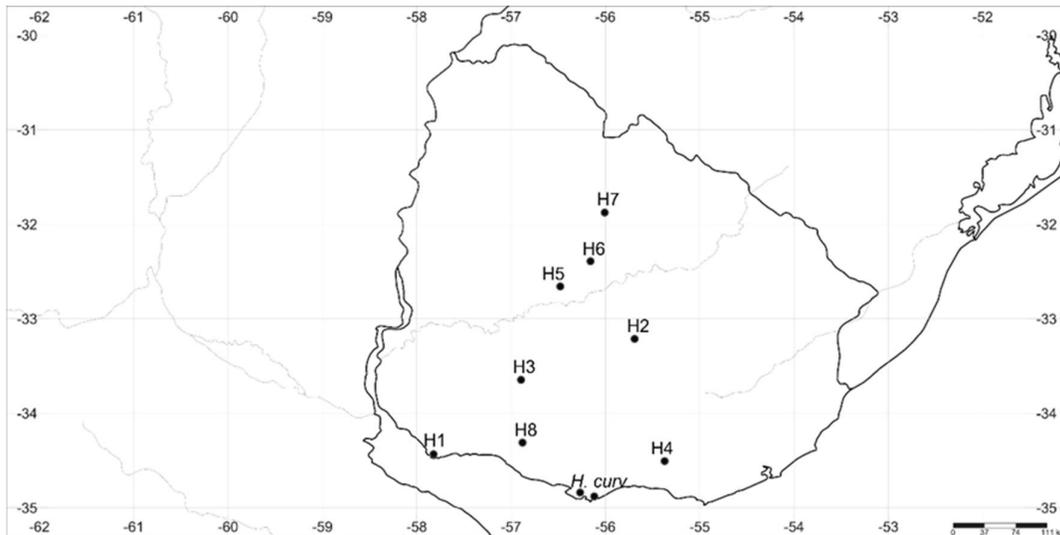


Figura 16. Sitios de recolecta de *H. curvispina* (*H. curv*) y de los morfos. H1: Colonia; H2: Colonia Rosell y Rius; H3: Durazno; H4: Lavalleja; H5: Paso de los Toros; H6: Achar; H7: Batoví y H8: San José.

Las muestras se recolectaron aplicando la misma metodología detallada en materiales y métodos del capítulo 1. Los ejemplares se acondicionaron en N₂ líquido y se trasladaron al Laboratorio de Evolución, de la Facultad de Ciencias, UdelaR. Se realizaron extracciones de ADN de 5 ejemplares de cada morfo conservados en N₂ utilizando el mismo protocolo. Se diseccionaron dos machos adultos de cada sitio y se evaluaron morfológicamente con lupa binocular para confirmar la presencia de las características de cada morfo según el sitio de recolección.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

Se amplificaron por PCR (Polymerase Chain Reaction) secuencias parciales del gen mitocondrial COI, esta amplificación presentó varias dificultades y fue posible sólo en seis de los nueve morfos. También se amplificaron para todos los morfos secuencias parciales de los genes ribosomales 12S, 28S y de la histona H3, los dos últimos nucleares. La información sobre los cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación, el tamaño de amplificación y la ubicación de cada loci se referencia en la Tabla III.

Tabla III. Marcador molecular, ubicación del loci, cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación, tamaño del marcador amplificado en pares de bases.

Marcador molecular	Ubicación del loci	Cebadores	Tamaño de ampliación (bp)	Referencia
COI	Mitocondrial	LCO 5587 F	369	Stutz et al., 2010
12S	Mitocondrial	12Samphi-f 12Samphi-r	452	Rodrigues, 2016
28S	Nuclear	Rnest Fnest	605	Stutz et al., 2010
H3	Nuclear	H3af H3ar	332	Colgan et al., 1998

Las amplificaciones fueron realizadas en un volumen total de 22µl conteniendo 10µl de kit GoTaq® Hot Start Green Master Mix (Promega), 2µl de cada oligonucleótido (10mM) y 8µl de dilución de ADN (1/100). En todos los casos se incluyeron los controles negativos necesarios reemplazando el volumen de dilución de ADN por agua. El ciclado de PCR usado para la amplificación de COI fue: desnaturalización inicial por 2 minutos a 95°C, seguido de 36 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 45°C, 60 s a 72°C y de una extensión final de 7 minutos a 72°C (Witt et al., 2006). El ciclado de PCR usado para la amplificación de 12S fue: desnaturalización inicial por 5 minutos a 96°C, seguido de 8 ciclos de 30 s a 96°C y 60 s a 55°C (disminuyendo la temperatura de a 1°C por ciclo durante 7 ciclos y luego disminuyendo a 47°C en el último ciclo) y 60 s a 72°C, seguido nuevamente de 32 ciclos de 30 s a 96°C, 60 s a 45°C y 60 s a 72°C con una extensión final de 5 minutos a 72°C (Rodrigues, 2016). Para la amplificación del 28S el ciclado de PCR usado fue: desnaturalización inicial por 1 minuto a 94°C, seguido de 39 ciclos de 60 s a 94°C, 60 s a 51°C y 60 s a 72°C, con una extensión final de 5 minutos a 72°C (Witt et

al., 2006). Para la amplificación de H3 el ciclado de PCR usado fue: desnaturalización inicial por 5 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 96°C, 45 s a 50°C y 60 s a 72°C con una extensión final de 5 minutos a 72°C (Rodrigues, 2016).

El control de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en mini geles de agarosa (0,8% en TBE 1X), teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados con transiluminador de luz ultravioleta.

Los productos del tamaño deseado, que no mostraron bandas secundarias y que presentaron intensidad similar al fragmento esperado en comparación con el estándar de peso molecular de 1Kb (LIFE TECHNOLOGIES, BRL), fueron enviados para su purificación y secuenciación automática (método Sanger, Macrogen Inc., <http://www.macrogen.com>). Los productos de PCR para el gen 12S que mostraron bandas secundarias fueron purificados a partir del gel utilizando AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences) según instrucciones del fabricante.

Edición de secuencias

Las secuencias para cada gen se generaron a partir de ambos extremos (forward y reverse). Se editaron de forma manual usando el programa Proseq 3.2 (Filatov, 2002) teniendo en cuenta que cada cambio se correspondiera con los picos que estén bien definidos en el cromatograma. En el caso de genes codificantes de proteínas se aseguró no estar en presencia de un pseudogen, verificando la ausencia de codones de terminación o indels que modificaran el marco de lectura. Para el análisis filogenético, las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de diferentes especies del mismo género obtenidas de GenBank. A su vez como grupo externo, se agregaron secuencias de *Platorchestia sp.*, un género estrechamente relacionado con *Hyalella* (Código de acceso Anexo Tablas S II y SIII), y se alinearon con el programa MEGA X (Kumar et al., 2018) usando el algoritmo MUSCLE. Las secuencias de *Hyalella* obtenidas y editadas para Uruguay fueron subidas a GenBank (Código de acceso Anexo Tabla S IV).

Análisis filogenético y delimitación de especies

Se realizaron análisis independientes para cada gen: COI, 12S, 28S y H3 y también, se analizaron conjuntamente en un supergen concatenado de los 4 marcadores moleculares (COI, 12S, 28S y H3) para *H. curvispina* y cinco morfos y un supergen concatenado de los tres marcadores moleculares (12S, 28S y H3) que estaban presentes para las dos *H. curvispina* y los 8 morfos. El conjunto de datos final incluyó secuencias de COI y secuencias concatenadas (COI, 12S, 28S y H3) para *H. curvispina* y cinco morfos y secuencias de 12S, 28S y H3 y concatenadas (12S, 28S y H3) para las dos *H. curvispina* y los 8 morfos.

A todas las secuencias obtenidas se les calculó la composición de nucleótidos, se identificaron el número de sitios conservados, los alelos/haplotipos divergentes, sitios parsimoniosamente informativos y no informativos (singletons) en Mega X (Kumar et al., 2018).

Las distancias globales de nucleótidos y las distancias por pares entre especies y morfos se estimaron con el modelo de sustitución K2P (Witt et al., 2006). El modelo de sustitución de nucleótidos más adecuado para cada gen se evaluó con jModelTest v2.2.10 (Darriba et al., 2012), con Akaike Information Criterion (AIC) y con Bayesian Information Criterion (BIC) (Posada & Crandall, 1998). Para todas las secuencias simples y concatenadas, se estimaron las relaciones filogenéticas mediante diferentes criterios en Mega X: máxima parsimonia, máxima verosimilitud y *neighbor joining* (NJ) usando el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado para cada gen proporcionado por jModelTest v2.2.10 (Darriba et al., 2012). La robustez de los nodos se estimó mediante 1000 repeticiones de bootstrap.

Se realizaron inferencias bayesianas usando la aplicación Beast v.2.6.3 (Suchard et al., 2018). El archivo de entrada se generó en Beauti, usando secuencias concatenadas de los genes: COI, 12S, 28S y H3; y secuencias concatenadas de los genes 12S, 28S y H3. En este caso, solo se utilizaron los ejemplares secuenciados para los cuatro genes (con el mismo **voucher**). Para cada gen, se utilizó el modelo de sustitución de nucleótidos de mejor ajuste estimado por jModelTest v2.2.10 (Darriba et al., 2012), el gen COI se particionó analizando las posiciones del primer y segundo codón separadas del tercero, debido a la saturación de este marcador. Los genes mitocondriales, las dos particiones de COI y 12S se vincularon, mientras que los otros dos genes se analizaron de forma

independiente y se utilizó el proceso de especiación de Yule con un árbol de partida. Se usó la longitud de MCMC de 100,000,000 generaciones, muestreando cada 10,000 con un *burn-in* del 20% de los árboles muestreados. Para garantizar un muestreo y una convergencia adecuados, los archivos de registro resultantes fueron evaluados con Tracer v. 1.6 (Rambaut, 2018). Para verificar que el análisis representa la distribución posterior con precisión y los resultados son confiables, se corroboró que los valores del tamaño de muestreo efectivo (EES, *Effective Sample Size*) fueran superiores a 200. Los árboles producidos en Beast (Suchard et al.,2018) se combinaron en un solo árbol consenso usando Tree Annotator v 2.6.3 (Suchard et al.,2018). El árbol consenso se visualizó y editó en la aplicación Fig tree v 1.4.4 (Rambaut, 2018). Debido a las dificultades para obtener el gen COI para todas las muestras uruguayas, y ya que la historia evolutiva de este gen también está en el 12S por ligamiento, ya que el genoma mitocondrial no recombina (Meyer, 1993; Saldamando & Marquez, 2012), estimamos árboles de dos especies, con y sin COI.

Se calculó la saturación por sustitución de nucleótidos para cada marcador molecular utilizando la prueba de Xia en DAMBE v. 7.2.144 (Xia, 2018). Para COI se separó el análisis y se eliminó la tercera posición del codón.

Finalmente, se aplicó una aproximación de máxima verosimilitud implementada en IQ-TREE v1.6.12 (Nguyen et al. 2015), con una partición por gen y bordes dispares, y una selección automática del mejor modelo de sustitución para cada gen, y 1000 pseudoréplicas de ultrafast bootstrap (Minh et al. 2013).

Se aplicaron tres métodos de delimitación de especies para cada gen de forma independiente y para todos ellos concatenados (con y sin COI). El método ABGD desarrollado por Puillandre et al. (2012) en el servidor web <http://wwwabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html> utilizando el modelo K2P (Kimura, 1980), y considerando $P_{min} = 0.001$, $P_{max} = 0.1$ y $X = 0.5$. Se aplicó también el método ASAP, basado en distancias genéticas por pares, se ejecutó en el servidor web <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapweb.html> con modelo K2P y opciones predeterminadas. Además, se usó PTP y bPTP en el servidor web <http://species.h-its.org/ptp/> PTP es un modelo para delimitar especies en un árbol filogenético enraizado desarrollado por Zhang et al. (2013) y bPTP es una versión actualizada del PTP de máxima verosimilitud original que agrega valores de soporte bayesianos a especies delimitadas en el árbol de entrada.

RESULTADOS

Composición de las secuencias

Se amplificaron y secuenciaron un total de 11 secuencias de COI, al afrontar varias dificultades se pudo recuperar *H. curvispina* (solo de la localidad de FC en Montevideo) y 5 morfos. Se amplificaron y secuenciaron un total de 30 secuencias del gen 12S, 10 secuencias de 28S y H3 para *H. curvispina* y todos los morfos (Tabla IV).

Tabla IV. Número de especímenes secuenciados por morfo y número de haplotipos para cada marcador molecular. N: número total de secuencias obtenidas para cada marcador molecular (M.m). N° hapl.: Número de haplotipos para cada marcador molecular. *H. curv.*: *Hyaella curvispina*. Localidades de la especie y los morfos: FC (Montevideo), MVD (Localidad tipo, Montevideo), H1: Colonia, H2: Colonia Rosell y Rius, H3 (Durazno), H4 (Lavalleja), H5 (Paso de los Toros), H6 (Achar), H7 (Batoví) y H8 (San José).

M.m	N	N° hapl.	<i>H. curv.</i> MVD	<i>H. curv.</i> FC	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
			Topotipo									
COI	11	9	-	2	2	1	2	3	1	-	-	-
12S	30	7	1	3	4	4	3	3	2	2	4	4
28S	10	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H3	10	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

La longitud de las secuencias obtenidas para cada marcador molecular, así como el número de sitios conservados, variables, parsimoniosamente informativos (Pi) y no informativos (singletons), se resumen en la tabla 3. Aunque 28S fue la secuencia más larga (605 pb), la proporción de sitios informativos fue baja (aproximadamente 18%). El análisis de secuencias de menor tamaño (369 y 452 pb, COI y 12S, respectivamente) a partir de dos marcadores mitocondriales, presentó una alta proporción de sitios informativos desde el punto de vista de la parsimonia (39 y 43% respectivamente). La histona H3 fue el fragmento más pequeño (332 pb) y fue el que presentó la mayor

proporción de sitios parsimoniosamente informativos, aunque en términos absolutos solo hubo unos pocos (22 sitios) (Tabla V).

Tabla V. Largo del fragmento en pares de bases (bp); Número de sitios conservados ©, Número de sitios variables (V); Sitios parsimoniosamente informativos (Pi) y sitios parsimoniosamente no informativos (S).

Marcador molecular	Tamaño de ampliación (bp)	Número de sitios conservados (C)	Número de sitios variables (V)	Parsimonia (Pi)	Singletons (S)
COI	369	165	203	145	58
12S	452	182	259	193	66
28S	605	390	203	110	91
H3	332	256	74	22	52
Concatenado (COI, 12S, 28S y H3)	1756	1147	572	205	366
Concatenado (12S, 28S y H3)	1387	920	435	125	303

La mayoría de los morfos tienen diferentes alelos / haplotipos, pero en todos los casos hubo haplotipos compartidos, generalmente para localidades geográficamente cercanas. Los ejemplares de *H. curvispina* recolectados en FC y en la localidad tipo, con una distancia de 20 km entre ellas, son idénticos a excepción del gen H3. Las localidades Colonia (H1) y San José (H8) con una distancia de 120 km entre ellas son idénticas excepto para COI. Las localidades Paso de los Toros (H5) y Achar (H6) con una distancia de 67 km entre ambas son idénticas, excepto para COI. Una de las muestras de la localidad Colonia (H1(1)) comparte un haplotipo para COI con *H. curvispina* (localidad tipo y FC). Sin embargo, para 12S (también mitocondrial), las morfos de Colonia (H1) y San José (H8) son idénticas entre sí y diferentes a las de *H. curvispina*, mientras que las morfos de Paso de los Toros (H5) y Achar (H6) son idénticas.

El marcador molecular 28S presenta la menor variación, y las muestras de las localidades Paso de los Toros (H5) y Achar (H6) y *H. curvispina* (dos localidades) por un lado, así como las de Colonia (H1), San José (H8) y Durazno (H3) son idénticas.

Para la histona H3 las muestras de Colonia (H1), Durazno (H3), Lavalleja (H4), Paso de los Toros (H5), Achar (H6), Batoví (H7) y San José (H8) son idénticas, mientras que *H. curvispina* de las dos localidades de Montevideo no comparten haplotipo. Se mantuvieron variantes idénticas en los análisis para estimar el árbol de especies con todas ellas (Tabla VI).

Tabla VI. Número de alelos y haplotipos compartidos para cada marcador molecular. H1: Colonia; H2: Colonia Rosell y Rius; H3: Durazno; H4: Lavalleja; H5: Paso de los Toros; H6: Achar; H7: Batoví; H8: San José.

Marcador molecular	N° alelos/haplotipos	Haplotipo compartido	Haplotipo compartido	Haplotipo compartido	Haplotipo compartido
COI	9	<i>H. curvispina</i> (topotipo y FC) y H1(1)			
12S	7	<i>H. curvispina</i> (topotipo y FC)	H1 y H8	H2 y H3	H5 y H6
28S	6	<i>H. curvispina</i> (topotipo y FC)	H1, H8 y H3	H6 y H5	<i>H. curvispina</i> (MVD) y H7
H3	3	<i>H. curvispina</i> (MVD) y H2			H1, H3, H4, H5, H6, H7 y H8

Los modelos de sustitución seleccionados por criterio AIC fueron HKY + G para COI y 12S; TVM + G para 28S y K80 + G para H3. Los modelos de sustitución seleccionados por BIC fueron TIM3 + G para COI y 12S; TMV + I + G para 28S y TPM1uf + G para H3.

Distancias genéticas

Las distancias genéticas calculadas entre pares de muestras analizadas se resumen en la Tabla VII y se muestran completas para cada gen en Anexo Tablas S IV, S V, S VI y S VII.

Tabla VII. Promedio de distancias genéticas usando K2P. *Localidad H4 (Lavalleja) representada por los especímenes H4(1), H4(2v) y H4(3) (el último solo para 12S).

Promedio	Mitocondrial		Nuclear	
	COI	12S	28S	H3
<i>Hyalella sp.</i> vs. <i>H. azteca</i>	0.24	0.22	0.08	0.08
<i>Hyalella sp.</i> vs grupo externo	0.25	0.30	0.25	0.12
Uruguay vs. <i>H. kochi</i>	0.18	0.07	0.01	0.01
Uruguay (sin-H4 vs H4)*	0.19	0.08	0.02	0.01
Intra Uruguay	0.10	0.04	0.01	0.01

Entre los ejemplares de *Hyalella* uruguayos se observa una baja distancia genética para todos los marcadores (promedio 10, 4, 1 y 1%, para COI, 12S, 28S y H3, respectivamente), siendo H4 de Lavalleja (especímenes H4(1) y H4(2v)), el morfo más divergente con respecto al resto de las muestras uruguayas (19, 8, 2 y 1% para COI, 12S, 28S y H3, respectivamente) exceptuando el espécimen H4(2) que presenta una baja distancia genética para COI (Anexo Tabla S IV). Para todos los marcadores excepto COI, las distancias genéticas promedio entre *Hyalella sp.* y *Platorchestia sp.* utilizados como un grupo externo son mucho mayores que las distancias dentro del género *Hyalella*. Para el COI, la distancia genética media entre todas las especies evaluadas y *H. azteca*, la especie más basal a escala genómica, según el estudio de Zapelloni et al., (2021) es prácticamente la misma que la distancia al grupo externo (24 y 25%, respectivamente) (Tabla VII).

Las distancias promedio entre las muestras de Uruguay son moderadas (0.10, 0.04, 0.01,0.01 para COI, 12S, 28S y H3, respectivamente), encontrándose la mayor distancia entre los especímenes H4(1) y H4(2v) con el resto (0.19, 0.08, 0.02 y 0.01, para COI, 12S, 28S y H3, respectivamente), similar a las distancias interespecíficas entre las muestras uruguayas (excluyendo los especímenes H4(1) y H4(2v)) y otras especies como *H. kochi* Voucher : 2319-B (Anexos Tablas S IV, S V, S VI y S VII).

Análisis de saturación

Para todos los marcadores, las secuencias mostraron poca saturación de sustitución (Tabla VIII). Para cada marcador, Iss es significativamente menor que Iss.c para topologías simétricas y asimétricas las que siempre fueron más bajas que las primeras.

Tabla VIII. Análisis de saturación para cada marcador molecular. Valores de Iss, Iss.c (para topologías simétrica y asimétrica), DF: grados de libertad y p valor.

Marcador molecular	Iss	Iss.c (topología simétrica)	Iss.c (topología asimétrica)	DF	p valor
COI (con 3ra posición del codón)	0.22	0.76	0.52	114	<0.0001
COI (con 1ra y 2da posición del codón)	0.05	0.90	0.76	75	<0.0001
12S	0.13	0.68	0.36	256	<0.0001
28S	0.07	0.72	0.41	521	<0.0001
H3	0.04	0.53	0,41	95	<0,0001

Análisis filogenético

Ningún gen analizado de forma independiente mostró solvencia en la resolución de la mayoría de los nodos (Fig. 17 a 20 y anexo figuras S1 a S12), presentando valores de bootstrap bajos a moderados. Solo algunos nodos presentaron valores altos y varían según el método de reconstrucción utilizado. Sin embargo, a excepción del gen H3, los genes mitocondriales COI y 12S y el gen nuclear 28S demuestran que las muestras uruguayas son parafiléticas. Existe un grupo monofilético formado por las muestras uruguayas, *H. montforti* 2015-2D, y *H. kochi* 4747, 2319, 3TK27, que incluye dos grupos: un grupo más amplio que contiene a *H. curvispina* y tiene una mayor afinidad con *H. montforti* 2015-2D y *H. kochi* 4747, 2319B, 3TK27, y el otro con menos muestras, hermano del anterior (Anexo Figuras S1-S12). En estas topologías de árboles, observamos que las muestras de

H. kochi son polifiléticas. El gen H3 no pudo resolver ningún nodo con valores de bootstrap de moderados a altos. Para éste mismo gen, tampoco se recuperó la monofilia de las muestras uruguayas, ni la estrecha relación entre estas y *H. montforti* 2015-2D o algunas muestras de *H. kochi* 4747, 2319B, 3TK27 (Figura 20 y Anexo Figuras S4, S10).

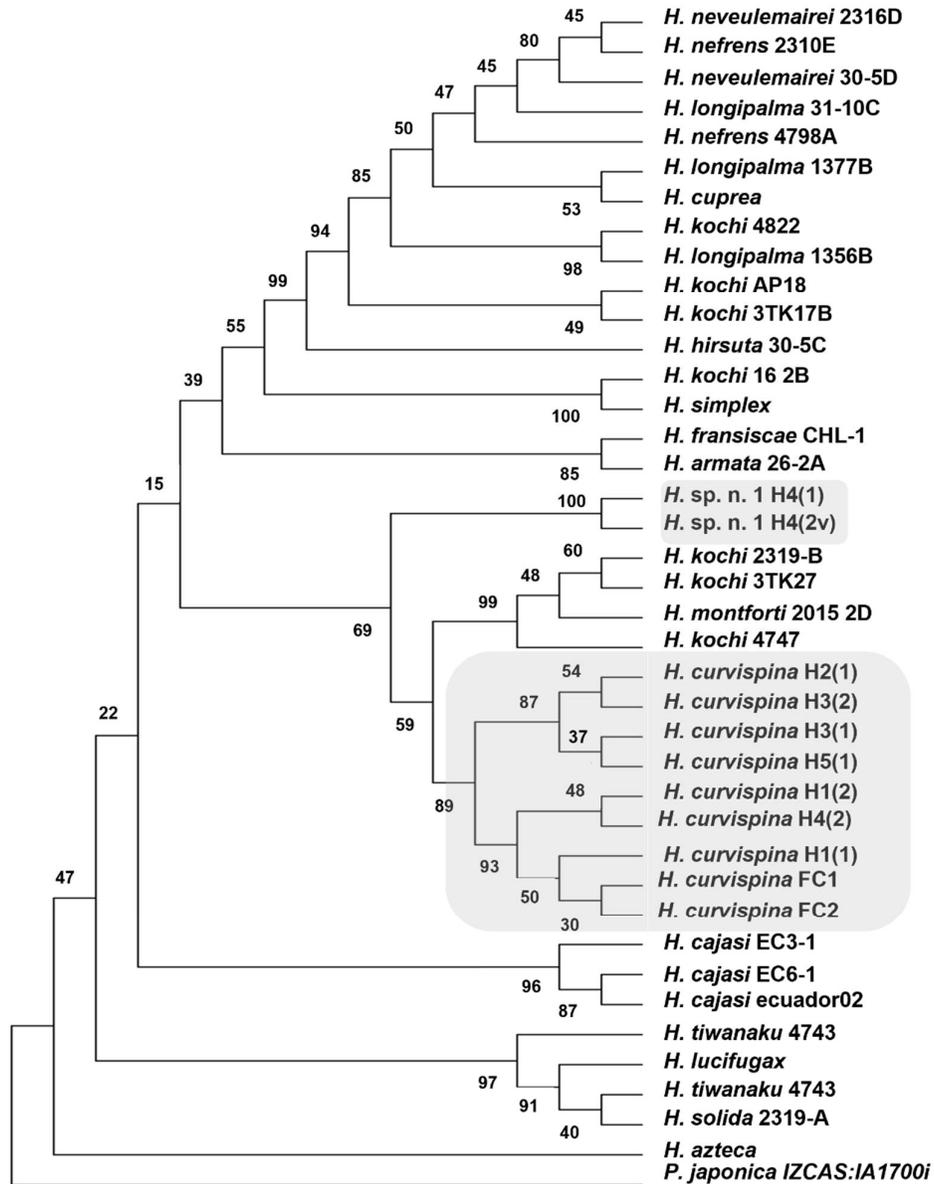


Figura 17. Filogenia de *Hyalella* reconstruida por Máxima Verosimilitud utilizando todos los especímenes uruguayos secuenciados para COI (369 pb) y veintiocho secuencias de *Hyalella* de América del Norte y del Sur y un grupo externo (*Platorchestia japonica*). Las muestras uruguayas, "complejo curvispina", se indican en color gris. Los valores de bootstrap están al lado de los nodos.

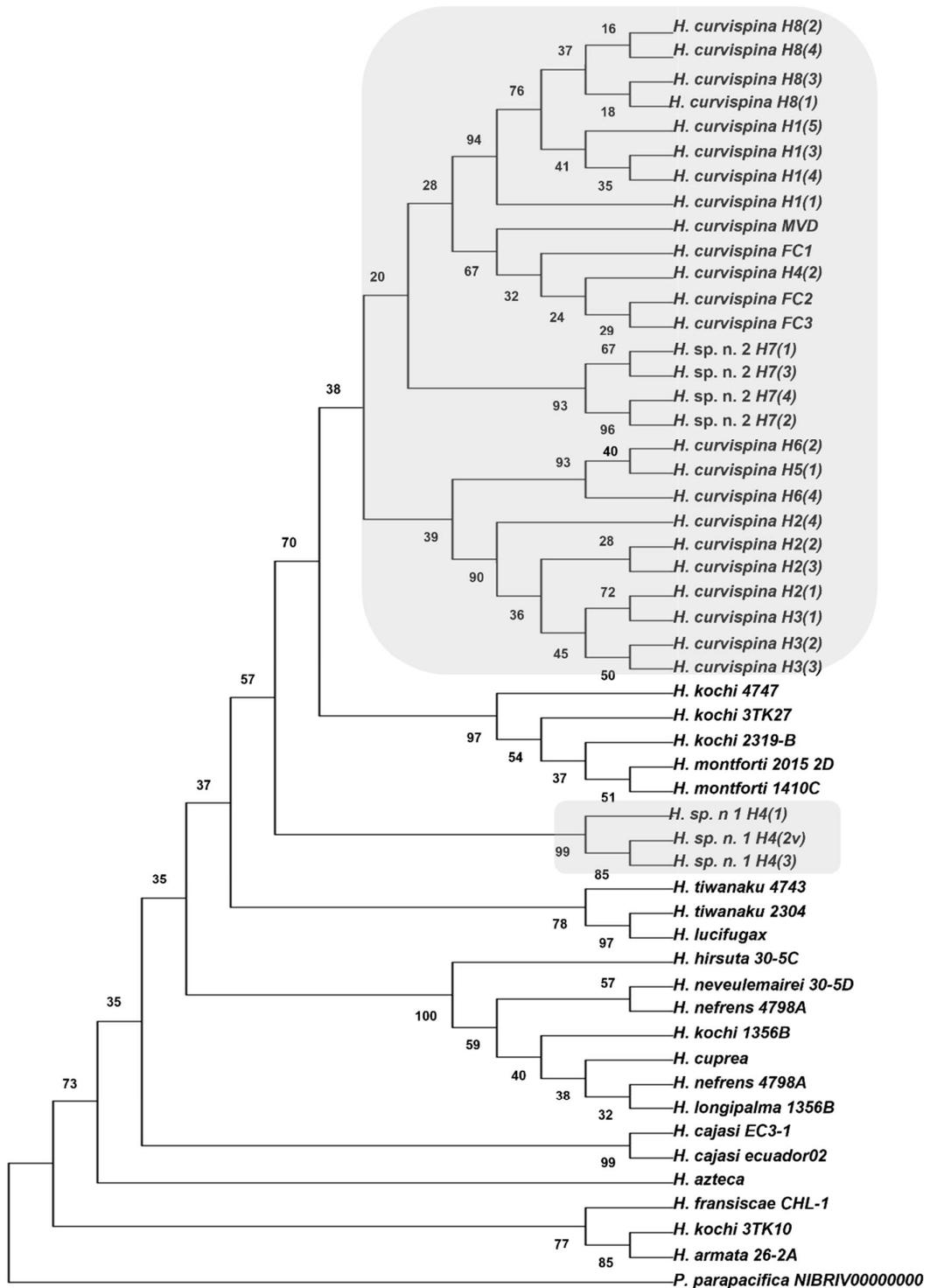


Figura 18. Filogenia de *Hyalella* reconstruida por Máxima Verosimilitud utilizando todos los especímenes uruguayos secuenciados para 12s (452 pb) y veintiuna secuencias de *Hyalella* de América del Norte y del Sur y un grupo externo (*Platorchestia parapacifica*). Las muestras uruguayas, "complejo curvispina", se indican en color gris. Los valores de bootstrap están al lado de los nodos.

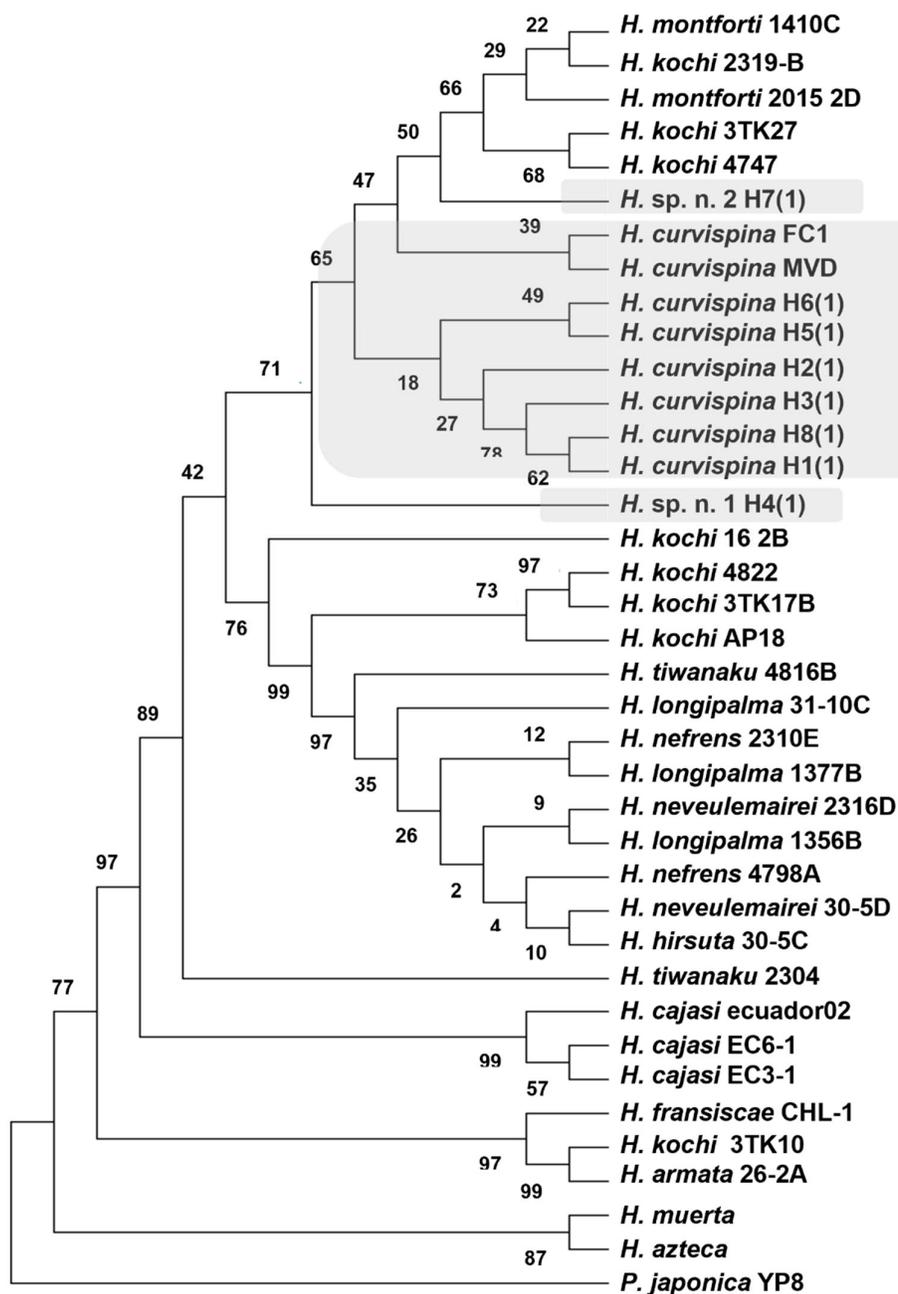


Figura 19. Filogenia de *Hyalella* reconstruida por Máxima Verosimilitud utilizando todos los especímenes uruguayos secuenciados para 28s (605 pb) y veintisiete secuencias de *Hyalella* de América del Norte y del Sur y un grupo externo (*Platorchestia japonica*). Las muestras uruguayas, "complejo curvispina", se indican en color gris. Los valores de bootstrap están al lado de los nodos.

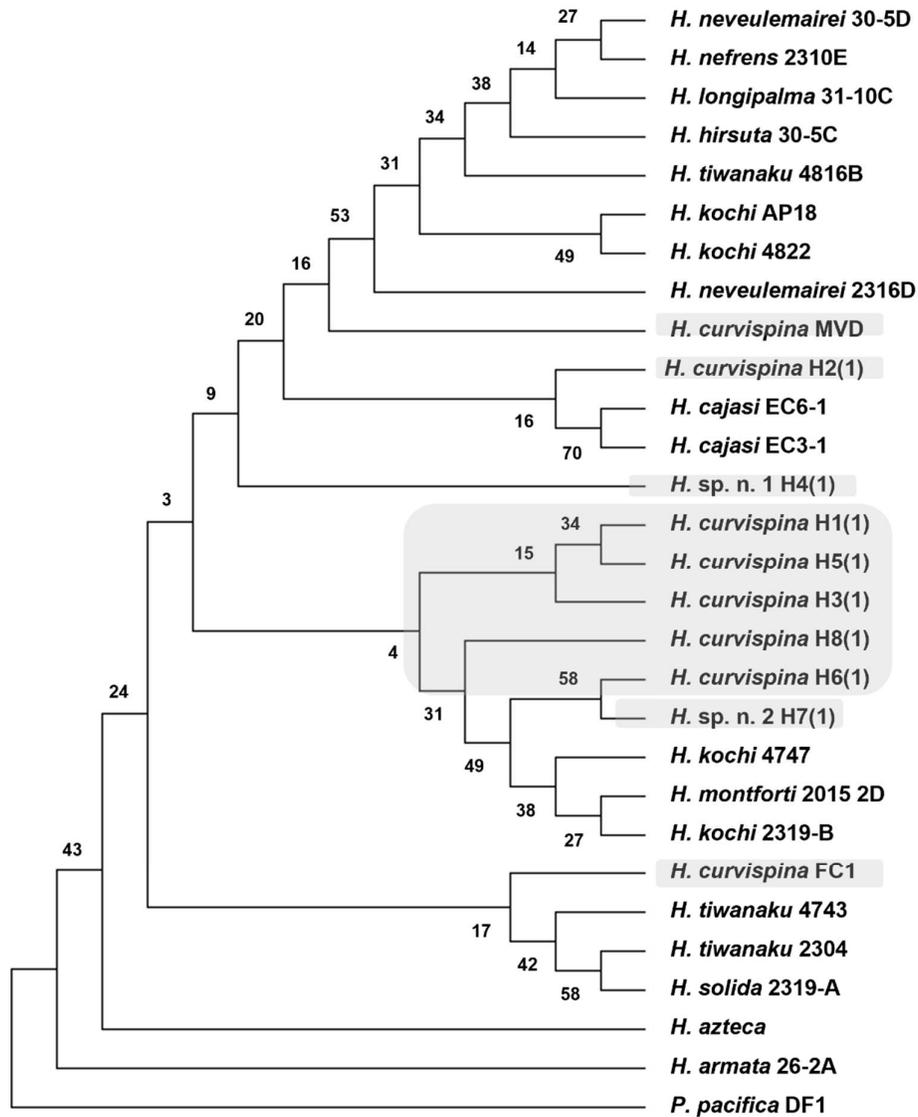


Figura 20. Filogenia de *Hyalella* reconstruida por Máxima Verosimilitud utilizando todos los especímenes uruguayos secuenciados para H3 (332 pb) y dieciocho secuencias de *Hyalella* de América del Norte y del Sur y un grupo externo (*Platorchestia pacifica*). Las muestras uruguayas, "complejo curvispina", se indican en color gris. Los valores de bootstrap están al lado de los nodos.

En la inferencia bayesiana el árbol de las especies obtenido considerando todos los marcadores, cada uno con su modelo de sustitución más apropiado, resuelve la mayoría de los nodos con mayores apoyos de probabilidad posterior. Se pudo determinar así: 1) la monofila de las muestras uruguayas junto con dos muestras de *H. kochi* 4747, 2319B y *H. montforti* 2015-2D, la posición basal de H4(1) respecto a este clado, y la monofilia recíproca de las muestras uruguayas sin H4(1) por un lado y de *H. montforti* 2015-2D con dos muestras de *H. kochi* 4747, 2319B por otro, 2) la posición basal de *H. azteca* y *H. armata* 26-2A dentro de las especies del género analizadas, 3) la monofila de otros dos grupos de especies *H. nefrens* 2310E -*H. sp.* "hirsuta" 30-5C - *H. neveulemairei* 30-5D - *H. kochi* AP18 y *H. cajasi* EC3-1 - *H. tiwanaku* 2304-1 (Fig. 21).

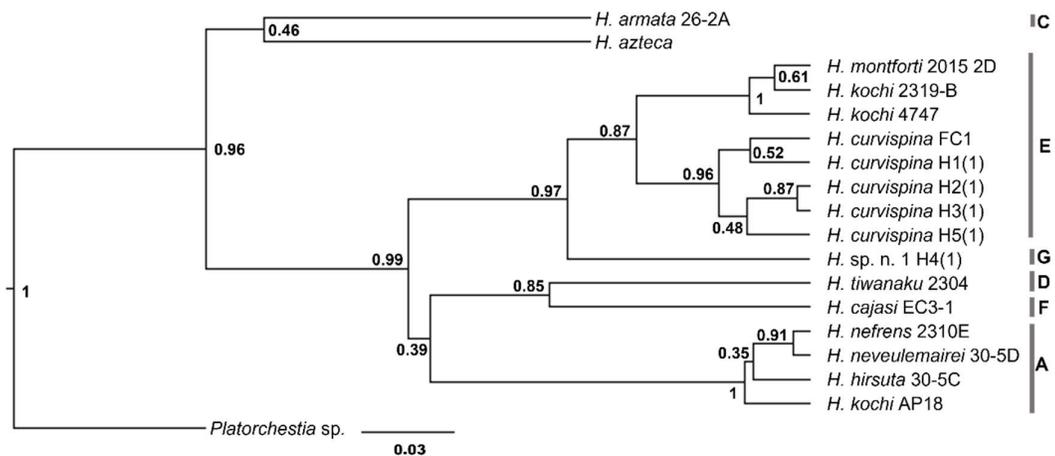


Figura 21. Filogenia de *Hyalella* reconstruida por análisis bayesiano. Las muestras de *H. curvispina* FC1, H1(1), H2(1), H3(1), H5(1) y *H. sp.n. 1* H4(1) son muestras uruguayas. Se incluyeron once secuencias de *Hyalella* de América del Norte y del Sur y grupos externos (género *Platorchestia sp.*). El árbol de consenso se basa en 1758 pb de conjuntos de datos concatenados COI, 12S, 28S y H3. Las probabilidades adicionales se indican junto a los nodos. Los clados de A a F se definieron en Zapelloni et al., 2021; Clade G fue propuesto en este estudio.

El árbol de especies obtenido a partir de los dos genes nucleares (28S y H3) y solo una mitocondrial (solo 12S y excluyendo COI) tiene la misma topología general y valores de probabilidad posterior más altos. Al incorporar la información de la muestra de Batoví (H7) se obtiene una mayor afinidad con *H. kochi* 4747, 2319B y *H. montforti* 2015-2D que con el grupo mayoritario de muestras uruguayas (Fig. 22).

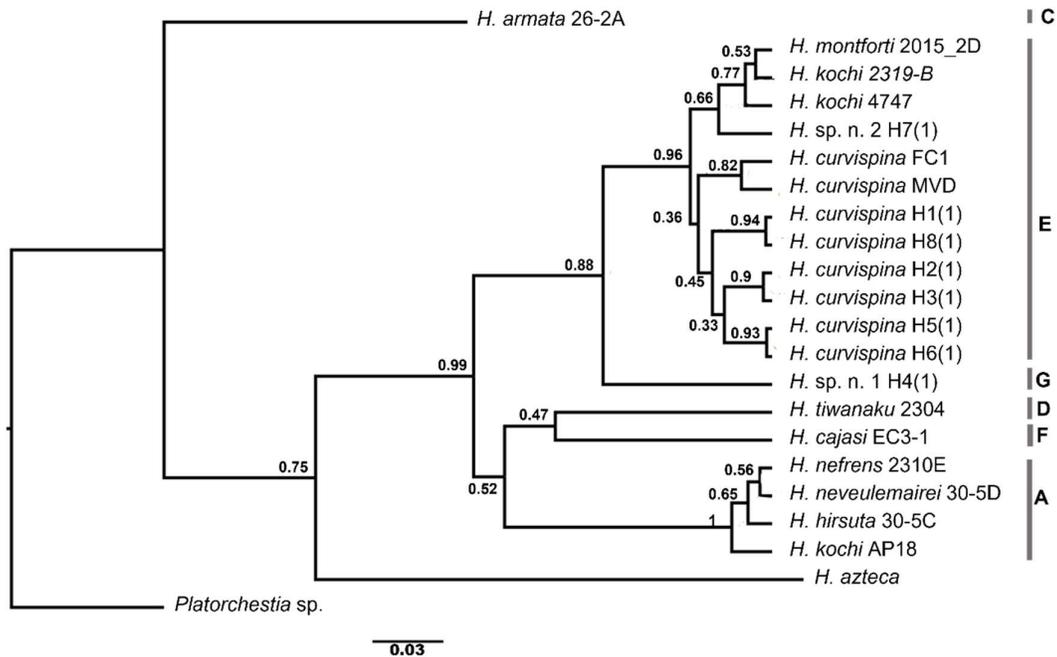


Figura 22. Filogenia de *Hyalella* reconstruida por análisis bayesiano. Muestras *H. curvispina* FC1, MVD, H1(1), H2(1), H3(1), H5(1), H6(1), H8(1), *H. sp. n. 1* H4(1) y *H. sp. n. 2* H7(1), son muestras uruguayas. Se incluyeron once secuencias de *Hyalella* de América del Norte y del Sur y un grupo externo (género *Platorchestia* sp.). Se muestra el árbol de consenso basado en 1389 pb de conjuntos de datos concatenados 12S, 28S y H3. Las probabilidades posteriores se indican junto a los nodos. Los clados de A a F se definieron en Zapelloni et al., 2021; Clade G fue propuesto en este estudio.

Las reconstrucciones de máxima verosimilitud mostraron resultados similares (Fig. S9 y Fig. S10) para cuatro o tres genes, respectivamente. La principal diferencia en ambos casos es la ausencia de monofilia recíproca entre los grupos *H. nefrens* 2310E - *H. hirsuta* 30-5C - *H. neveulemairei* 30-5D - *H. kochi* AP18 y *H. cajasi* EC3-1 - *H. tiwanaku* 2304.

Delimitación molecular de especies

Los resultados de la delimitación de especies moleculares se muestran en la Figura 23. Los resultados para los diferentes genes analizados de forma independiente son similares, aunque bastante disímiles de acuerdo con el método utilizado. COI fue el gen que mostró los resultados más desiguales entre los métodos. Entre los tres métodos probados, ASAP encontró más grupos (entre 3 y 18) en todos los genes y difiere más de los otros métodos.

H. armata 26-2a, *H. azteca*, *H. cajasi* EC3-1, *H. tiwanaku* 2304 y H4(1) (Lavelleja), se destacan como especies bien diferenciadas con alto apoyo estadístico. Para todos los

genes y métodos, la muestra H4(1) (Lavalleja) siempre fue claramente diferente del resto de las muestras uruguayas, a excepción del método ABGD aplicado a COI y concatenado con COI. Estos métodos también consideran a un grupo de especies diferentes: *H. kochi* AP18, *H. neveulemairei* 30-5D, *H. nefrens* 2310E y *H. hirsuta* 30-5C, como una sola especie. En este grupo se diferencia *H. kochi* AP18 analizando H3 y 28S (por ABGD) y *H. hirsuta* 30-5C analizando COI (por PTP y bPTP). ASAP excluye de este grupo a *H. kochi* AP18 y *H. hirsuta* 30-5C analizando COI y 12S. Las muestras uruguayas, excepto H4(1) (Lavalleja), generalmente se agrupan como una sola especie en COI, 12S y 28S con ABGD, PTP y bPTP, y las concatenadas sin COI (por PTP y bPTP). La muestra uruguaya H7(1) (Batoví) se agrupa como una sola especie junto con *H. montforti* 2015-2D, *H. kochi* 4747, 2319B para 28S (por ABGD) y como única especie para 12S (por ASAP) y para las concatenadas sin COI (por ABGD y ASAP). Por lo tanto, consideramos al morfo de Lavalleja (H4) y al morfo de Batoví (H7) como dos nuevas especies.

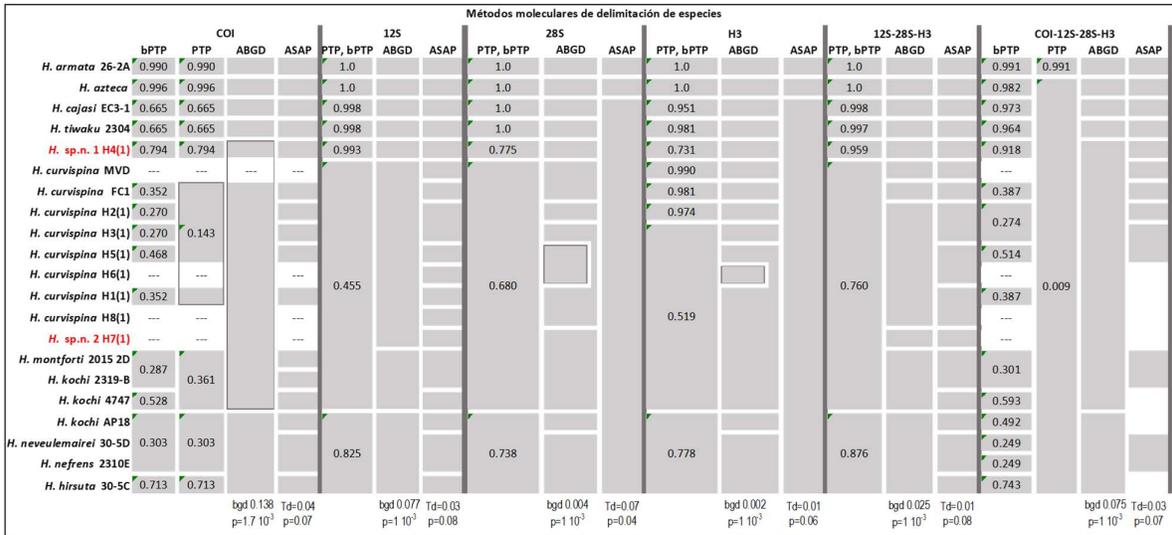


Figura 23. Métodos moleculares de delimitación de especies (bPTP, PTP, ABGD y ASAP) aplicados a genes COI, 12S, 28S y H3 individualmente y concatenados en el género *Hyalella*. Las muestras *H. curvispina* FC1, MVD, H1(1), H2(1), H3(1), H5(1), H6(1), H8(1), *H. sp.n. 1* H4(1) y *H. sp. n. 2* H7(1) son uruguayas. Los bloques grises o cajas grises representan los grupos de muestras identificados por estos métodos como una sola especie. Los valores dentro del recuadro son el soporte estadístico de estas agrupaciones por máxima verosimilitud (PTP) o bayesiano (bPTP). Para ABGD, barcode gap distance (bgd) y la partición inicial con máximo previo distancia (p) fueron especificados. Para ASAP, el valor p (p) y la distancia umbral (Td) para cada partición fueron especificadas. Las celdas en blanco (---) son aquellas que no se analizaron para ese marcador.

DISCUSIÓN

En este capítulo se evaluó por primera vez, la diversidad genética en base a cuatro loci en *Hyaella curvispina* y morfos similares previamente identificados en Uruguay. Este estudio es el primero que incluye especies de *Hyaella* al este de los Andes, es decir, del "complejo curvispina". De esta forma, se determinó i) el estatus parafilético del "complejo curvispina", ii) la posición filogenética en el marco de las hipótesis del género propuestas previamente, ii) la presencia de dos especies provisionales nuevas para Uruguay que probablemente sean especies crípticas.

Género *Hyaella* en Uruguay

La filogenia obtenida incorpora representantes del género *Hyaella* de Uruguay incluyendo a *H. curvispina* a la filogenia general propuesta previamente para el género. Como era de esperar, la topología general de las otras especies, no de las uruguayas, coincide con lo informado previamente por Zapelloni et al. (2021), que utilizó las mismas secuencias de *Hyaella*. Recuperamos los clados propuestos por Adamowicz et al., (2018) (excepto B, que no fue incluido) como monofiléticos con alto soporte. Al igual que en estudios previos, se registró que las especies *H. azteca* y *H. armata* (Clade C) son más basales que los clados del sur. La relación más cercana entre estas dos especies presenta un valor de probabilidad posterior inferior al 50%, lo que debe tomarse con precaución, como se observa en Zapelloni et al. (2021). Las especies sudamericanas están agrupadas e incluyen diferentes clados y muestras uruguayas. Sin embargo, las relaciones entre los grupos A, E, D y F no pudieron resolverse con un apoyo estadístico significativo (excepto para el grupo basal C).

El "complejo curvispina" forma un grupo monofilético con *H. montforti* 2015-2D y *H. kochi* 4747, 2319B, 3TK27, ambas correspondientes al clado E del Altiplano norte (Zapelloni et al., 2021). Sin embargo, *H. kochi* también se encuentra en otra parte del árbol filogenético, por lo que algunos de los "vouchers" considerados como *H. kochi* son probablemente especies crípticas. Por lo tanto, la estrecha relación observada entre *H. curvispina* y *H. kochi* (en sentido estricto) debe tomarse con precaución. En ambas reconstrucciones filogenéticas, todas las muestras asociadas a las *Hyaella* de Uruguay provienen de Perú (*H. montforti* 2015-2D y *H. kochi* 4747, 2319B, 3TK27), que se

encuentra geográficamente muy alejado. El estrecho vínculo entre las muestras de Perú y Uruguay puede reflejar el escaso conocimiento sobre el género, se hace necesario incluir muchos más representantes sudamericanos, además de los ya incluidos de Perú, Bolivia y Chile. En el futuro, esta información filogenética podría arrojar luz sobre la biogeografía histórica de *Hyaella* y la historia paleo climática del continente.

Por otro lado, se encontraron altas variaciones genéticas entre *H. curvispina* y los morfos asociados y dos nuevas especies. Consideramos que los especímenes recolectados en la localidad tipo de *H. curvispina*, que también tienen la morfología esperada, son de hecho topotipos de esta especie. Otras muestras, recolectadas en lugares distantes (excepto Batoví H7(1) y Lavallega H4(1) H4(2v)), muestran mayor afinidad con *H. curvispina*, con alto soporte estadístico en la filogenia de las especies que incluyen COI (96%).

De hecho, muchos de los morfos junto con *H. curvispina* son genéticamente idénticos en algunos de sus marcadores. La diferenciación genética encontrada entre la mayoría de ellos fue moderada, en el rango esperado para la diferenciación intraespecífica, y consistente entre la mayoría de los genes (Anexo Tablas S V, S VI, S VII, S VIII). Por lo tanto, proponemos que todos estos morfos son parte de la variación de *H. curvispina* generada en la región. Por otro lado, encontramos dos morfos de Lavallega, especímenes H4(1), H4(2v) y H4(3) (sólo para el gen 12S), y de Batoví, especímenes H7(1) y H7(2), H7(3) y H7(4) (sólo para el gen 12S) que muestran una mayor diferenciación que el resto de morfos (Fig. 21 y 22; Anexo Tablas S IV, S V, S VI, S VII), y convierten al “complejo *curvispina*” en parafilético. Aunque el COI mostró una diferenciación significativa entre los diferentes morfos, esto no es consistente con la información proporcionada por otro marcador mitocondrial, el 12S, ni por los marcadores nucleares. Proponemos mantener el nombre complejo *H. curvispina* para la mayoría de estas formas y sugerimos dos nuevas especies correspondientes a los morfos de Lavallega, especímenes H4(1), H4(2v) y H4(3)), y de Batoví, especímenes H7(1) y H7(2), H7(3) y H7(4), nombradas como *H. sp1* y *H. sp2* en las reconstrucciones filogenéticas. Las características morfológicas que diferencian a *H. sp. n. 1* de *H. curvispina* son sutiles, mientras que las características que diferencian a *H. sp. n. 2* de *H. curvispina* son más acentuadas y se detallan en el capítulo 3.

Todas las muestras uruguayas están más estrechamente relacionadas con el clado E (97%), por lo que podrían considerarse parte de ese clado. Las distancias genéticas entre clados medidas como K2P para 28S están en el rango de 1,1% a 6,4% corresponden al

rango de distancias interespecíficas (Adamowicz et al., 2018). La muestra *H. sp. n. 2*, H7(1), pertenece al clado E, con una distancia genética del 0,4%. Las restantes muestras de Uruguay, excepto *H. sp. n. 1*, pertenecen a este clado con una distancia del 1,1%. Además, sugerimos un nuevo clado, clado G, formado por *H. sp. n. 1*; la distancia genética entre este nuevo clado y el clado E es del 1,8%.

La información proporcionada por cada uno de los marcadores de forma independiente, y los marcadores en su conjunto, sugieren una diferenciación geográfica dentro del clado *H. curvispina* (parte del grupo E). Consideramos “el clado *H. curvispina*”, el clado que incluye la localidad tipo y localidades relacionadas, excluyendo *H. sp. n. 1* y la muestra *H. sp. n. 2*, estando las poblaciones más cercanas más asociadas genéticamente. Sin embargo, la relación entre estos “grupos geográficos” aún es incierta debido al bajo respaldo estadístico. Y los soportes bajos reflejarían una diferenciación reciente. Un enfoque multilocus, que incluya miles de marcadores (por ejemplo, obtenidos de aproximaciones RADseq y NGS), probablemente será útil para resolver el aspecto crítico de la filogeografía a escala fina necesario para determinar más detalles de esta diferenciación.

En la localidad de Lavalleja recolectamos tres muestras, dos de ellas con mayor divergencia genética (en marcadores mitocondriales y nucleares) respecto a la variación de la mayoría de las variantes/morfos uruguayas y la evaluación morfológica preliminar muestra diferencias entre esta muestra y *H. curvispina* (capítulo 2). Sugerimos que esta muestra, es decir, los especímenes H4(1), H4(2v) y H4(3), es una especie diferente *H. sp. n. 1*. La otra H4(2) presenta baja divergencia genética y corresponde morfológicamente a *H. curvispina*. Los análisis de delimitación de especies moleculares apoyan firmemente esta conclusión. Diferentes métodos identifican la muestra H4(1) como especie independiente para todos los genes excepto COI y su concatenación. Dado que esta muestra pertenece a una nueva especie, se confirma la existencia de especies simpátricas. Varios autores han observado distribuciones simpátricas en los dos complejos de especies evaluados a nivel molecular. En particular, las especies crípticas de *H. azteca* de América del Norte (Wellborn & Cothran, 2004; Witt & Hebert, 2000) y en especies de *Hyaella* de Brasil (da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a, 2009; da Silva Castiglioni & Bond Buckup, 2008b; González et al., 2006). Por otro lado, la muestra *H. sp. n. 2* H7 presenta mayor afinidad con dos muestras de *H. kochi* 4747, 2319B y *H. montforti* 2015-2D que con el resto de las muestras uruguayas. Aunque *H. sp. n. 2* (H7) se secuenció para

12S mitocondrial y marcadores nucleares y no para COI debido a problemas técnicos, proponemos que esta muestra sea una nueva especie ya que presenta diferencias morfológicas más acentuadas con respecto a *H. curvispina* que el resto de los morfos (Capítulo 1). Sin embargo, la mayoría de los análisis de diferenciación de especies moleculares no la discriminan como una especie diferente, sino que está integrada en el clado E. Sería necesario revisar la sistemática del grupo E en su conjunto y establecer límites de especies más claros o sugerir sinonimia a *H. montforti* (por el principio de prioridad del código de nomenclatura zoológica). En general, estos resultados resaltan la relevancia de incluir estudios de sistemática molecular en la determinación del género *Hyaella*.

Identificación de especies basada en estimaciones de divergencia genética

El criterio de umbral de selección de especies (Species Screening Threshold (SST)) (Witt et al., 2006) se ha utilizado en la sistemática molecular del género durante las últimas dos décadas (Dionne et al., 2011; Vergilino et al., 2012) y considera que las especies de *Hyaella* divergen entre sí en un 3,75% para las secuencias COI utilizando la distancia K2P (Kimura, 1980). Siguiendo este criterio, se podría considerar la presencia de especies crípticas para el complejo de especies de *H. curvispina*, particularmente seis especies de los morfos: H1, H2, H3, H4, H5 (excluyendo H7 no secuenciado para COI). Sin embargo, nuestro análisis realizado con un 369pb de COI no proporciona un apoyo filogenético sólido para esta delimitación.

Por otro lado, la comparación de la información proporcionada por COI con la de varios marcadores, tanto mitocondriales como nucleares, revela las dificultades específicas asociadas a este marcador. En primer lugar, las distancias genéticas en el marcador COI son prácticamente las mismas entre diferentes niveles de variación morfológica. En particular, se encuentran valores del orden del 4 al 29% entre especies poco diferenciadas morfológicamente? dentro del "complejo de curvispina", así como entre especies muy diferenciadas (algunas especies del "complejo de curvispina" con otras especies de *Hyaella*), o entre especies de *Hyaella* con el grupo externo. Esta condición puede deberse a la saturación (es decir, múltiples sustituciones en el mismo sitio en una secuencia conducen a una subestimación de las mutaciones que realmente ocurren) lo que conduce a una homoplasia y a una subestimación de los tiempos de divergencia entre los

haplotipos observados, particularmente para eventos filogenéticos más antiguos (Wilke et al., 2009). Sin embargo, al analizar el grado de saturación con el programa DAMBE, se observaron niveles bajos de saturación para todos los marcadores, incluido el COI con y sin la posición del tercer codón. La ausencia de saturación significativa-alta para COI podría deberse al tamaño de secuencia (369 pb), ya que la saturación en COI para *Hyaella* se ha registrado en tamaños de secuencia superiores a 500 pb (Major et al., 2013; Worsham et al., 2017; Zapelloni et al., 2021).

A su vez, el gen 12S brinda información diferente al COI, siendo que ambos genes son mitocondriales y están ligados físicamente ya que este genoma no se recombina (Meyer, 1993; Saldamando & Marquez, 2012). Aunque ambos marcadores comparten la historia evolutiva, el gen 12S es el más conservado dentro del genoma mitocondrial (Arif & Khan, 2009). Por lo tanto, a diferencia del COI, el 12S podría no estar saturado (Major et al., 2013; Witt & Hebert, 2000; Worsham et al., 2017) y ofrecer información más precisa a este nivel de comparación (Arbogast et al., 2002; Major et al., 2013). Por otro lado, las distancias genéticas por pares con todos los marcadores excepto COI (con genes nucleares, 12S o incluso la construcción concatenada de todos los genes) muestran diferentes niveles de variación dentro del género (es decir, intra e interespecífico) e intergénero (entre *Hyaella* y grupos externos). Las distancias genéticas por pares calculadas con COI (Anexo Tabla S IV) no muestran este patrón, y las variaciones dentro y entre géneros son de magnitud similar. Por lo tanto, creemos que para *Hyaella*, el 12S es más confiable que COI y que el criterio de SST debe aplicarse a otro marcador.

Se registró poca diferenciación en los marcadores evaluados en este estudio, tanto en ambos nucleares como en el mitocondrial 12S. Sin embargo, la diferenciación mitocondrial a nivel de COI es alta (de hecho saturada), lo que también se ha reportado en estudios realizados para otros complejos (Major et al., 2013; Witt & Hebert, 2000; Worsham et al., 2017). Estos resultados pueden reflejar los procesos actuales de diferenciación del género entre regiones, en principio dominados por eventos de colonización y extinción (Zapelloni et al., 2021). De manera similar (Duan et al., 2000), y a pesar de la diferencia en la escala geográfica de los estudios, también se encuentran variantes únicas y altos niveles de variación entre poblaciones separadas por 50-200 km. Esta diferenciación está asociada a la variación geográfica. Las poblaciones más cercanas están más vinculadas filogenéticamente, lo que sugiere cierta conectividad entre poblaciones y diversificación en presencia de flujo de genes dentro de *H. curvispina*.

De acuerdo con estudios previos sobre otros complejos de especies del género, encontramos que el “complejo curvispina” es parafilético, muy relacionado con la especie *H. kochi* 4747, 2319B, 3TK27 (sensu lato) y *H. montforti* 2015-2D. Estos resultados sugieren que la convergencia adaptativa y morfológica en este grupo es alta (Adamowicz et al., 2018) y el “complejo curvispina” no es una excepción. En particular, la variación morfológica no coincide con la diferenciación genética, que puede estar relacionada con la selección recurrente de morfologías similares frente a los mismos desafíos ecológicos diferentes. A diferencia de la filogenia genética, todas las muestras de Uruguay, incluidas *H. sp. n. 1* y *H. sp. n. 2*, son más similares morfológicamente entre sí y *H. curvispina* que a *H. kochi* 4747, 2319B, 3TK27 y *H. montforti* 2015-2D. La especialización del hábitat y los regímenes tróficos podrían explicar la convergencia de morfotipos observados en especímenes de *Hyalella* de Uruguay. *Hyalella curvispina* tiene hábitos de alimentación variados: trituradora, depredadora, raspadora y recolectora-recolectora (Cummins et al., 2005; Giorgi & Tiraboschi, 1999; Saigo et al., 2009; Wantzen & Wagner, 2006). También son alimento para otros macroinvertebrados, peces, anfibios y aves (Colla & César, 2019). Como mecanismo de defensa contra la presión de la depredación, las especies de *Hyalella* ocupan diferentes hábitats (Wellborn, 1995). Habitan una variedad de ambientes de agua dulce como lagos, estanques y arroyos, adhiriéndose a la vegetación y excavando en los sedimentos del fondo, donde son miembros importantes de la fauna bentónica (da Silva Castiglioni & Bond Buckup, 2008b; Grosso & Peralta, 1999; Wellborn, 1995). Por otro lado, las dos especies filogenéticamente más relacionadas con el complejo *H. curvispina* (es decir, *H. kochi* y *H. montforti*) comparten algunas características morfológicas con él. En cuanto a *H. kochi*, ambas especies tienen una superficie corporal lisa, la cara interna del propodito del gnatopodo 1 con siete setas, la presencia de setas curvas en la rama interna del uropodo 1. Sin embargo, la principal característica que distingue a estas dos especies es la presencia de seis pares (del segmento 2 al 7) de branquias esternas en *H. curvispina*, mientras que *H. kochi* tiene solo cinco pares (del segmento 3 al 7), y la consistencia de este carácter lo hace relevante en las relaciones evolutivas dentro del género (González & Watling, 2001). En comparación con *H. montforti*, ambas especies tienen seis pares de branquias esternas y setas curvas en la rama interna del uropodo 1. Aun así, la característica principal que distingue a estas dos especies es el cuerpo con rebordes dorso-posteriores en el segmento de pereón 7, pleonito 1, 2 y 3 en *H. montforti*. Dado que estas formas tienen un ancestro común y viven en diferentes ambientes, es

razonable pensar que las características morfológicas comunes reflejan inercia filogenética, mientras que otras serían adaptaciones locales.

DESCRIPCIÓN DE DOS NUEVAS ESPECIES DE *HYALELLA* PARA EL URUGUAY

INTRODUCCIÓN

Hyaella Smith, 1874 es el único género de anfípodo de agua dulce epígeo conocido en Sudamérica. El género es el único miembro de la familia Hyaellidae Bulyčeva, 1957, endémica de las regiones Neártica y Neotropical, donde se encuentra ampliamente distribuida y diversificada (Alonso & Jaume, 2017). América del Sur alberga casi el 80% de la diversidad del género (Reis et al., 2020). La mayor diversidad se alcanza en Brasil, que alberga 34 especies, aunque el lago Titicaca con 21 especies de las cuales 15 son endémicas concentra el mayor número en relación con un área (Alonso & Jaume, 2017; Limberger et al., 2022; Talhaferro et al., 2021b). Sin embargo, descripciones recientes de nuevas especies para el Neotrópico, sugieren que la diversidad en América del Sur aún está lejos de ser completamente conocida ya que la sistemática de este género es compleja (Rodrigues et al., 2017). Sobre todo por su morfología con caracteres muy similares y poco significativos, lo que dificulta la identificación y diferenciación de especies (Charqueño-Celis et al., 2012).

Estudios moleculares realizados en el capítulo anterior sugieren la presencia de dos nuevas especies de *Hyaella* para el Uruguay. *Hyaella* sp. n. 1, que se encuentra registrada para la localidad de Aguas Blancas en el Departamento de Lavalleja y *Hyaella* sp. n. 2, registrada para el cerro Batoví en el Departamento de Tacuarembó. Ambas especies representan el segundo y tercer registro de especies de *Hyaella* (?) comprobado taxonómicamente para el país luego de *H. curvispina* registrada por Shoemaker en el año 1942 para Paso de la Arena en el Departamento de Montevideo.

En el presente capítulo se describirá a cada una de estas especies aportando información morfológica y molecular. Se discutirá sobre las afinidades taxonómicas de cada una y se presentará una clave para la identificación de las tres especies de *Hyaella* para el Uruguay. Los resultados de este estudio contribuyen a mejorar el conocimiento sobre la diversidad de especies de *Hyaella* en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procedencia de los especímenes

El material utilizado en el presente estudio proviene de salidas de campo realizadas en el período 2016-2020. Los ejemplares fueron recolectados y acondicionados como se detalla en la sección materiales y métodos del capítulo 1. Para fines comparativos se utilizaron ejemplares de *Hyaella curvispina* provenientes de la localidad tipo que se encuentran depositados en la colección científica de la Sección Entomología de la Facultad de Ciencias. La clave dicotómica será realizada utilizando la aplicación DELTA (DEscription Language for Taxonomy) versión 1.02 (2088) (Dallwitz et al., 1999).

Sitios de recolecta

Aguas Blancas-Lavalleja- sitio H4 (capítulo 2)

El sitio de recolecta se localiza en Aguas Blancas, departamento de Lavalleja (34°30.4'36"S-55°22.3'14"W) (Fig. 24). El muestreo se realizó en la laguna del embalse de la represa Aguas Blancas. Con un tamaño de 118.000m³, fue construida en el año 1943 (Santos & Gonzalez Márquez, 2021) sobre las aguas del arroyo Mataojo, ubicada en una zona de sierras denominada Abra de Zabaleta, perteneciente a la Sierra de las Ánimas, zona de origen volcánico que forma parte de un ramal de la Cuchilla Grande (Chebataroff & Zavala de Alcuri, 1975) (Fig. 25). Los ejemplares de *Hyaella* se recolectaron en la zona litoral la que presenta una vegetación de *Juncus* sp. y *Eichornia* sp.

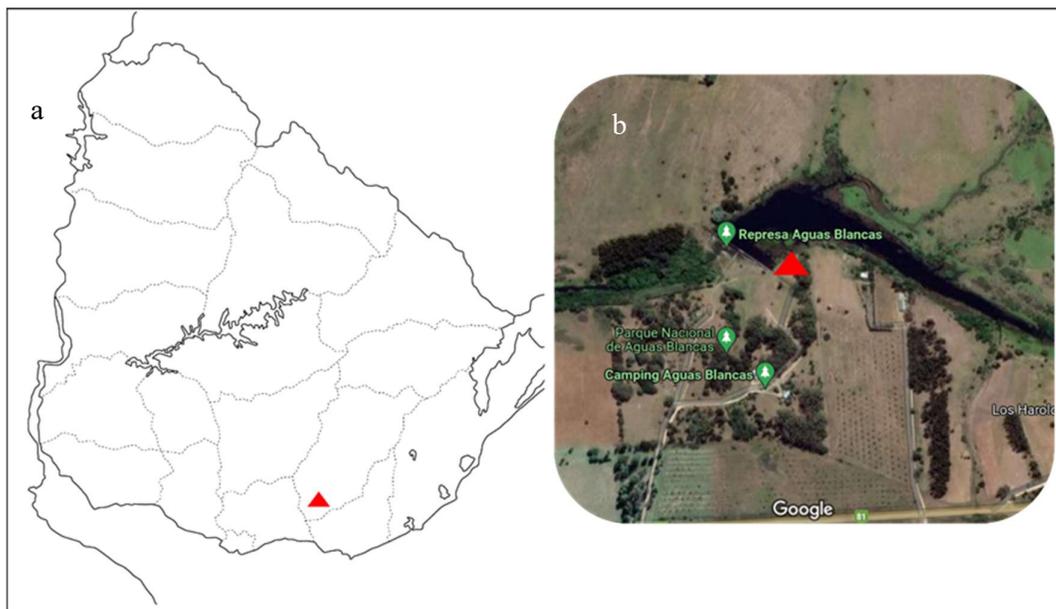


Figura 24. A: ▲ Aguas Blancas, Departamento de Lavalleja, Uruguay. B: ▲ ubicación del sitio de recolecta en el embalse de la represa de Aguas Blancas.



Figura 25. Sitio de recolecta, laguna del embalse de la represa Aguas Blancas, Lavalleja, Uruguay.

Cerro Batoví, Tacuarembó

Los ejemplares de *Hyalella* se recolectaron en una laguna localizada en la base del cerro Batoví, Departamento de Tacuarembó, (31°52'55.7"S-56°0'42.7"W) (Fig. 26).

Geográficamente, el Cerro Batoví (Fig. 27) se localiza en la Cuchilla de Haedo que cruza el territorio Norte del Uruguay y separa las aguas que confluyen en el Río Negro de las que lo hacen en el Río Uruguay (Evia & Gudynas, 2000).

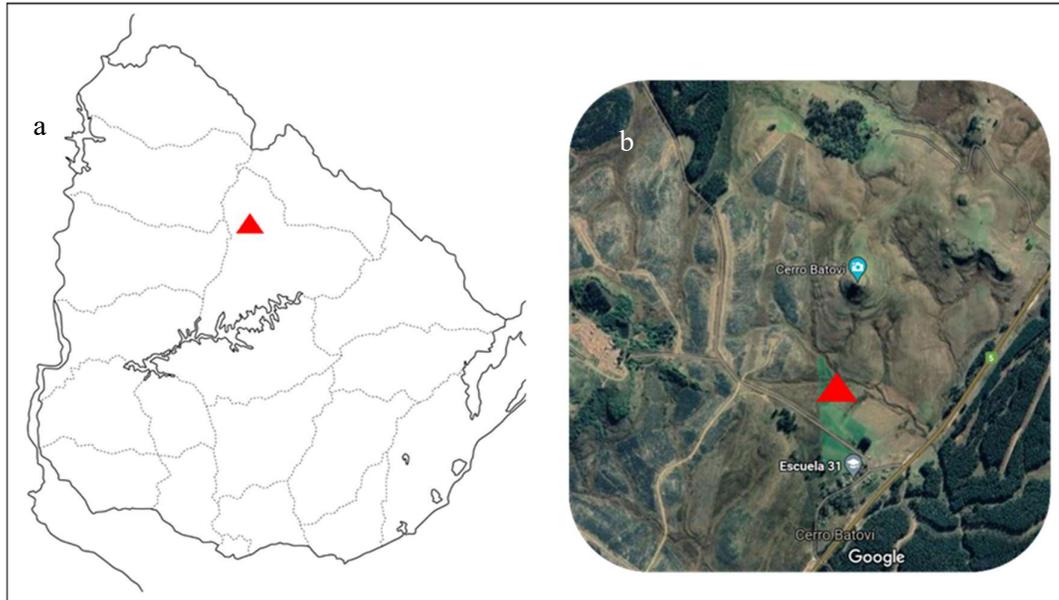


Figura 26. A: ▲ Cerro Batoví, Departamento de Tacuarembó, Uruguay. B: ▲ ubicación del sitio de recolecta en laguna al pie del cerro Batoví.



Figura 27. Sitio de recolecta, laguna al pie del cerro Batoví, Tacuarembó, Uruguay.

Trabajo de laboratorio

En el laboratorio, las muestras de cada especie de *Hyalella* fueron cuantificadas y se les midió el largo total (LT) y longitud del cefalotórax (LC) por medio de un microscopio estereoscópico con escala milimétrica.

En la descripción de las especies sólo se utilizaron ejemplares adultos, los que fueron sexados diferenciándolos en machos, (Fig. 28 a) aquellos individuos con gnatopodos desarrollados y en hembras (Fig. 28 b) individuos con gnatopodos poco desarrollados y con presencia de oostegitos entre el segundo y quinto segmento torácico.



Figura 28. Ejemplares de *Hyalella*, A: macho; B: hembra.

Los especímenes fueron disecados y montados como se detalla en la sección materiales y métodos del capítulo 2. Las características morfológicas que se tienen en cuenta en las descripciones de las especies son: la forma de los siguientes apéndices: antenas, anténulas, piezas bucales (maxila I, maxila II, maxilipedo y mandíbula), gnatopodos, placas coxales, uropodos y telson; el tipo y disposición de las setas presentes y la talla: longitud total (LT) y longitud del cefalotórax (LC)(mm) (González et al., 2006; González & Watling, 2003b; Streck Marx et al., 2017; Zimmer et al., 2009).

Las características morfológicas fueron observadas en microscopía óptica e ilustradas bajo cámara clara. Las imágenes se escanearon y editaron a través de la aplicación Gimp 2.10.22. Cada apéndice disecado fue fotografiado bajo el microscopio óptico utilizando la aplicación Dinocapture 2.0 (<https://www.dinolite.us>) y los individuos enteros, fueron fotografiados bajo microscopio estereoscópico Leica M205 A, conectado con una cámara Leica DMC 2900 habilitada con un software Leica LAS-X-Z y SW. El material tipo fue

depositado en la Colección de Crustáceos de la Sección Entomología de la Facultad de Ciencias (CCSEFC).

RESULTADOS

Hyaella sp. n. 1

Material examinado: Holotipo macho adulto, Talla: (LC): 0,8mm, (LT): 6,8mm, Departamento de Lavalleja. Aguas Blancas en laguna de la represa Aguas Blancas (34°30.4'36"S 55°22.3'14"W), CCSEFC 384. Waller, A & cols. Paratipos: 14 machos, 15 hembras. Departamento de Lavalleja. Aguas Blancas en laguna de la represa Aguas Blancas (34°30.4'36"S 55°22.3'14"W), CCSEFC 385.

Localidad tipo: Departamento de Lavalleja, Aguas Blancas, en laguna de la represa Aguas Blancas, (34°30.4'36"S 55°22.3'14"W).

Diagnosis:

Superficie corporal lisa. Ojos redondos y pigmentados. Antena 1 más corta que antena 2. Mandíbula con proceso molar desarrollado y con una seta plumosa entre el molar y el proceso incisivo. Maxila 1 con lóbulo externo provisto de ocho setas serradas, con un pliegue longitudinal medio semejante a un aguijón que llega hasta el palpo; lóbulo interno con dos setas plumosas en el ápice y setas simples en el margen; palpo corto uniarticulado. Maxila 2 con lóbulo interno más corto que el lóbulo externo; lóbulo interno con setas paposerradas dispuestas en doble fila y con tres setas plumosas, dos en la parte media del margen interno y una en la parte inferior del margen interno; lóbulo externo con setas simples apicales. Gnatopodo 1, placa coxal más alta que ancha, propodo con borde palmar recto; cara interna del propodo con una fila oblicua de seis setas serradas. Gnatopodo 2 subquelado, coxa, isquio y mero con setas simples en el margen posterior; carpo más ancho que largo; propodo rectangular, palma regular con espinas simples. Pereiopodos 3 y 4 de similar constitución con tres setas simples en margen posterior del mero, carpo y propodo sin setas en el margen posterior. Uropodo 1, rama interna del macho con una seta curva en el margen interior. Uropodo 3, pedúnculo cuadrangular, más largo que ancho y más ancho que la rama, en el margen distal con seis setas cuspidadas cortas y

largas y una seta cuspidada corta en ángulo superior externo. Rama externa con entre cuatro y seis setas apicales simples y una seta cuspidada. Telson más largo que ancho, abovedado, con tres setas cuspidadas apicales dispuestas en dos grupos y dos setas simples dispuestas en la mitad superior. Branquias esternas en los segmentos 2 a 7.

Descripción

Macho Holotipo CCSEFC 384. (Fig. 29a y 30a) Talla (LC): 0,8 mm (LT): 6,8 mm. Variación: Paratipos:15 Talla media \pm desvío estándar (LC): 0,8 \pm 0,18mm (LT): 7 \pm 1,8mm.

Superficie corporal lisa. Placas epimerales lisas y acuminadas. Coxa 1 a 4 sub iguales en tamaño y forma contiguas. Ausencia de acuminación en las coxas. Coxa 1 más larga y ancha que las coxas 2 y 3. Coxa 4 más ancha y corta que las anteriores. Coxa 5 y 6 más anchas que largas. Coxas 5 y 7 excavadas ventralmente.

Cabeza de similar tamaño que el primer y segundo segmento torácico, con un pequeño rostro. Ojos pigmentados, medianos, ovoides y localizados detrás de la inserción de las antenas 1 y 2.

Antena 1 (Fig. 29b) menos de la mitad de la longitud del cuerpo, más corta que la antena 2, pedúnculo más corto que la cabeza, con segmento 1 con una seta cuspidada en el borde inferior, más corto que el segmento 2 y de similar tamaño que el segmento 3. Flagelo con 11 antenitos más largo que el pedúnculo. “Aesthetascs” (Fig. 29c y 30b) presentes en el flagelo, desde el antenito 4 hasta el último.

Antena 2 (Fig. 29d) menos de la mitad de la longitud del cuerpo, pedúnculo delgado con grupo de setas, de similar tamaño que la cabeza, articulo 4 más corto que el articulo 5. Flagelo con 13 antenitos, segmento basal ligeramente alargado.

Mandíbula (Fig. 29e y 30c) mandíbula básica de anfípodo (de acuerdo a Watling, 1993); sin palpo, incisivo dentado; “lacinia mobilis” izquierda con tres dientes; con una seta plumosa entre “lacinia mobilis” y proceso molar, proceso molar grande cilíndrico y triturador.

Labro (Fig. 29f y 30d) margen distal recto con ángulos superiores redondeados cubierto de setas en la superficie ventral y dorsal.

Labio inferior (Fig. 29g y 30e) con lóbulos externos levemente redondeados, setas en el borde medio de ambos lóbulos.

Maxila 1 (Fig. 29h y 30f) Lóbulo externo en su mitad proximal provisto de un pliegue donde nace el palpo, con ocho setas serradas en el ápice, con un pliegue longitudinal medio semejante a un agujón que llega hasta el palpo; lóbulo interno más corto que el externo con dos setas plumosas en el ápice y setas simples en el margen. Palpo corto uniarticulado con sétulas en el margen externo.

Maxila 2 (Fig. 29i y 30g) con lóbulo interno más corto que el lóbulo externo. Lóbulo externo con setas simples apicales. Lóbulo interno con setas papposerradas dispuestas en doble fila y con tres setas plumosas, dos en la parte media del margen interno y una en la parte inferior del margen interno.

Maxilípedo (Fig. 29j y 30h) Lóbulo interno con tres setas cuspidadas y una serie de 7 a 9 setas simples, largas, en el margen interno. Lóbulo externo de igual tamaño o mayor que el lóbulo interno con setas simples en el margen. Palpo con tres segmentos portando setas simples, tercer segmento con tres setas plumosas en el borde apical y una cercana el ángulo interno. Dáctilo de largo similar al tercer segmento, con setas cortas simples y una seta simple larga.

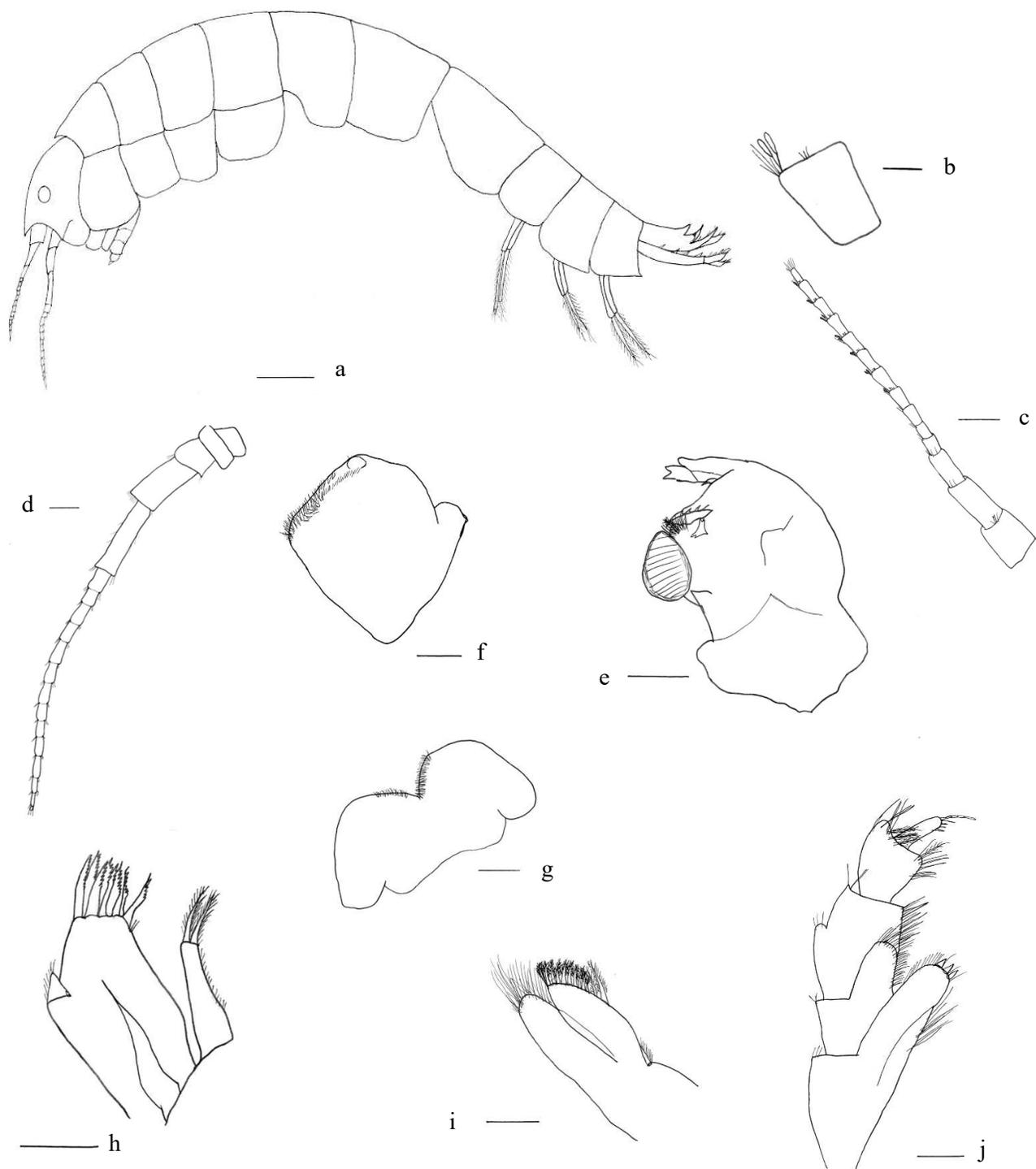


Figura 29. *Hyalella* sp. n. 1, macho. a, habitus; b, antena 1; c, “aesthetascs” en antenito 4 de antena 1; d, antena 2; e, mandíbula; f, labro; g, labio inferior; h, maxila 1; i, maxila 2; j, maxilípedo. Escala (a): 1 mm; (b): 0,01mm; (c-j): 0,1 mm.



Figura 30. *Hyalella* sp. n. 1, macho. a, habitus; b, “aesthetascs” en antenito 4 de antena 1; c, mandíbula; d, labro; e, labio inferior; f, maxila 1; g, maxila 2; h, maxilípodo. Escala (b): 0,01mm; (c-h): 0,1 mm.

Gnatopodo 1 (Fig. 31a, b y 32 a,b) subquelado, basi, isquio y mero con setas simples. Carpo más largo que ancho y más largo que propodo, margen posterior del lóbulo posterior con una fila de denticulos en “comb scale” y una fila de setas serradas. Propodo rectangular “hammer shaped”, con borde palmar recto, cara ventral con fila oblicua de seis setas serradas, margen posterior y ventral con denticulos en “comb scale” y una seta cuspidada en el ángulo anterior; dactilo robusto con setas simples.

Gnatopodo 2 (Fig. 31c y 32c) subquelado, isquio y mero con setas simples en el margen distal, carpo más ancho que largo, lóbulo posterior alargado, margen distal del lóbulo con denticulos y setas simples; propodo rectangular, palma regular con espinas simples; dactilo robusto con una seta simple larga.

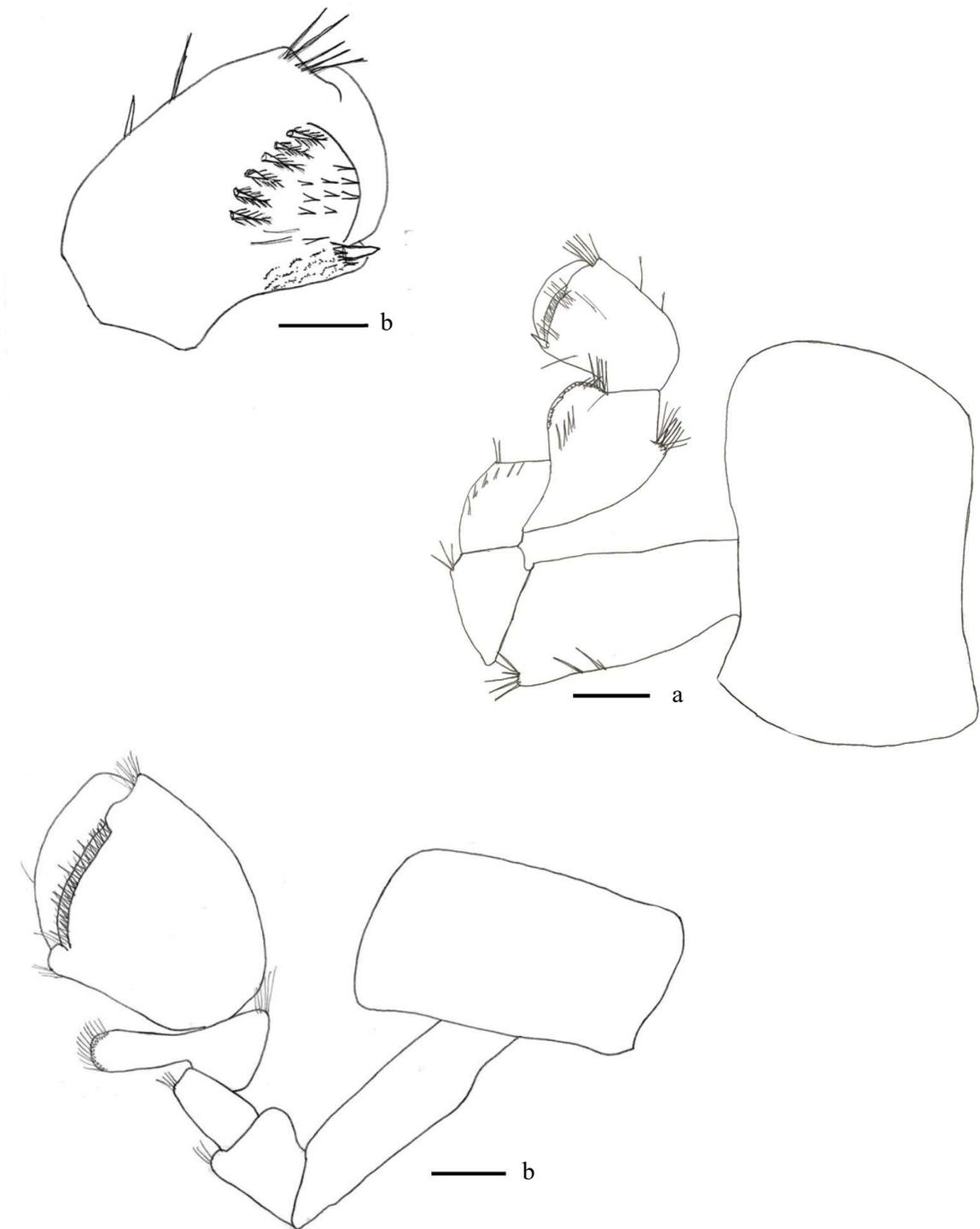


Figura 31. *Hyalella* sp. n. 1, macho. a, gnatopodo 1; b, detalle cara ventral de propodito y dactilo de gnatopodo 1; c, gnatopodo 2. Escala: (a): 0,2mm; (b-c): 0,1mm.

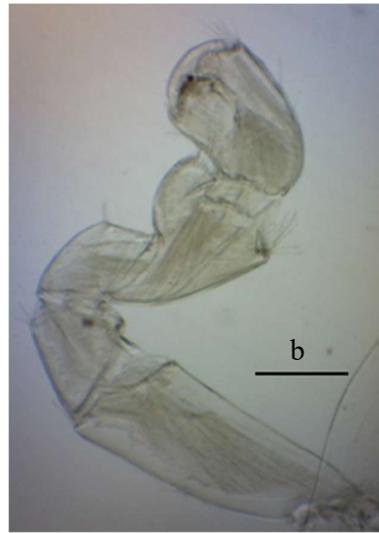
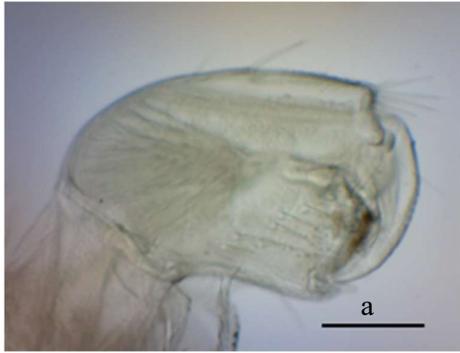


Figura 32. *Hyalella* sp. n. 1, macho. a, gnatopodo 1; b, detalle cara ventral de propodito y dactilo de gnatopodo 1; c, dactilo, propodo y carpo de gnatopodo 2. Escala: (a): 0,2mm; (b-c): 0,1mm.

Pereiopodos 3 al 7 (Fig. 33a y b) pereiopodos 3 y 4 de similar constitución con tres setas simples en margen posterior del mero y con tres setas simples en el ángulo posteroinferior, carpo y propodo sin setas en el margen posterior y con dos o tres setas simples en el ángulo posterodistal, dactilo menos de la mitad de la longitud del propodo con dos setas basodactilares. Pereiopodos 5 a 7 de similar estructura, mero con dos o cuatro setas simples en el margen posterior y un grupo de tres o cuatro setas simples en el ángulo posterodistal, carpo y propodo sin setas en el margen posterior y con un grupo de entre tres y cinco setas simples en el ángulo posterodistal; dactilo menos de la mitad de la longitud del propodo con entre cinco y siete setas basodactilares.

Pleopodos (Fig. 33c y 34c) con pedúnculo más corto que las ramas; rama externa e interna de igual tamaño (entre 11 y 13 segmentos) con setas plumosas en los márgenes.

Uropodo 1 (Fig. 33d y 34d) con pedúnculo más largo que las ramas con seis setas cuspidadas; exopodito más corto que endopodito con cuatros setas cuspidadas en el margen y una seta cuspidada apical; endopodito con tres setas cuspidadas en el margen, seta curva apical bien desarrollada seguida por una seta cuspidada y tres setas cuspidadas pequeñas, ápice con una seta cuspidada.

Uropodo 2 (Fig. 33e y 34e) más pequeño que uropodo 1, pedúnculo más corto que las ramas con cuatro setas cuspidadas. Exopodito y endopodito subiguales, endopodito con tres setas cuspidadas, ápice con tres setas cuspidadas, exopodito con tres setas cuspidadas en el margen y tres en el ápice.

Uropodo 3 (Fig. 33f y 34f) más pequeño que uropodo 2, pedúnculo cuadrangular, más largo que ancho y más ancho que la rama, en el margen distal con seis setas cuspidadas cortas y largas y una seta cuspidada corta en ángulo superior externo. Endopodito ausente, exopodito uniarticulado con entre cuatro y seis setas apicales simples y una seta cuspidada.

Telson (Fig. 33g y 34g) más largo que ancho, aboveado, con dos setas cuspidadas con seta accesoria a un lado y con una seta cuspidada con seta accesoria al otro lado en el borde superior; tres setas plumosas a lo largo de los bordes laterales.

Branquias coxales en los segmentos 2 a 6, branquias esternales en los segmentos 2 a 7.

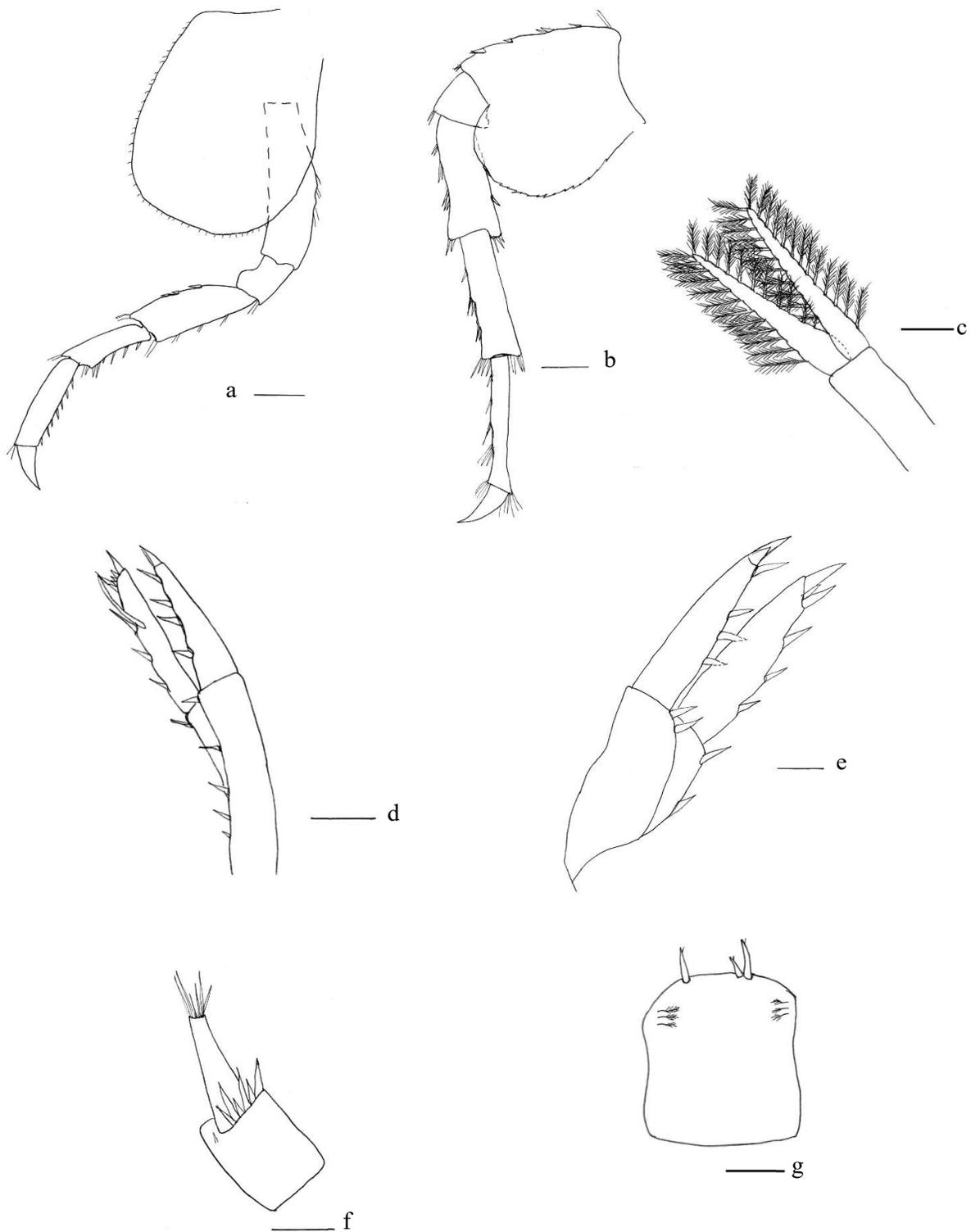


Figura 33. *Hyalella* sp. n. 1, macho. a, pereopodo 3; b, pereopodo 7; c, pleopodo; d, uropodo 1; e, uropodo 2; f, uropodo 3; g, telson. Escala: (a-c): 0,2 mm; (d-g): 0,1mm.

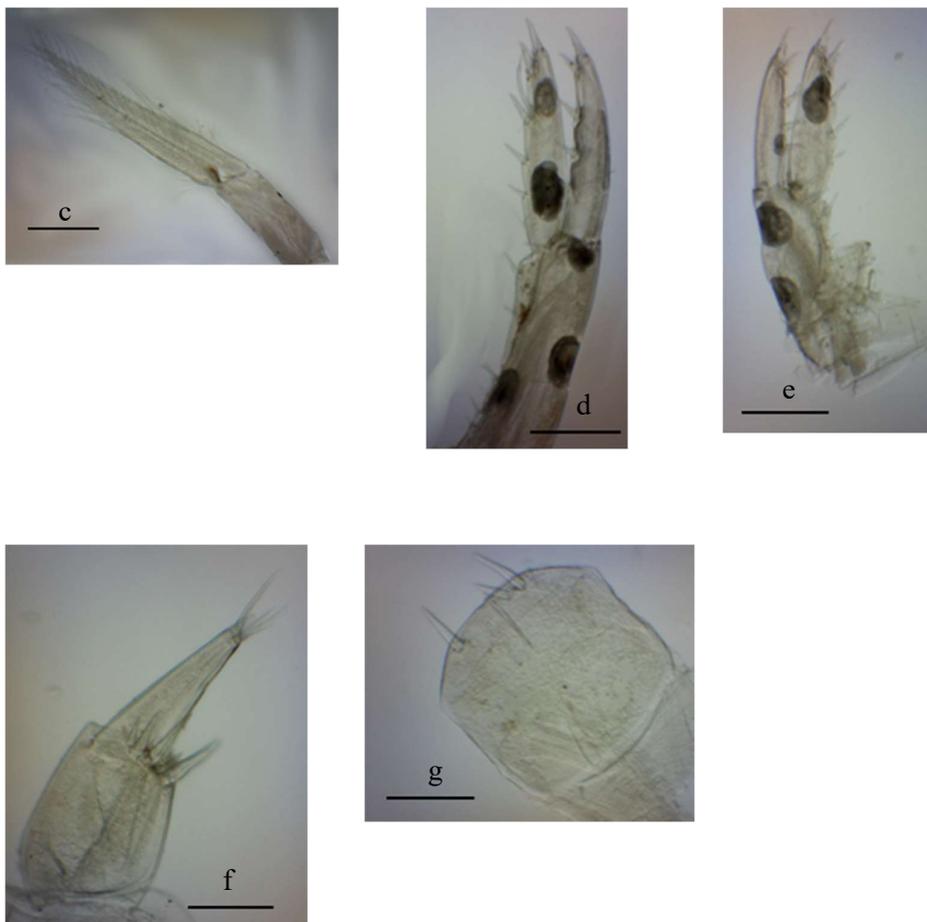


Figura 34. *Hyalella* sp. n. 1, macho. c, pleopodo; d, uropodo 1; e, uropodo 2; f, uropodo 3; g, telson. Escala: (c-g): 0,1mm.

Hembra. Paratipo CCSEFC 385. Talla (LC): 0,8 mm; (LT): 8,2 mm. Variación: Paratipos: 14. Talla media \pm desvío estándar (LC): $0,7 \pm 0,1$ mm; (LT): 8 ± 1 mm.

Habitus (36a) similar al del macho exceptuando las siguientes características: Gnatopodo 1 (Fig. 35a y 36b) menos robusto, carpo más largo que ancho con el lóbulo distal posterior provisto de setas serradas dispuestas en fila y con cuatro setas plumosas internas en la base del lóbulo y cinco setas plumosas cerca del borde distal posterior del carpo; propodo con el borde palmar recto, ángulo palmar con una espina cuspidada, cara interna con una fila de seis setas serradas, áreas con dentículos “comb scale” sobre los márgenes externos e internos. Gnatopodo 2 (Fig. 35b y 36c) similar al gnatopodo 1, carpo con el lóbulo posterior más desarrollado y con dos setas simples internas en la base del lóbulo; propodo más largo y angosto que el gnatopodo 1, cara interna con dos setas serradas. Uropodo 1 (Fig. 35c y 36d) sin seta curva en el endopodito.

Información molecular

Como se indicó en el capítulo 2, esta especie *Hyaella* sp. n. 1 surge a partir de análisis filogenéticos moleculares y de la implementación de diferentes criterios de delimitación de especies. Para la misma se han generado secuencias parciales de los genes COI, 12S, 28S y H3 disponibles en GenBank (Números de acceso: MZ754525; MZ750926; MZ750899; MZ736859). Las secuencias para los haplotipos de la misma localidad tipo están disponibles en GenBank COI (Números de acceso: MZ754525; MZ754527) 12S (MZ750928; MZ750925; MZ750927).

En las reconstrucciones filogenéticas realizadas en el capítulo 2, *Hyaella* sp. n. 1 se posiciona como parafilético con respecto al resto de las especies que forman el “complejo curvispina” (Fig. 17, 18, 19 y 20), formando un clado independiente denominado clado G (Fig. 21 y 22).

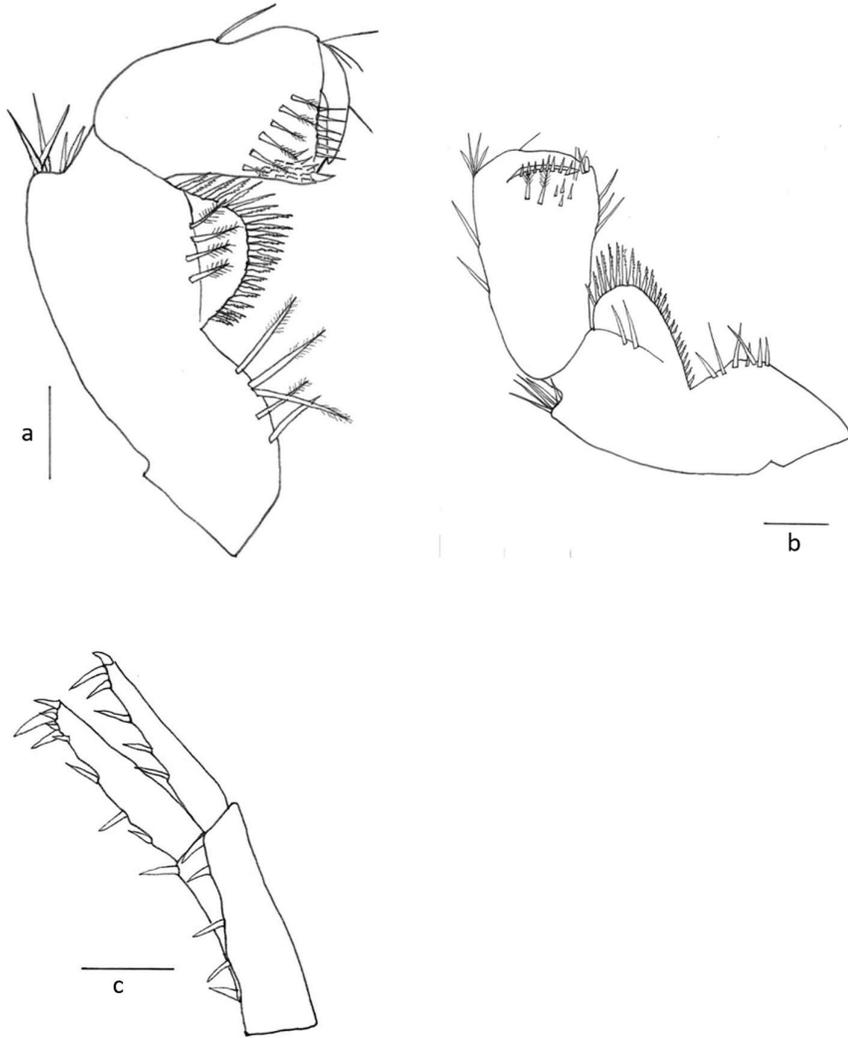


Figura 35. *Hyalella* sp. n. 1, hembra. a, gnatopodo 1; b, gnatopodo2; c, uropodo 1. Escala: (a-c): 0,1 mm.

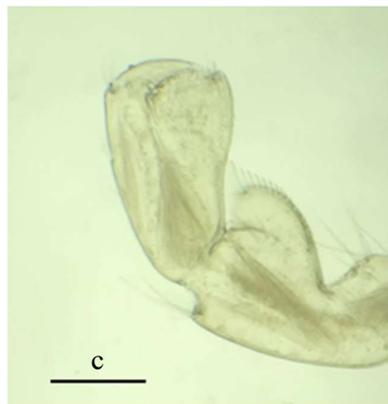


Figura 36. *Hyalella* sp. n. 1, hembra. a, habitus; b, gnatopodo 1; c, gnatopodo2; d, uropodo 1. Escala: (b-d): 0,1 mm.

***Hyalella* sp. n. 2**

Material examinado: Holotipo macho adulto, Talla: (LC): 1mm, (LT): 9mm, Departamento de Tacuarembó. Cerro Batoví. (31°52'55.7"S 56°0'42.7"W) en laguna al pie del cerro. CCSEFC 386. Waller, A & cols. Paratipos: 9 machos, 15 hembras. Departamento de Tacuarembó. Cerro Batoví. (31°52'55.7"S 56°0'42.7"W) en laguna al pie del cerro. CCSEFC 387.

Localidad tipo: Departamento de Tacuarembó. Cerro Batoví. (31°52'55.7"S 56°0'42.7"W) en laguna al pie del cerro.

Diagnosis:

Superficie corporal lisa. Ojos redondos y pigmentados. Antena 1 más corta que antena 2. Mandíbula con proceso molar desarrollado y con tres setas plumosas entre el molar y el proceso incisivo. Maxila 1 con lóbulo externo provisto de siete setas serradas, con un pliegue longitudinal medio semejante a un aguijón que llega hasta el palpo; lóbulo interno con dos setas plumosas en el ápice y setas simples en el margen; palpo corto uniarticulado. Maxila 2 con lóbulo interno más corto que el lóbulo externo; lóbulo interno con setas paposerradas dispuestas en doble fila y con dos setas plumosas en el margen; lóbulo externo con setas simples apicales. Gnatopodo 1, placa coxal más ancha que alta, propodo con borde palmar recto; cara interna del propodo con una fila oblicua de seis setas serradas. Gnatopodo 2 subquelado, basi, isquio y mero con setas simples en el margen distal, carpo más ancho que largo; propodo oblongo, palma regular con espinas simples. Pereiopodos 3 y 4 de similar constitución con cuatro setas simples en margen posterior del mero, carpo y propodo sin setas en el margen posterior. Uropodo 1, rama interna del macho con una seta curva en el margen interior. Uropodo 3, pedúnculo cuadrangular, más largo que ancho y más ancho que la rama, en el margen distal con seis setas cuspidadas cortas y largas y una seta cuspidada corta en el margen lateral. Rama externa con entre cuatro y seis setas apicales simples y una seta cuspidada. Telson abobeado, con múltiples setas cuspidadas y dos setas plumosas en cada extremo del borde. Branquias esternales en los segmentos 2 a 7.

Descripción

Macho. Holotipo CCSEFC 386. (Fig. 37a y 38a) Talla (LC): $0,8 \pm 0,1\text{mm}$ (LT): $7 \pm 0,9\text{mm}$ (n:10). Variación: Paratipos: 10. Talla media \pm desvío estándar (LC): $0,7 \pm 0,1\text{mm}$ (LT): $8 \pm 0,9\text{mm}$.

Superficie corporal lisa. Placas epimerales lisas y no acuminadas. Coxa 1 a 4 sub iguales en tamaño. Ausencia de acuminación en las coxas. Coxa 1 más corta y ancha que las coxas 2 y 3. Coxa 4 más ancha y larga que las anteriores. Coxa 5 más pequeña. Coxas 5 y 6 más anchas que largas. Coxa 7 excavada ventralmente. Cabeza de similar tamaño que el primer y segundo segmento torácico, sin rostro. Ojos pigmentados, medianos, ovoides y localizados detrás de la inserción de las antenas 1 y 2.

Antena 1 (Fig. 37b) menos de la mitad de la longitud del cuerpo, más corta que la antena 2, pedúnculo más corto que la cabeza, con segmento 1 con dos setas cuspidadas en el borde inferior, de similar longitud que el artículo 2 y que el segmento 3. Flagelo con 11 antenitos más largo que el pedúnculo. “Aesthetascs” (Fig. 37c y 38b) presentes en el flagelo, desde el antenito 4 hasta el último.

Antena 2 (Fig. 37d) menos de la mitad de la longitud del cuerpo, pedúnculo delgado con grupo de setas, de similar tamaño que la cabeza, segmento 4 más corto que el segmento 5 del pedúnculo. Flagelo con entre trece y quince antenitos.

Mandíbula (Fig. 37e y 38c) mandíbula básica de anfípodo (de acuerdo a Watling, 1993); sin palpo, incisivo dentado; “lacinia mobilis” izquierda con tres dientes; con tres setas plumosas entre “lacinia mobilis” y proceso molar, proceso molar grande cilíndrico y triturador.

Labro (Fig. 37f y 38d) margen distal redondeado cubierto de setas en la superficie ventral y dorsal.

Labio inferior (Fig. 37g y 38e) con lóbulos levemente rectangulares, setas en el borde distal de ambos lóbulos, sin muescas ni excavaciones.

Maxila 1 (Fig. 37h y 38f) Lóbulo externo en su mitad proximal provisto de un pliegue donde nace el palpo, con doble fila de siete setas serradas una en el ápice, y la otra por debajo, a la altura del palpo; con un pliegue longitudinal medio semejante a un agujón que llega hasta el palpo; lóbulo interno más corto que el externo con dos setas plumosas

en el ápice y setas simples en el margen. Palpo corto uniarticulado con sétulas en el margen externo.

Maxila 2 (Fig. 37i y 38g) con lóbulo interno más corto que el lóbulo externo. Lóbulo externo con setas simples apicales. Lóbulo interno con setas paposerradas y setas simples dispuestas en fila y con dos setas plumosas en el margen interno.

Maxilípedo (Fig. 37j y 38h) Lóbulo interno con tres setas cuspidadas y una serie de 7 a 9 setas simples, largas, en el margen interno. Lóbulo externo de mayor tamaño que el lóbulo interno con setas simples en el margen. Palpo con tres segmentos portando setas simples. Dáctilo de largo similar al tercer segmento, con setas simples.

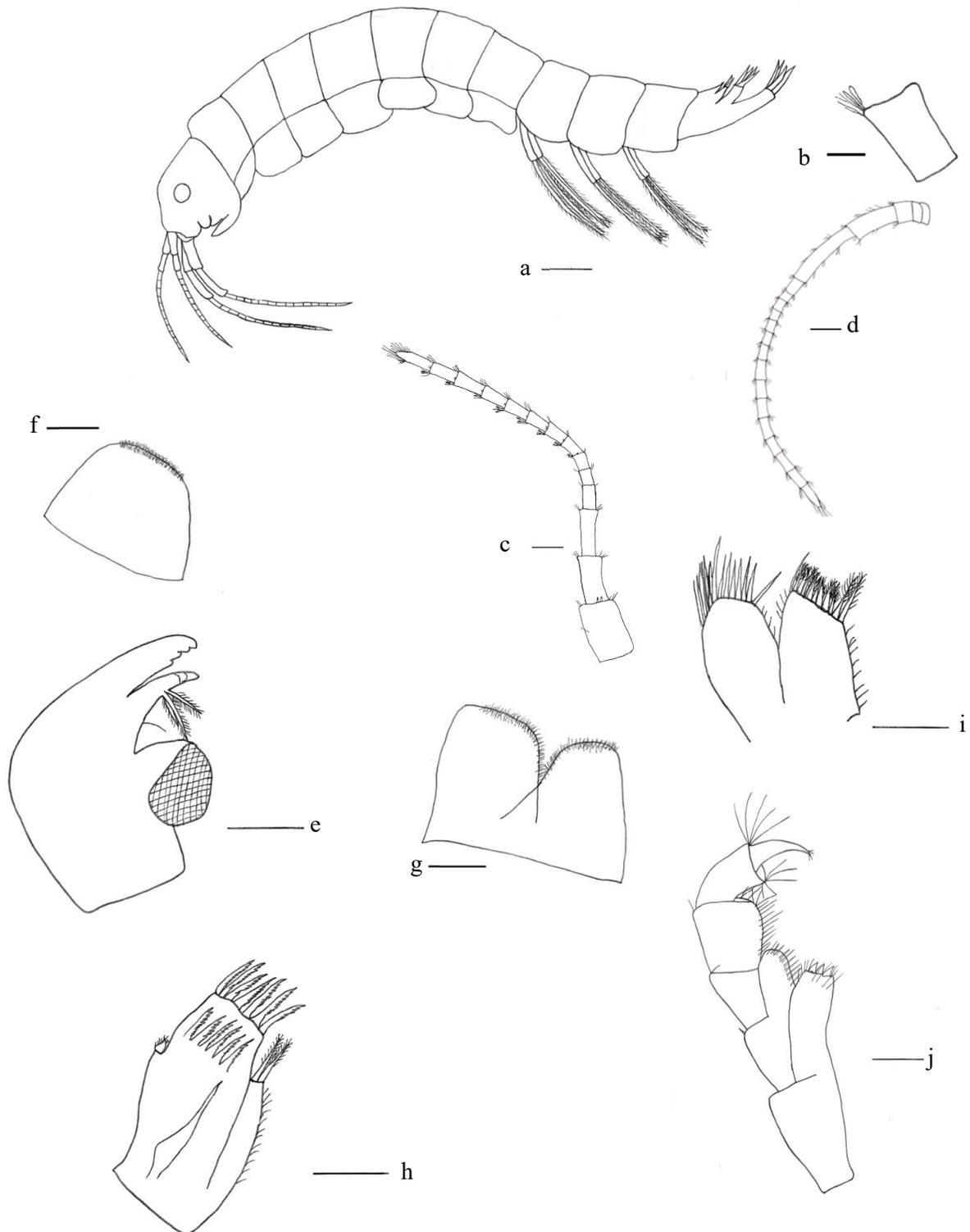


Figura 37. *Hyalella* sp. n. 2, macho. a, habitus; b, antena 1; c, “aesthetascs” en antenito 4 de antena 1; d, antena 2; e, mandíbula; f, labro; g, labio inferior; h, maxila 1; i, maxila 2; j, maxilípodo. Escala (a): 1mm, (b): 0,01mm, (c-j): 0,1 mm.

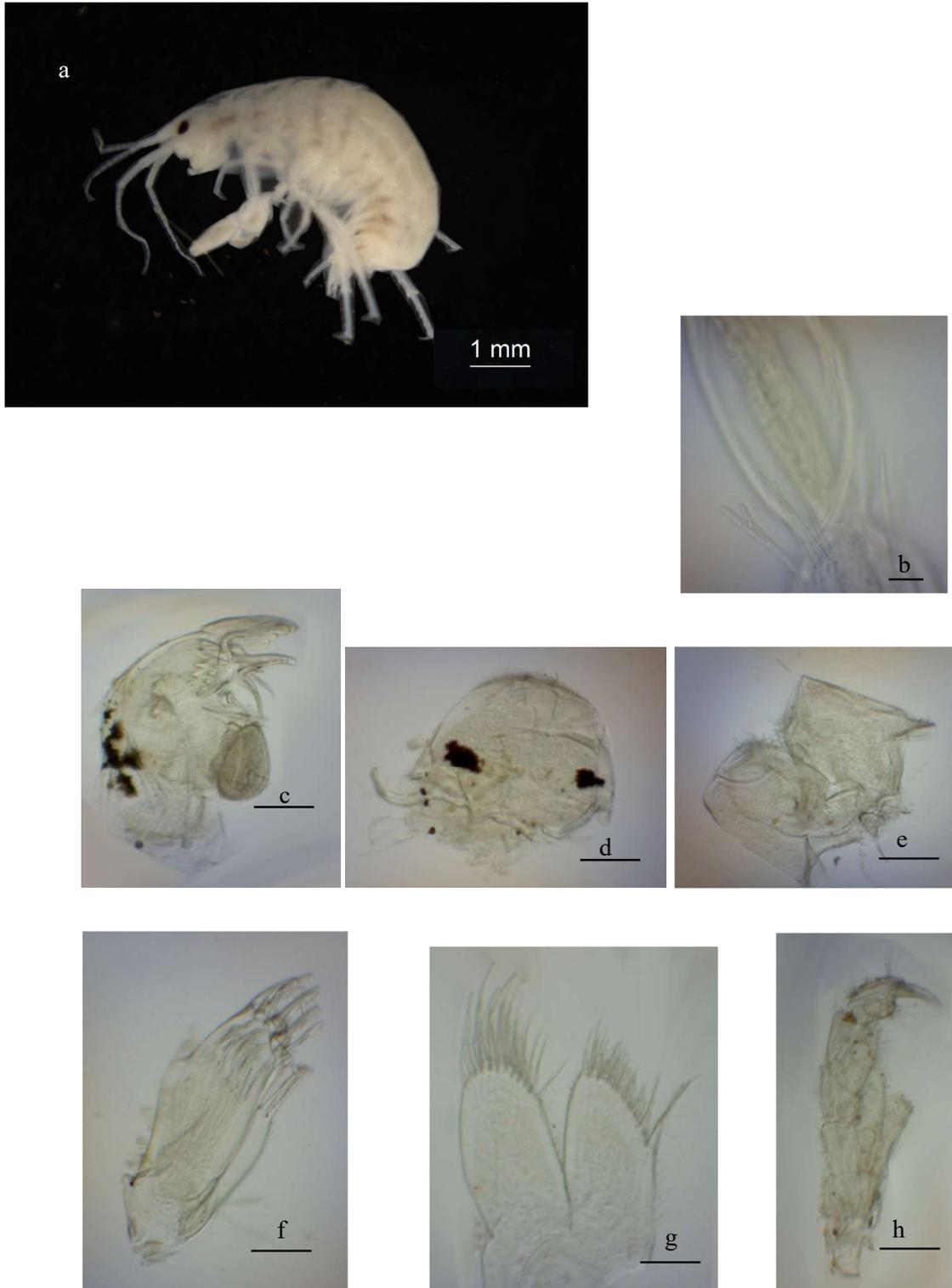


Figura 38. *Hyalella* sp. n. 2, macho. a, habitus; b, “aesthetascs” en antenito 4 de antena 1; c, mandíbula; d, labro; e, labio inferior; f, maxila 1; g, maxila 2; h, maxilípodo. Escala (a): 1mm, (b): 0,01mm, (c-h): 0,1 mm.

Gnatopodo 1 (Fig. 39a, b y 40 a, b) subquelado, basi, isquio y mero con setas simples en margen distal. Carpo más largo que ancho y más largo que propodo, margen anterodistal del lóbulo con una fila de setas serradas. Propodo rectangular “hammer shaped”, con borde palmar recto, cara ventral con fila oblicua de seis setas serradas, márgenes distal y proximal con dentículos en “comb scale” y una seta cuspidada en el ángulo anterodistal; dácilo robusto con setas simples.

Gnatopodo 2 (Fig. 39c y 40c) subquelado, basi, isquio y mero con setas simples en el margen distal; carpo más ancho que largo, lóbulo posterior alargado, margen posterior del lóbulo con dentículos y setas simples; propodo oblongo, palma regular con espinas simples; dácilo robusto sin setas.



Figura 39. *Hyalella* sp. n. 2, macho. a, gnatopodo 1; b, detalle cara ventral de propodito y dactilo de gnatopodo 1; c, gnatopodo 2. Escala: (a) 0,2 mm; (b-c): 0,1mm.



Figura 40. *Hyalella* sp. n. 2, macho. a, gnatopodo 1; b, detalle cara ventral de propodito y dactilo de gnatopodo 1; c, gnatopodo 2. Escala: (a) 0,2 mm; (b-c): 0,1mm.

Pereiopodos (Fig. 41a y b) pereiopodos 3 y 4 de similar constitución con cuatro setas simples en margen posterior del mero y con tres setas simples en el ángulo posterodistal, carpo y propodo sin setas en el margen posterior y con tres o cuatro setas simples en el ángulo posterodistal; dactilo menos de la mitad de la longitud del propodo con tres setas basodactilares. Pereiopodos 5 a 7 de similar estructura, mero con tres setas simples en el margen posterior y un grupo de tres o cuatro setas simples en el ángulo posterodistal, carpo y propodo sin setas en el margen posterior y con un grupo de entre tres y cinco setas simples en el ángulo posterodistal; dactilo menos de la mitad de la longitud del propodo con entre cinco y siete setas basodactilares.

Pleopodos (Fig. 41c y 42c) con pedúnculo más corto que las ramas; rama externa e interna de igual tamaño (entre 11 y 13 segmentos) con setas plumosas en los márgenes.

Uropodo 1 (Fig. 41d y 42d) con pedúnculo más largo que las ramas con cuatro setas cuspidadas; exopodito igual o más corta que el endopodito con cinco setas cuspidadas y una seta cuspidada apical; endopodito con tres setas cuspidadas, seta curva apical bien desarrollada seguida por una seta cuspidada y dos setas cuspidadas pequeñas, ápice con una seta cuspidada.

Uropodo 2 (Fig. 41e y 42e) más pequeño que uropodo 1, pedúnculo más corto que las ramas con tres setas cuspidadas. Exopodito y endopodito subiguales, endopodito con tres setas cuspidadas, ápice con cuatro setas cuspidadas cortas y largas, exopodito con tres setas cuspidadas en el margen y tres en el ápice.

Uropodo 3 (Fig. 41f y 42f) más pequeño que uropodo 2, pedúnculo más largo que ancho y más ancho que la rama, en el margen distal con seis setas cuspidadas cortas y largas y una seta cuspidada corta en la mitad superior del margen interno. Endopodito ausente, exopodito uniarticulado con entre seis y ocho setas apicales simples y una seta cuspidada.

Telson (Fig. 41g y 42g) largo y ancho de longitud similar, con margen distal redondeado con múltiples setas cuspidadas cortas y largas y dos setas plumosas en cada extremo del borde.

Branquias coxales en los segmentos 2 a 6, branquias esternales en los segmentos 2 a 7.

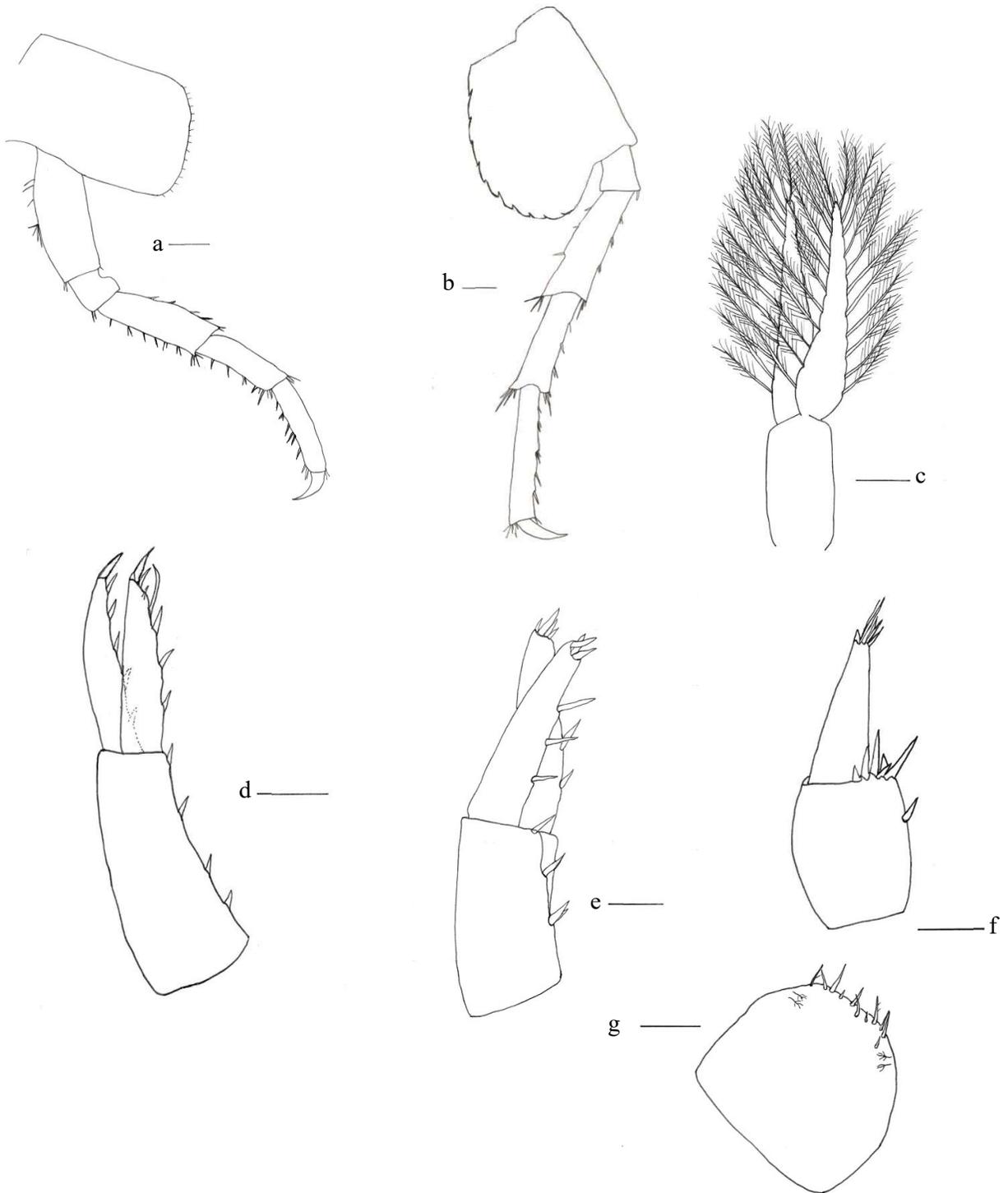


Figura 41. *Hyalella* sp. n. 2, macho. a, pereopodo 3; b, pereopodo 7; c, pleopodo; d, uropodo 1; e, uropodo 2; f, uropodo 3; g, telson. Escala: (a-c): 0,2 mm; (d-g): 0,1mm.

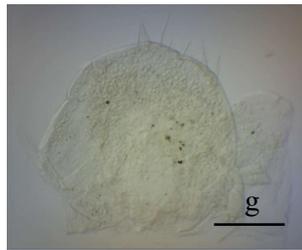
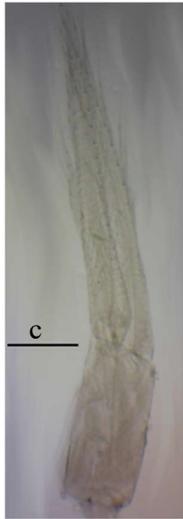


Figura 42. *Hyalella* sp. n. 2, macho, c, pleopodo; d, uropodo 1; e, uropodo 2; f, uropodo 3; g, telson.
Escala: (c): 0,2 mm; (d-g): 0,1mm.

Hembra Paratipo: CCSEFC 387. Talla (LC): 0,8 mm; (LT): 6,8 mm. Variación: Paratipos:14. Talla media \pm desvío estándar (LC): $0,8 \pm 0,1$ mm; (LT): $7 \pm 0,5$ mm.

Habitus (Fig. 44a) similar al del macho exceptuando las siguientes características: Gnatopodo 1 (Fig. 43a y 44b) menos robusto, carpo más largo que ancho con el lóbulo distal posterior provisto de setas simples dispuestas en fila y con una seta simple en el borde proximal; propodo con el borde palmar recto, ángulo palmar con una espina cuspidada, cara interna con una fila de seis setas serradas, áreas con dentículos “comb scale” sobre los márgenes externos e internos. Gnatopodo 2 (Fig. 43b y 44c) similar al gnatopodo 1, carpo con el lóbulo posterior más desarrollado con setas serradas y simples en el borde y con tres setas plumosas internas en la base del lóbulo; propodo más largo y angosto que el gnatopodo 1, cara interna con tres setas simples. Uropodo 1 (Fig. 43c y 44d) sin seta curva en el endopodito.

Información molecular

Esta especie al igual que *H. sp. n. 1* descrita anteriormente, surge a partir de análisis filogenéticos moleculares y con la implementación de diferentes criterios de delimitación de especies detallados en el capítulo 2.

Para *H. sp. n. 2* se han generado secuencias parciales de los genes 12S, 28S y H3 disponibles en GenBank (Números de acceso: MZ750917; MZ750896; MZ736856), mientras que del gen COI no fue posible recuperar el fragmento. Se han obtenido secuencias parciales de 12S para los haplotipos de la misma localidad tipo, disponibles en GenBank (Números de acceso: MZ750920; MZ750918; MZ750919).

En las reconstrucciones filogenéticas realizadas en el capítulo 2, para los genes independientes (Fig. 18, 19 y 20) y para el concatenado (Fig. 22), *H. sp. n. 2* forma un grupo monofilético con *H. curvispina* y con *H. kochi* y *H. montforti*, presentando más cercanía a estas últimas dos especies pertenecientes al altiplano andino. *H. sp. n. 2* se ubica en el clado E definido por en Zapelloni et al., 2021.

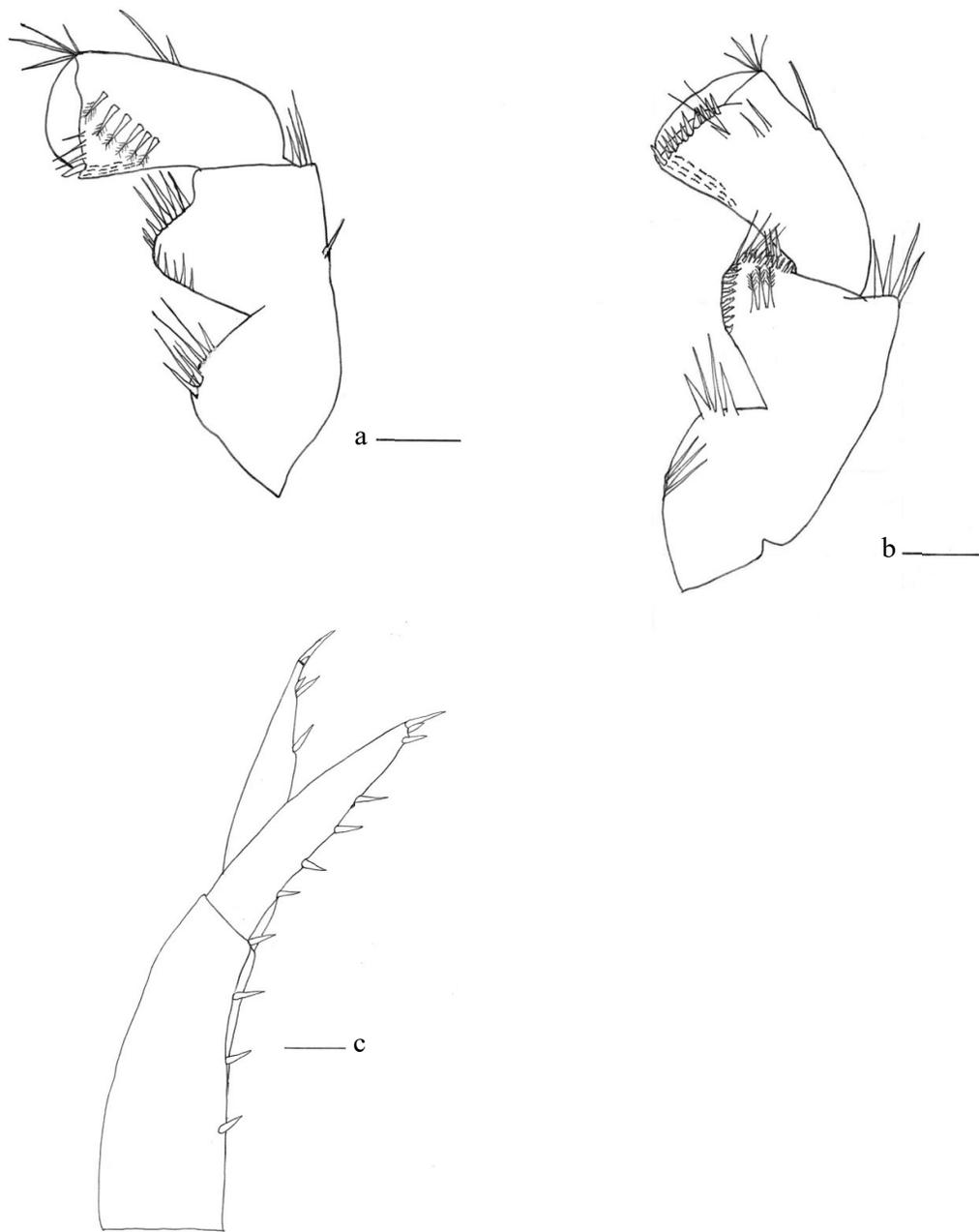


Figura 43. *Hyalella* sp. n. 2, hembra. a, gnathopodo 1; b, gnathopodo2; c, uropodo 1. Escala: (a-c): 0,1 mm.



Figura 44. *Hyalella* sp. n. 2, hembra. a, habitus; b, gnatopodo 1; c, gnatopodo2; d, uropodo 1. Escala: (c-d): 0,1 mm.

Clave de identificación de especies de *Hyalella* de Uruguay

Characters: 3 indata, 3 included, 3 in key.

Items: 3 indata, 3 included, 3 in key.

1. **Antena.** Antena 2 más larga que antena 1, con flagelo con 13/15 antenitos.; Uropodo 3
Pedúnculo con seta cuspidada en el borde lateral..... *Hyalella* sp. n. 2
Antena 2 más larga que antena 1, con flagelo con 13 antenitos.; Uropodo 3 Con pedúnculo liso
o con seta plumosa. 2

- 2(1). **Telson.** Más largo que ancho, con tres setas cuspidadas en el borde apical. *Hyalella* sp. n. 1
De múltiples formas, con número par de setas en el borde apical..... *Hyalella curvispina*

DISCUSIÓN:

En los capítulos precedentes quedo determinada molecularmente la presencia del complejo curvispina en el Uruguay formado por tres especies *H. curvispina* Shoemaker, 1942, *Hyaella* sp. n. 1 y *Hyaella* sp. n. 2 a pesar de las sutiles diferencias morfológicas entre ellas. Morfológicamente podemos distinguir que *Hyaella* sp. n. 1 se diferencia de *H. curvispina* ya que presenta una seta plumosa entre el incisivo y el molar de la mandíbula, mientras que *H. curvispina* presenta tres setas plumosas. La maxila 2 presenta una seta plumosa en el margen interno inferior del lóbulo interno. El uropodo 1 de *Hyaella* sp. n. 1 presenta el exopodito más corto que el endopodito mientras que en *H. curvispina* son de similar tamaño. El uropodo 3 de *Hyaella* sp. n. 1 presenta una seta plumosa en la mitad externa del pedúnculo y en el extremo de la rama externa presenta una seta cuspidada, mientras que en *H. curvispina* la seta plumosa está ausente y en el extremo de la rama externa presenta dos setas cuspidadas. El telson de *Hyaella* sp. n. 1 es más largo que ancho mientras que en *H. curvispina* el telson es cuadrangular.

Hyaella sp. n. 2 se diferencia de *H. curvispina* por presentar la antena 2 más larga con hasta 15 antenitos, mientras que en *H. curvispina* es de 13 antenitos. La maxila 1 de *H. sp. n. 2* presenta doble fila de setas serradas en el lóbulo externo, una en el ápice y otra fila por debajo a la altura del palpo, mientras que *H. curvispina* presenta una fila con nueve setas serradas en el borde del lóbulo externo. El uropodo 1 de *Hyaella* sp. n. 2 presenta el exopodito más corto o de igual tamaño que el endopodito y con cinco setas cuspidadas mientras que en *H. curvispina* son de similar tamaño y el exopodito presenta tres setas cuspidadas en el margen interno. El uropodo 3 de *Hyaella* sp. n. 2 presenta una seta cuspidada corta en la mitad superior del margen interno del pedúnculo, y una seta cuspidada en el ápice del exopodito, mientras que en *H. curvispina* el pedúnculo no contiene setas en los márgenes internos ni externos y presenta dos setas cuspidadas en el ápice del exopodito. El telson de *Hyaella* sp. n. 2 presenta múltiples setas cuspidadas cortas y largas en el borde superior y dos setas plumosas en cada extremo del borde, mientras que el de *H. curvispina* presenta dos grupos de dos setas cuspidadas con seta accesoria en el extremo superior y grupos de setas plumosas a cada lado.

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE UNA POBLACIÓN DE *HYALELLA CURVISPINA* (SHOEMAKER, 1942) DE URUGUAY

Waller, A.; T. Ramos & A. Verdi. 2020. Estructura poblacional y aspectos reproductivos de una población de *Hyaella curvispina* (Shoemaker, 1942) de Uruguay. Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay. 29 (2): 106-115. <https://doi.org/10.26462/29.2.7>

INTRODUCCIÓN

Hasta la realización del presente estudio *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 era la única especie citada para el Uruguay. Es la especie en la que se basa el “complejo curvispina” y se distribuye ampliamente en los hábitats de agua dulce del sur de América del Sur (González & Watling, 2001). Se encuentra en altas densidades asociadas a macrófitas acuáticas de arroyos, lagos y lagunas, también a sustratos duros y algas (da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a; da Silva Castiglioni & Bond Buckup, 2008b; Doyle & Momo, 2009). Esta especie, al igual que el resto de las especies de *Hyaella* tienen una gran importancia ecológica en los ecosistemas dulceacuícolas ya que transfieren energía entre diferentes niveles tróficos, al convertir detritus en materia orgánica particulada fina y sirven como alimento para muchas aves acuáticas, peces e invertebrados (Colla & César, 2015; Cooper, 1965; da Silva Castiglioni & Bond Buckup, 2008b; Giorgi & Tiraboschi, 1999; Hargrave, 1970) A su vez, *H. curvispina* es un organismo ampliamente utilizado en bioensayos y en estudios de toxicidad tanto en Uruguay (Bouvier, 2013; Bouvier & Muniz, 2021; Miguez et al., 2010) como en la región (Mugni et al., 2013) (Mugni, 2008; García et al., 2010; Mugni et al., 2011; del Brio, 2021). A pesar de ello, los estudios básicos sobre la ecología de esta especie son muy escasos, sólo se cuentan para Argentina donde se ha estudiado la dinámica poblacional en relación con la vegetación acuática (Casset et al., 2001; Galassi et al., 2006) y sus hábitos alimentarios (Saigo et al., 2009).

El conocimiento de la estructura poblacional y de aspectos reproductivos brinda información básica sobre la estabilidad ecológica de una población en un hábitat dado, además de permitir la comprensión de la biología de la especie (da Silva Castiglioni, 2007). Información sobre aspectos reproductivos son de importancia para la

interpretación de datos en estudios sobre bioindicadores y en estudios ecotoxicológicos. A su vez, este tipo de información permite evaluar el riesgo de extinción de la especie y el uso sostenible del hábitat, fundamentales en la creación de programas de conservación de un ecosistema (Rinderhagen et al., 2000).

Considerando la amplia presencia en nuestros cuerpos de aguas dulce y el fundamental rol que desempeña *H. curvispina* en ellas, en este capítulo se describirá por primera vez para el Uruguay la dinámica poblacional y reproductiva de una población de *Hyaella curvispina* en un cuerpo de agua léntico y su relación con factores fisicoquímicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio y recolecta de ejemplares

El estudio se realizó en un charco temporal ubicado en el predio de Facultad de Ciencias (34°52'57.1''S 56°07'06.3''W), Montevideo, Uruguay. Los charcos temporales se caracterizan por ser ecosistemas lénticos que se encuentran activos durante el otoño e invierno, época en que los aportes pluviales superan las pérdidas por evaporación y escorrentía (Laufer et al., 2009). Al comenzar los días con mayor temperatura y fotoperiodo más largo, éstos se secan. La vegetación acuática predominante está conformada por la herbácea perenne *Juncus sp.* (Linneo, 1753) comúnmente llamada junco (Fig. 45).

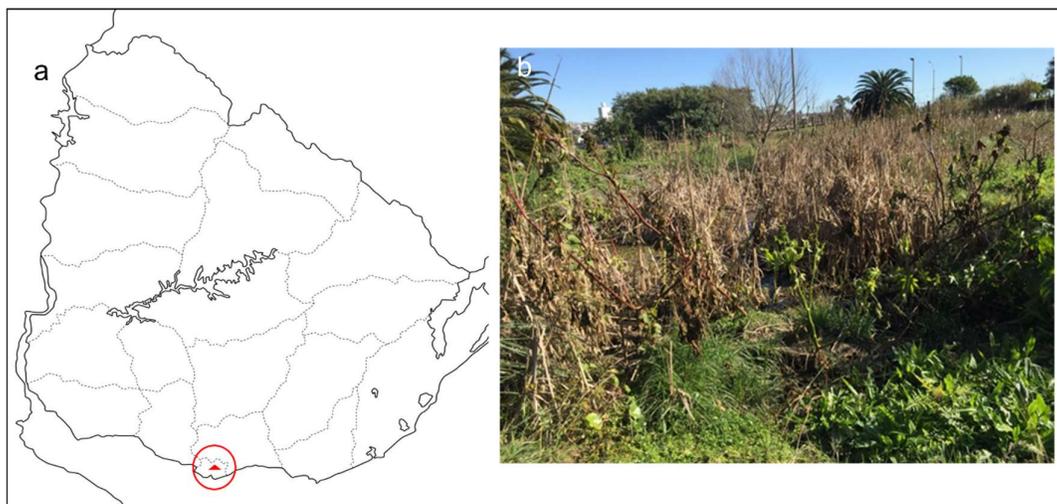


Figura 45. a: ▲ predio de Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay. b: sitio de recolecta de ejemplares de *H. curvispina*.

En el sitio de muestreo se registraron los parámetros fisicoquímicos del agua: temperatura, oxígeno disuelto, conductividad y pH mediante un multiparámetro. La recolecta de ejemplares se realizó mensualmente desde julio 2019 a junio de 2020 usando la metodología descrita en el capítulo 1 pero con un esfuerzo de muestreo de una persona durante una hora. Las muestras fueron lavadas in situ utilizando un tamiz de 3 mm de malla para remover el sedimento más fino y los ejemplares de *H. curvispina* fueron retirados a simple vista de acuerdo con la metodología de Stenert et al. (2004). El material recolectado fue conservado en etanol 70% y trasladado al Laboratorio de Entomología, Facultad de Ciencias, UdelaR. Los ejemplares en precópula y las hembras ovígeras fueron acondicionadas por separado en tubos Eppendorf de 5ml previamente rotulados.

Análisis en el laboratorio

El material recolectado se separó y contó bajo lupa binocular, y los individuos fueron clasificados según la metodología descrita por da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, (2008a) en: machos (individuos con el segundo gnatopodo bien desarrollado), hembras (individuos con el segundo gnatopodo pequeño y presencia de oostegitos), hembras ovígeras (individuos que presentan huevos, embriones o prejuveniles en el marsupio), juveniles (individuos sin caracteres sexuales reconocibles) (Fig.46).

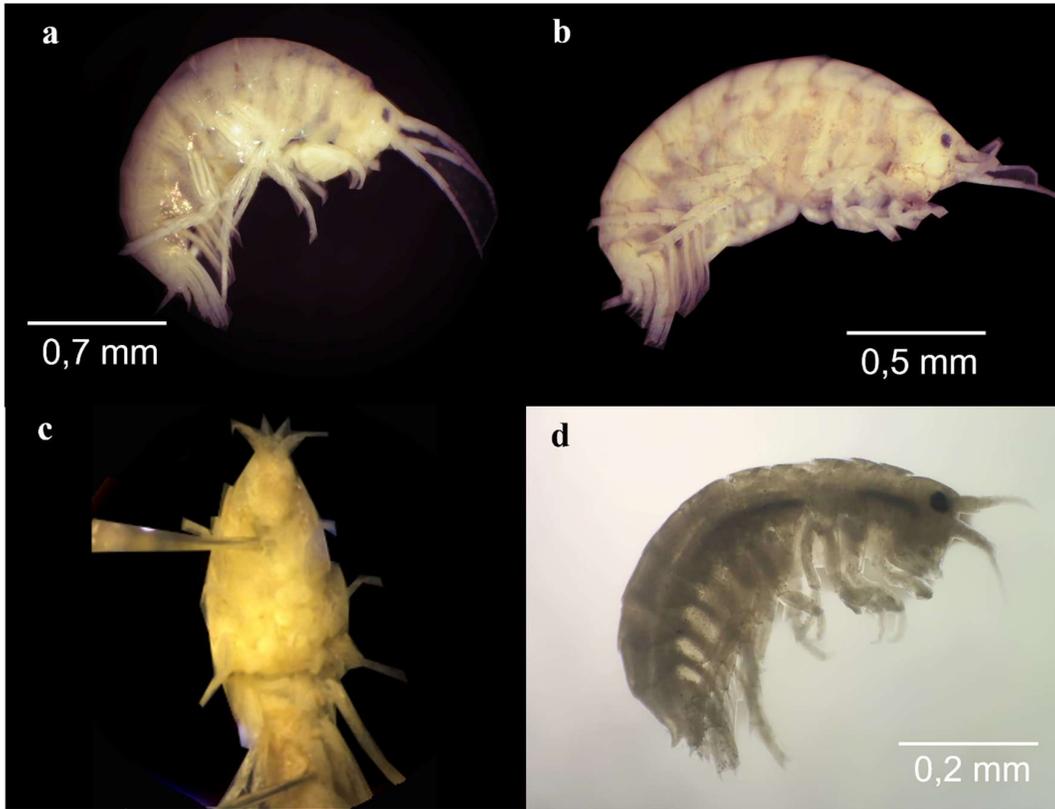


Figura 46. A: macho; B: hembra; C: hembra ovígera; D: juvenil.

Se estimó la abundancia total y mensual de juveniles, machos, hembras y hembras ovígeras. A todos los individuos se les midió el largo del cefalotórax (LC) desde el extremo del rostro hasta la región posterior de la cabeza (Castiglioni & Bond-Buckup, 2007) (Fig. 47), usando un ocular micrométrico asociado a un microscopio estereoscópico.

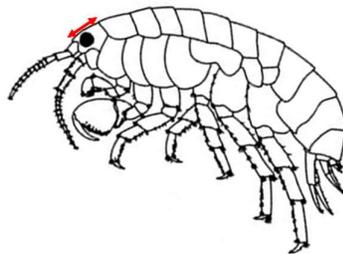


Figura 47. Medición del largo del cefalotórax (LC en mm) de *Hyalella*.

El contenido del marsupio de cada hembra ovígera fue retirado bajo microscopio estereoscópico. Cada fase de desarrollo embrionario fue clasificada en los siguientes

estadios: Estadio I inicial. Coloración naranja y vitelo ocupando todo el espacio del huevo. Estadio II intermedio. Se observa el comienzo de la división celular pero las partes del embrión no están definidas. Estadio III final: El vitelo se ha consumido, se observa el embrión con los ojos presentes. Estadio IV prejuvenil. Incubación de prejuveniles ya eclosionados (Castiglioni et al., 2018; Castiglioni & Bond-Buckup, 2009; Subida et al., 2005) (Fig. 48).

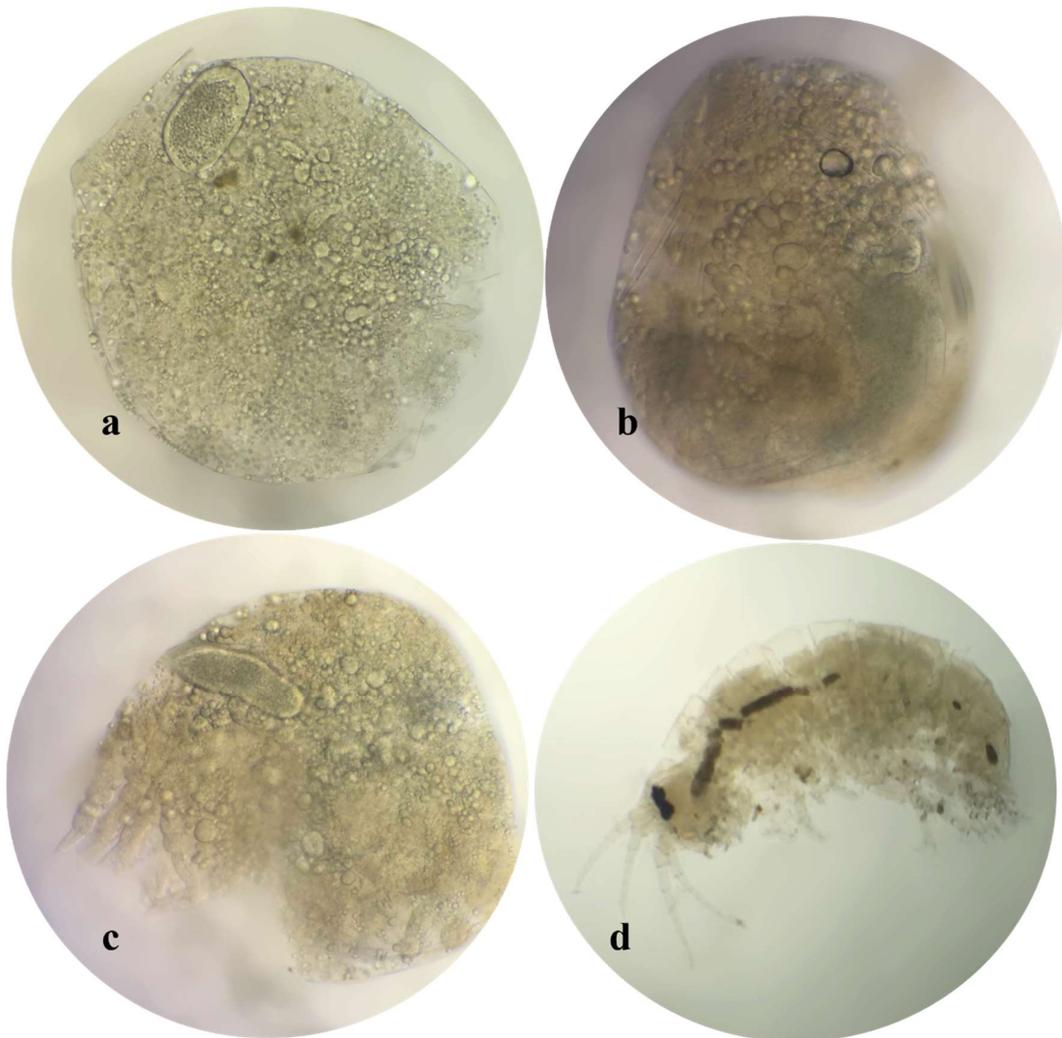


Figura 48. Estadios del desarrollo embrionario. A: estadio inicial (I); B: estadio intermedio (II); C: estadio final (III); D: estadio prejuvenil (IV).

Análisis de datos

La relación entre la abundancia total de individuos y los parámetros fisicoquímicos registrados se determinó por medio del coeficiente de correlación no – paramétrico de Spearman. La proporción sexual fue comparada empleando el test de Chi-cuadrado (α^2), con una hipotética relación fisheriana de 1:1, siendo expresada como el número total de individuos machos adultos por el número total de hembras adultas.

El largo del cefalotórax de machos y hembras libres y en precópula se comparó usando test de Student (t). Las clases de tamaño se establecieron mediante el valor de $\frac{1}{4}$ del desvío estándar de los valores de longitud del cefalotórax (Markus, 1971). La distribución de frecuencias por clases de tamaño se realizó mediante Shapiro Wilk (w).

El período reproductivo se estimó mediante la frecuencia estacional de hembras ovígeras y parejas en precópula (da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a). La madurez sexual se estimó basada en el largo del cefalotórax (LC) del macho y hembra más pequeño en precópula y el tamaño de la hembra ovígera más pequeña.

Se compararon los largos de cefalotórax (LC) de las hembras ovígeras en cada estadio de desarrollo embrionario, mediante análisis de varianza (ANVA), previamente corroborada la distribución de probabilidad de los datos. Se estimó la fecundidad total (mínima, máxima y media \pm desviación estándar), como el número de huevos y juveniles por estadio de desarrollo embrionario. La relación entre el largo del cefalotórax (LC) de las hembras ovígeras y el número de huevos y prejuveniles se estimó mediante un análisis de regresión simple y del coeficiente de correlación no – paramétrico de Spearman.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software PAST versión 4.09 y en todos los casos se utilizó un $p = 0,05$.

RESULTADOS

Abundancia y parámetros fisicoquímicos

Un total de 1268 individuos de *Hyalella curvispina* fueron recolectados, incluyendo 395 machos, 765 hembras dentro de las cuales 78 fueron hembras ovígeras y 108 juveniles.

La abundancia absoluta presentó variaciones a lo largo del año (Fig. 49), con un aumento sostenido durante el invierno y la primavera (julio a noviembre), alcanzando un pico máximo en el mes de noviembre, y un descenso abrupto durante la sequía del charco en verano, otoño y el comienzo del invierno (diciembre a junio), cuando no se hallaron ejemplares.

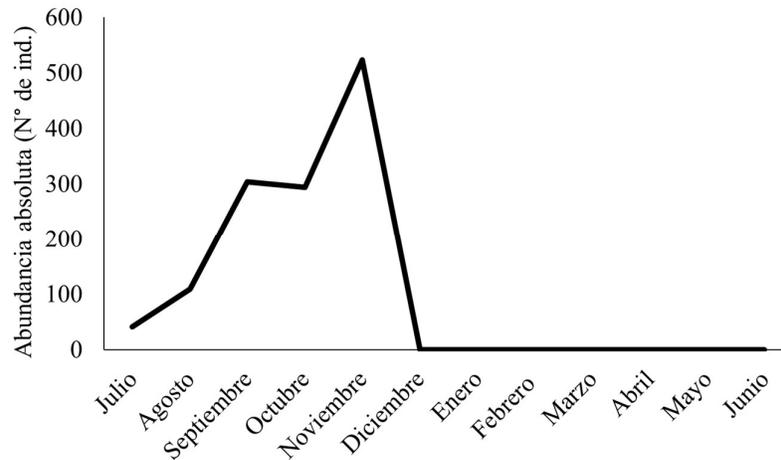


Figura 49. Número de individuos de *H. curvispina* a lo largo del año.

La temperatura del agua varió entre 13,5 – 24°C, con un valor medio de 19°C; mientras que el pH varió entre 7,3 – 8,5, con un valor medio de 7,7 (Fig. 50 a, b). Tanto la temperatura (n:5 r:0,5 p:0,45) como el pH (n:5 r:0,4 p:0,5), no presentaron correlación con la abundancia de individuos. La conductividad varió entre 1,15-1,7 mS/cm con un promedio de 1,3 mS/cm (Fig. 50 c) y se correlacionó de forma positiva con la abundancia de individuos (n:5 r: 0,9 p:0,03).

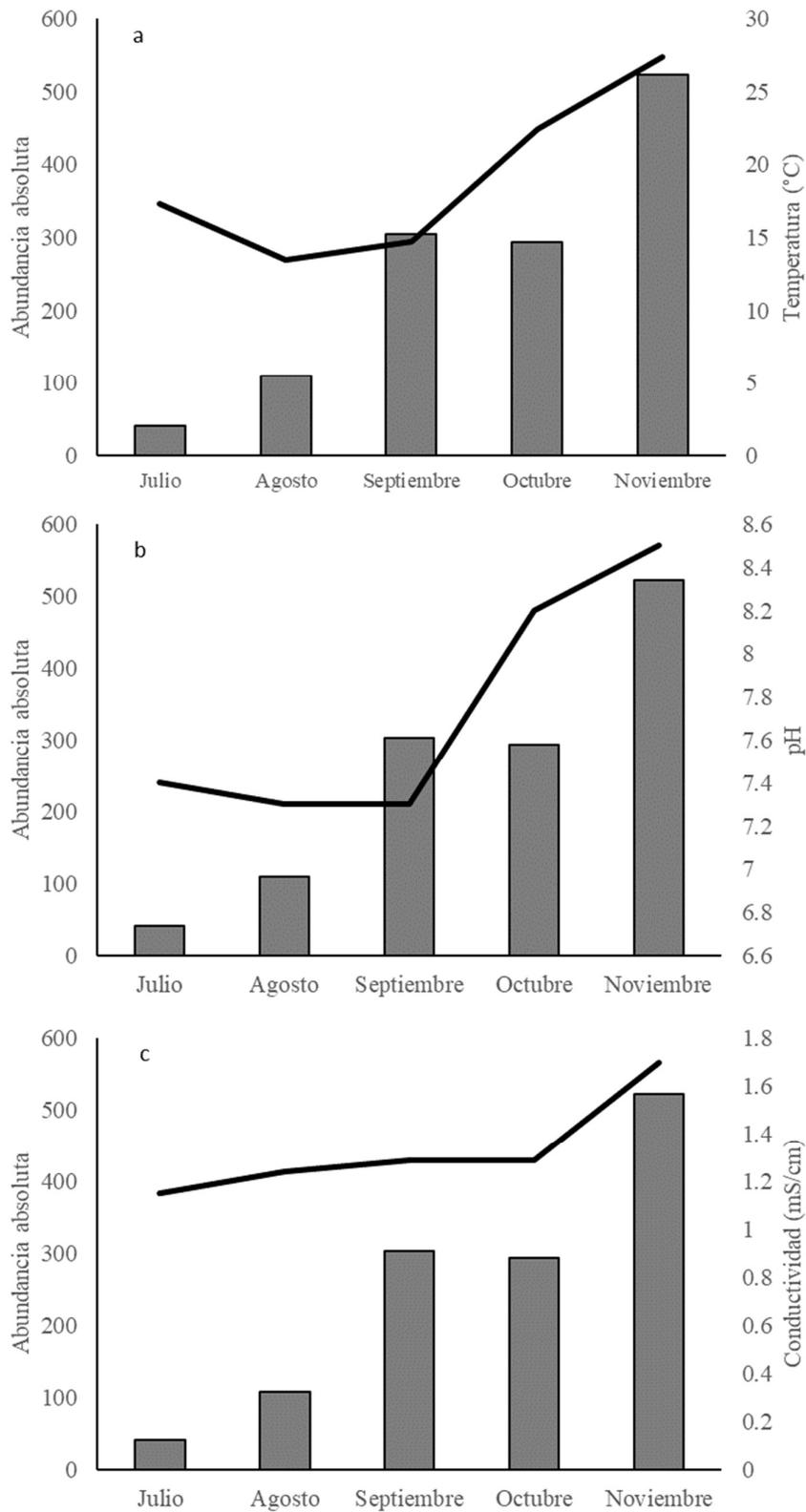


Figura 50. Variación de la abundancia absoluta (Número de individuos) en función de la temperatura °C (a) pH (b), y conductividad (c).

Tanto los machos como las hembras adultas, estuvieron presentes durante los meses en los que se recolectaron ejemplares, siendo más abundantes durante la primavera, con un pico de machos en septiembre y de hembras en noviembre. Las hembras ovígeras fueron registradas desde mediados del invierno hasta mediados de primavera (julio a octubre), mientras que los juveniles se hallaron en primavera (septiembre a noviembre), con un pico en noviembre (Fig. 51). Las parejas en precópula fueron encontradas durante todos los meses en que se hallaron ejemplares de *H. curvispina*, presentando mayor frecuencia en julio y disminuyendo gradualmente hasta noviembre (Fig. 51).

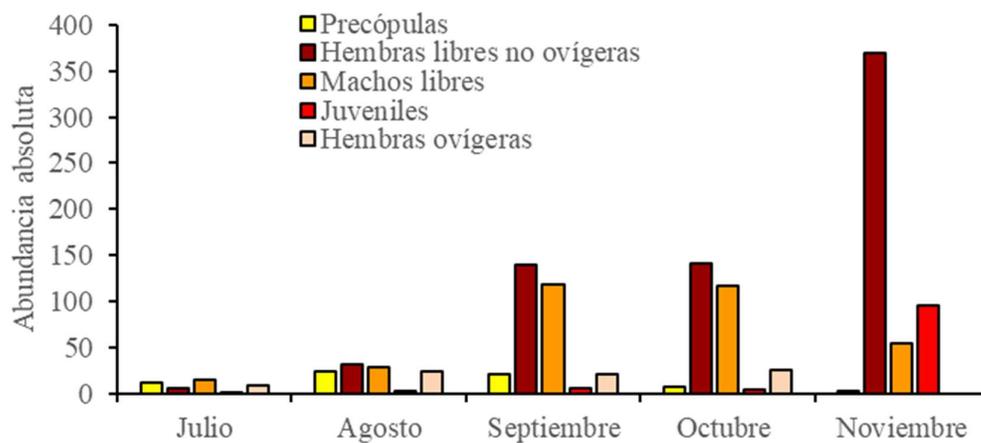


Figura 51. Abundancia absoluta (Número de individuos) de precópulas, machos libres, hembras libres, hembras ovígeras y juveniles de *H. curvispina*, durante los meses en los que se hallaron ejemplares.

Largo de cefalotórax

El largo del cefalotórax de los machos varió entre 0.3-1.6 mm mientras que el largo del cefalotórax de las hembras varió entre 0.2-1.3 mm. La media del tamaño de machos y hembras libres y en precópula se observa en la Tabla IX. El largo del cefalotórax de los machos libres y en precópula resultó significativamente mayor que el de las hembras libres y en precópula (Libres t:14.1 p:0.01) (Precópula t:6.6 p:0.01).

Tabla IX. Media y desvío estándar del largo del cefalotórax (mm) de machos y hembras libres, y en precópula de *H. curvispina*.

	N	N	Libres	Precópula
	libres	precópula	Media ± DS	Media ± DS
Machos	331	64	0,72 ± 0,24	0,99 ± 0,21
Hembras	701	64	0,54 ± 0,16	0,76 ± 0,16

La madurez sexual, estimada a partir del largo del cefalotórax del individuo más pequeño observado en precópula es 0,6 mm para machos y 0,5 mm para hembras. Considerando el tamaño de la hembra ovígera más pequeña es de 0,6 mm.

Las frecuencias en clases de tamaño de largo de cefalotórax presentaron distribución normal para los meses de julio (W: 0,9 p>0,05), agosto (W: 0,9 p>0,05), septiembre (W: 0,9 p>0,05), octubre (W: 0,8 p>0,05) excepto para noviembre (W: 0,7 p<0,05) (Fig. 52). Los machos más grandes fueron encontrados en el mes de agosto, al igual que las hembras (Fig. 52).

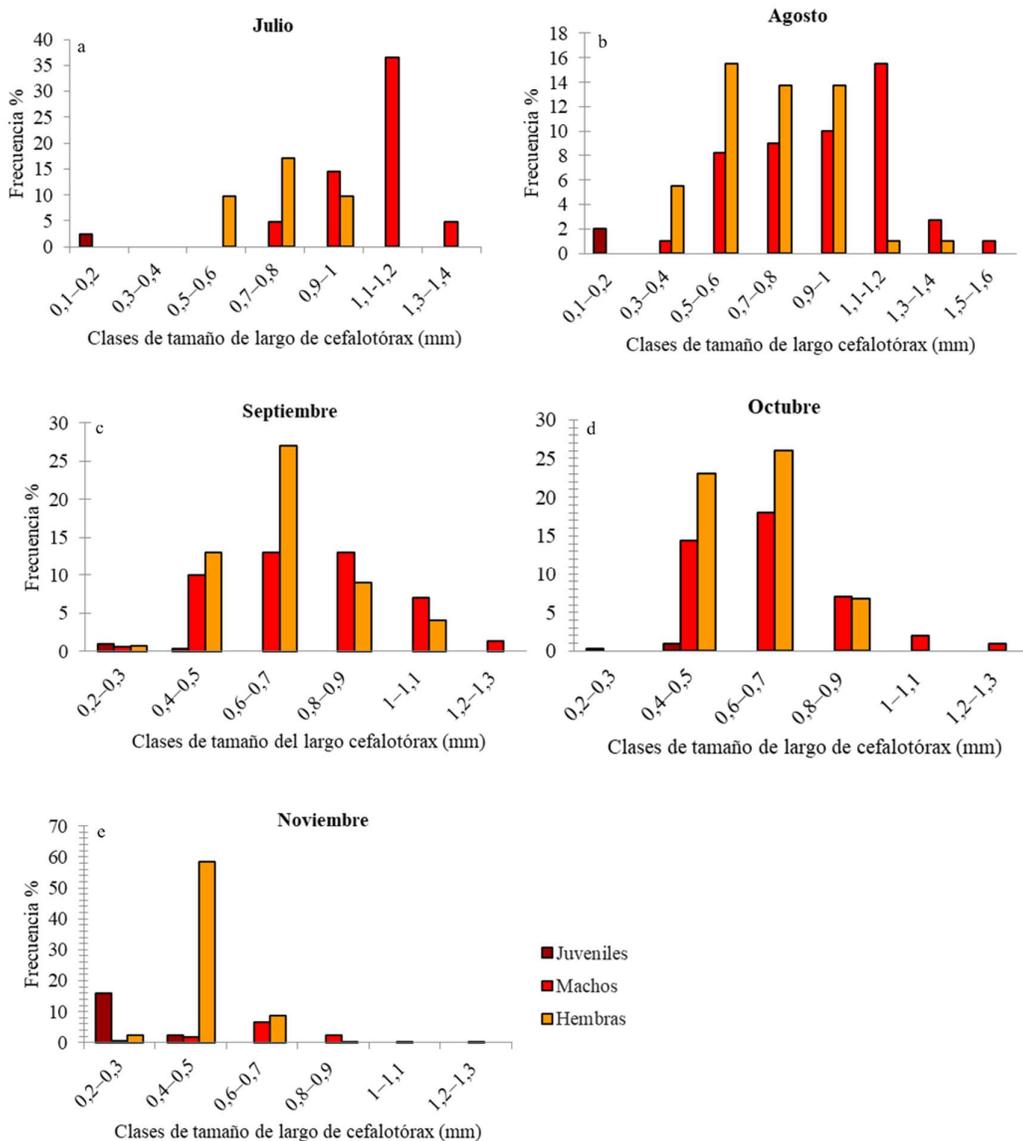


Figura 52. Histograma de frecuencias por clase de tamaños del Largo de cefalotórax (mm), en juveniles, machos y hembras de *H. curvispina*.

El largo del cefalotórax (LC) en las hembras ovígeras estuvo comprendido entre 0,6-1,3 mm (media \pm desvío estándar: 0.82 ± 0.15). Las hembras ovígeras que presentaron huevos en los estadios I al III y las que presentaron prejuveniles (estadio IV) tienen valores similares de LC (F: 1.1; p:0.35; Tabla X).

Tabla X. Mínimo, máximo, media y desvío estándar del largo del cefalotórax (mm) de las hembras ovígeras de *H. curvispina* en los distintos estadios de desarrollo embrionario.

Estadio	N	Media ± D.S	Mínimo-máximo
Inicial (I)	38	0,79 ± 0,14	0,6-1,2
Intermedio (II)	31	0,86 ± 0,16	0,6-1,3
Final (III)	4	0,85 ± 0,19	0,6-1
Prejuvenil (IV)	5	0,84 ± 0,16	0,6-1

Proporción sexual

La proporción entre el número total de machos y de hembras analizados, presentó diferencias significativas a favor de las hembras. Las diferencias en las proporciones de sexos se observaron en los meses de octubre y noviembre, mientras que desde julio a septiembre no se presentaron diferencias significativas (Tabla XI).

Tabla XI. Número de individuos y porcentaje (%) de *H. curvispina*. Valores de Chi², p valor por mes y total.

	Hembras	Hembras	Machos	Machos		
	N	%	N	%	X²	p valor
Julio	15	38	25	62	2,5	>0,05
Agosto	55	51	52	49	0,08	>0,05
Septiembre	160	54	138	46	1,6	>0,05
Octubre	166	57	124	43	6,1	<0,05
Noviembre	369	87	56	13	230	<0,05
Total	765	66	395	34	118	<0,05

Fecundidad

La fecundidad varió entre 19-199 huevos, con un promedio de 93±50, mientras que la fertilidad varió entre 44-115 prejuveniles, con un promedio de 78±26. El número de huevos y de prejuveniles de cada estadio se presentan en la Tabla XII. En los estadios de desarrollo embrionario I y II se registró una correlación positiva entre el número de

huevos y el LC ($p < 0.05$) (Tabla XII). En los estadios III y IV no se estableció correlación por el bajo número de pares de datos.

Tabla XII. Mínimo, máximo, media y desvío estándar del largo del cefalotórax (mm) de las hembras ovígeras de *H. curvispina* en los distintos estadios de desarrollo embrionario.

Estadio	N	Media ± D.S	Rango	r
Inicial (I)	38	83	19-199	0,6
Intermedio (II)	31	104	32-190	0,6
Final (III)	4	89	73-111	-
Prejuvenil (IV)	5	78	44-115	-

DISCUSIÓN

El contexto ecológico y evolutivo de los charcos temporales tiene profundas implicancias en la biología de las especies (Laufer et al., 2009). La variación en la abundancia absoluta de *H. curvispina*, con cero individuos desde el verano hasta principios del invierno, está condicionada por el hábitat de desecación periódica, que impone restricciones para el comportamiento, desarrollo e historia de vida de las especies (Wilbur, 1987). No existen estudios para el género *Hyalella* acerca de cómo sobreviven los períodos de desecación. En un estudio realizado en el anfípodo dulceacuícola *Crangonyx pseudogracilis* Bousfield, 1958 de Norteamérica, esta especie epigea es capaz de habitar partes del nivel freático durante la fase seca de un humedal temporal, y este mecanismo explica tanto su capacidad para persistir, como su ubicuidad a través de una red de humedales cercanos (Harris et al., 2002). Los animales encontrados en charcos temporales, principalmente macroinvertebrados y larvas de anfibios, presentan adaptaciones particulares para este tipo de régimen hidrológico, tales como rápida colonización, rápido crecimiento y plasticidad fenotípica (Wilbur, 1987). Estas características también están presentes en el género *Hyalella* (Sampaio, 1988; Duan et al., 2000).

La abundancia absoluta de la población de *H. curvispina* estudiada, se correlacionó de manera positiva con la conductividad. Este hecho concuerda con lo observado por Galassi et al., (2006) para la misma especie en Argentina. De acuerdo con Kestrup & Ricciardi,

(2010), la baja conductividad es estresante para los anfípodos provocando una reducción de la tasa de crecimiento. Asimismo, Zehmer et al., (2002) determinaron que cuando son expuestos a niveles de conductividad o calcio por debajo de su rango de tolerancia, los crustáceos sufren una reducción en su crecimiento, y en su tasa reproductiva, aumentando la mortalidad por estrés osmótico.

No se observó correlación entre la abundancia absoluta y la temperatura y pH del agua. *H. curvispina* presenta una alta plasticidad térmica (Doyle & Momo, 2009), que le permite hacer frente a variaciones en la temperatura del ambiente. En cuanto al pH, los valores registrados corresponden a pH neutro, en estudios realizados con otras especies de *Hyaella*, para valores por debajo de pH 6, no se registraron individuos (Grapentine & Rosemberg, 1992); mientras que en una población de *H. pampeana* (Cavaliere, 1968), se observó una correlación positiva entre el pH y la densidad de individuos en valores de pH entre 5.6-7 (Colla & César, 2019).

Los machos de *H. curvispina* son más grandes que las hembras y alcanzan la madurez sexual a tamaños también mayores, este patrón ha sido observado en otras especies de *Hyaella* (Bastos-Pereira et al., 2018; da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008a; González et al., 2006). En los crustáceos, el crecimiento es similar para ambos sexos hasta llegar a la madurez sexual, luego machos y hembras presentan diferentes demandas reproductivas, que resultan en distintas tasas de crecimiento entre sexos (Low, 1978). Las hembras generalmente crecen más lentamente debido a la prolongación del período inter mudas, ya que mientras incuban los embriones se suspende la muda (Cardoso & Veloso, 1996).

La distribución normal en el tamaño de clases está dada por la predominancia de machos y hembras adultos en clases de tamaños intermedios. El mes de noviembre está caracterizado por la presencia de dos grandes grupos, juveniles y adultos por lo que no presentó una distribución normal.. Esta característica también ha sido observada en otras especies de *Hyaella* (da Silva Castiglioni et al., 2020; da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008b) y está caracterizada por el reclutamiento de juveniles luego de la reproducción.

Las hembras fueron más frecuentes que los machos, resultado también observado para *H. bonariensis* (Rodrigues, 2011), *H. castroi* (González et al., 2006) y *H. pleocuta* (González et al., 2006) del estado de Rio Grande do Sul, Brasil (da Silva Castiglioni et al., 2016; da

Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2008b). En anfípodos, la proporción sexual sesgada hacia las hembras puede estar relacionada a variaciones en la temperatura, tipo de vegetación, tasa de crecimiento, ocupación de diferentes hábitats, disposición de alimento y presencia de parásitos (Powell & Moore, 1991; da Silva Castiglioni et al., 2016). También puede deberse al hecho de que los machos pasan más tiempo nadando mientras buscan a la hembra para la precópula, siendo más susceptibles a los depredadores (Castiglioni et al., 2016).

La presencia de una mayor cantidad de hembras ovígeras y precópulas en invierno, coincide con lo observado para las especies *H. bonariensis*, *H. castroi* y *H. pleocuta* del sur de Brasil, las cuales se reproducen con más frecuencia durante la época invernal (da Silva Castiglioni et al., 2018; da Silva Castiglioni & Bond Buckup, 2008b). Este mismo patrón también ha sido observado en *Gammarus mueven* (Lilljeborg, 1951), *G. oceanicus* (Seegerstrale, 1947) y *G. salinus* (Spooner, 1947) de Norteamérica (da Silva Castiglioni et al., 2016). Por otra parte, el pico de hembras ovígeras podría estar relacionado a la abundancia de macrófitas acuáticas, que en charcos temporales son más abundantes en invierno y primavera, períodos en los que la desecación es mínima; estas plantas proveen de refugio y alimento a las poblaciones de *Hyaella* (Wilbur, 1987; da Silva Castiglioni et al., 2016). La presencia de juveniles durante la primavera es consecuencia del pico de hembras ovígeras registrado en invierno, que resulta en un alto reclutamiento de juveniles, este hecho coincide con lo observado para las especies *H. bonariensis*, *H. castroi* y *H. pleocuta* (da Silva Castiglioni et al., 2016). El número de parejas en precópula disminuyó durante la primavera, y fue bajo en comparación con la cantidad de machos y hembras libres. Este mismo resultado fue observado en *H. castroi* y *H. pleocuta* por (da Silva Castiglioni & Bond Buckup, 2008a), *H. carstica* por Torres et al., (2015) y en *H. bonariensis* por da Silva Castiglioni et al. (2018). La baja frecuencia de parejas en precópula, puede estar relacionada a que durante ese comportamiento, las parejas se encuentran más vulnerables a la depredación (Wellborn, 1995), ya que (?) que nadan más lento que cuando están libres (da Silva Castiglioni et al., 2018).

El tamaño del largo del cefalotórax de las hembras ovígeras de *H. curvispina* estudiadas, es mayor al registrado para las hembras ovígeras de *H. bonariensis* (da Silva Castiglioni et al., 2018). Por otro lado, la cantidad de huevos y prejuveniles en los distintos estadios del desarrollo embrionario y postembrionario, es mayor en los ejemplares analizados que en *H. bonariensis*, *H. castroi* y *H. pleocuta* (da Silva Castiglioni et al., 2018). De acuerdo

con Appadoo & Myers (2004), estas diferencias podrían deberse a las variaciones en los hábitats y a los microclimas en donde viven las distintas especies. En este trabajo se registró una correlación positiva entre el número de huevos en los estadios I y II, y el largo del cefalotórax de las hembras ovígeras. Muchos autores han observado una relación positiva entre el número de huevos y el tamaño de las hembras en otras especies de *Hyaella* (da da Silva Castiglioni & Bond-Buckup, 2007; Torres et al., 2015; Bastos-Pereira & Bueno, 2016). Hines (1982) observó una alometría similar entre el volumen de la cavidad corporal y la masa de huevos. Durante los estadios III y IV, no se estableció correlación ya que la cantidad de hembras ovígeras era baja (menor a 5). Estudios realizados en otras especies de *Hyaella* muestran una correlación negativa, que se debe a una reducción en el número de huevos, al aumentar el tamaño del embrión, el espacio dentro del marsupio decrece habiendo una pérdida de huevos (da Silva Castiglioni et al., 2018).

CONCLUSIONES GENERALES

Este trabajo de investigación corresponde al primer estudio realizado en Uruguay sobre el género *Hyaella*.

Se analizaron 440 ejemplares de *Hyaella* recolectados en 88 sitios de los 107 muestreados. Se identificó a *H. curvispina* en 80 sitios y 9 morfos similares a ella en los 8 sitios restantes y en el sitio de Aguas Blancas, Lavalleja, se recolectó a *H. curvispina* coexistiendo con uno de los morfos identificados. Se redescibió a la *H. curvispina* a partir de ejemplares recolectados en la localidad tipo.

Se confirma morfológicamente la presencia del “complejo curvispina” para el Uruguay propuesto por González & Watling, (2001) y Peralta & Grosso, (2009).

Se evaluó la diversidad molecular del “complejo curvispina” utilizando cuatro marcadores y se analizó su posición sistemática en el marco de las hipótesis filogenéticas disponibles para el género.

El “complejo curvispina” en Uruguay es parafilético con respecto a algunas especies del altiplano andino. Las *Hyaella* uruguayas forman un grupo monofilético con *H. montforti* 2015-2D y *H. kochi* 4747, 2319B, 3TK27, ambas especies correspondientes al clado E del Altiplano norte (Zapelloni et al., 2021).

La diferenciación genética encontrada entre la mayoría de las *Hyaella* de Uruguay (excepto H4 y H7) fue moderada, en el rango esperado para la diferenciación intraespecífica, y consistente entre la mayoría de los genes. Por lo tanto, se propone que todos estos morfos son parte de la variación de *H. curvispina* generada en la región.

Dos de los morfos identificados H4 de Lavalleja y H7 de Tacuarembó, presentan una mayor divergencia genética con respecto al resto de los morfos uruguayos y se consideran especies diferentes.

Se describen morfológicamente a la especie *Hyaella* sp. n. 1 correspondiente al morfo H4 para la localidad de Aguas Blancas, Departamento de Lavalleja y a la especie *Hyaella* sp. n. 2 correspondiente al morfo H7 para Batoví, Departamento de Tacuarembó.

Se confirma la existencia de *H. curvispina* y *H.* sp. n. 1 como especies simpátricas en el sitio de Aguas Blancas (Lavalleja).

Se confirma molecularmente la presencia del “complejo curvispina” en Uruguay y está formado por tres especies *H. curvispina*, *H. sp. n. 1* y *H. sp. n. 2*, siendo *H. curvispina* la que predomina en el 99% de los sitios muestreados.

La dinámica poblacional de *H. curvispina* está condicionada por el tipo de hábitat, en este caso con desecación periódica, siendo la abundancia cero desde diciembre a junio.

La abundancia absoluta de la población de *H. curvispina* estudiada, se correlacionó de manera positiva con la conductividad. Mientras que no se observó correlación entre la abundancia absoluta y la temperatura y pH del agua.

Los machos de *H. curvispina* fueron más grandes que las hembras y alcanzaron la madurez sexual a tamaños también mayores.

La frecuencia de tamaño de clases estuvo dada por la predominancia de machos y hembras adultos en clases de tamaños intermedios.

En cuanto a la proporción sexual, las hembras fueron más frecuentes que los machos y se registró mayor abundancia de hembras ovígeras y de precópulas en invierno.

Se observó una correlación positiva entre el largo del cefalotórax de las hembras ovígeras y la fecundidad en las etapas I y II del desarrollo embrionario.

BIBLIOGRAFÍA

- Abell, R. (2002). Conservation Biology for the Biodiversity Crisis: A freshwater follow-up. *Conservation Biology*, 16(5), 1435–1437.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.01532.x>
- Adamowicz, S. J., Marinone, M. C., Menu-Marque, S., Martin, J. W., Allen, D. C., Pyle, M. N., De los Ríos, P., Sobel, C. N., Ibañez, C., Pinto, J., & Witt, J. D. S. (2018). The *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda) species cloud of the ancient Lake Titicaca originated from multiple colonizations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 125(May), 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.03.004>
- Alonso, M., & Jaume, D. (2017). A new species of *Hyaella* from the high andes of Ecuador (Crustacea, amphipoda, hyalellidae). *ZooKeys*, 2017(686), 1–13.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.686.12223>
- Andres, H. G. (1988). *Hyaella paramoensis* sp. n. aus dem Páramo de Chisacá (Anden) (Crustacea: Amphipoda: Talitroidea). *Mitt.Hamb.Zool. Mus. Inst.*, 85(1), 103–109.
- Anguiano Olga; Castro Claudia; Venturino Andrés; Ferrari, A. (2012). Acute toxicity and biochemical effects of Azinphos methyl in the amphipod *Hyaella curvispina*. *Environmental Toxicology*, 29, 1043–1053. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Arbogast, B. S., Edwards, S. V., Wakeley, J., Beerli, P., & Slowinski, J. B. (2002). Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic timescales. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(November), 707–740. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150500>
- Arif, I. A., & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: A brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9–17.
- Babin-Fenske, J. J., Merritt, T. J. S., Gunn, J. M., Walsh, T., & Lesbarrères, D. (2012). Phylogenetic analysis of *Hyaella* colonization in lakes recovering from acidification and metal contamination. *Canadian Journal of Zoology*, 90(5), 624–629. <https://doi.org/10.1139/Z2012-028>
- Baldinger, A. J. (2004). A new species of *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda: Hyalellidae) from Ash Springs, Lincoln County, Nevada, USA, with a key to the

- species of the genus in North America and the Caribbean region. *Journal of Natural History*, 38(9), 1087–1096.
<https://doi.org/10.1080/0022293031000075367>
- Barnard, J. L. & Karaman, G. S. (1991). The families and genera of marine gammaridean Amphipoda (except marine gammaroids). Part 2. *Records of the Australian Museum*, Supplement. 13 (2): 419–866.
- Barnard, J. L., & Williams, W. D. (1995). The taxonomy of freshwater Amphipoda (Crustacea) from Australian fresh waters: Part 2. *Records of the Australian Museum*, 47(2), 161–201. <https://doi.org/10.3853/j.0067-1975.47.1995.236>
- Bastos-Pereira, R., Alves de Oliveira, M. P., & Ferreira, R. L. (2018). Anophtalmic and epigean? Description of an intriguing new species of *Hyaella* (Amphipoda, Hyaellidae) from Brazil. *Zootaxa*, 4407(2), 254–266.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4407.2.6>
- Bastos-Pereira, R., & Bueno, A. A. P. (2012). New species and new report of *Hyaella* S. I. Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Dogielinotidae) from Minas Gerais state, Southeastern Brazil. *Zootaxa*, 68(3350), 58–68.
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3350.1.4>
- Bastos-Pereira, R., & Bueno, A. A. P. (2013). A new species of freshwater amphipod (Dogielinotidae, *Hyaella*) from Southeastern Brazil. *Nauplius*, 21(1), 79–87.
<https://doi.org/10.1590/s0104-64972013000100009>
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., & Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(3), 148–155.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Bond-Buckup, G., & Araujo, P. B. (1998). *Hyaella montenegrinae* sp. n., um amphipoda de águas continentais do sul do Brasil (Crustacea, Peracarida, Hyaellidae). In *Nauplius* (Vol. 6, pp. 53–59).
- Bousfield, E. . (1996). A contribution to the reclassification of Neotropical freshwater Hyaellid amphipods (Crustacea: Gammaridea, Talitroidea). *Boll. Mus. Civ. ST. Nat. Verona*, 20, 175–224.

- Bouvier, M.E. (2013). Respuestas comportamentales de *Hyaella curvispina*, Shoemaker 1942 (Crustacea, Amphipoda) como herramienta para la detección de toxicidad en sedimentos. Tesis de Maestría. PEDECIBA. Facultad de Ciencias, Uruguay .
- Bouvier, María Elena; Muniz, P. (2021). Sensibilidad de *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 (Crustacea, Amphipoda) al cobre, fenantreno y salinidad. *Boletín de La Sociedad Zoológica Del Uruguay*, 30(2), 10–20.
- Brehm-Lunz, V. D. (1925). Zoologische Ergebnisse der von Prof. Dr. F. Klute nach Nordpatagonien unternommenen Forschungsreise. *Archiv Für Hydrobiologie*, 302–324.
- Bueno, A. A. P., Araujo, P. B., Cardoso, G. M., Gomes, K. M., & Bond-Buckup, G. (2013). Two new species of *Hyaella* (amphipoda, dogielinotidae) from Brazil. *Crustaceana*, 86(7–8), 802–819. <https://doi.org/10.1163/15685403-00003205>
- Bueno, A. A. P., Oliveira, K. M., & Wellborn, G. (2019). A new species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Oklahoma, USA. *Zootaxa*, 4700(2), 259–269. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4700.2.5>
- Bueno, A. A. P., Rodrigues, S. G., & Araujo, P. B. (2014). O estado da arte do género *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Senticaudata, Hyaellidae) no Brasil. *Temas de Atualização Em Ciências Aquáticas*, 53(February 2016), 129.
- Cannizzaro, A. G., & Berg, D. J. (2022). Gone with Gondwana: Amphipod diversification in freshwaters followed the breakup of the supercontinent. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 171(March), 107464. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107464>
- Cardoso, G.M. (2013). Especies de *Hyaella* Smith 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) encontradas en ambientes subterráneos. Tesis de Maestría. Universidad Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.
- Cardoso, G. M., Araujo, P. B., Bueno, A. A. P., & Ferreira, R. L. (2014). Two new subterranean species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Brazil. *Zootaxa*, 3814(3), 353–368. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3814.3.3>
- Cardoso, G. M., Bueno, A. A. P., & Ferreira, R. L. (2011). A new troglobiotic species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from Southeastern Brazil.

- Nauplius*, 19(1), 17–26. <https://doi.org/10.1590/s0104-64972011000100003>
- Casset, M. A., Momo, F. R., & Giorgi, A. D. N. (2001). Dinámica poblacional de dos especies de anfipodos y su relación con la vegetación acuática en un microambiente de la cuenca del río Luján (Argentina). *Ecologia Austral*, 11(2), 79–85.
- Cavalieri, F. (1959). Una nueva especie de anfipodo de agua dulce (Crustacea: Amphipoda). *Physis*, 2, 278–288.
- Cavalieri, F. (1968). *Hyaella pampeana* sp. n., una nueva especie de anfipodo de agua dulce. (Gammaridea: Hyaellidae). *Neotropica*, 14(59), 107–117.
- Chevreaux, E. (1904). Mission de Créqui-Montfort et sénéchal de la grange note préliminaire sur les amphipodes recueillis par M. le D' neveu -Lemaire Dans le Lac Titicaca (Juillet 1903). *Bull. Soc. Ent. Fr.*, XXIX(14), 131–134.
- Chevreaux, E. (1907). Les amphipodes des lacs des hauts plateaux de L'amerique du sud. *Mission Scientifique G. de Crequi-Monfort et Sénéchal de La Grange, Lacs Hauts Plateaux de l'Amerique Du Sud*, 1–22.
- Cole, G. A., & Watkins, R. L. (1977). *Hyaella montezuma*, a new species (crustacea: amphipoda) from montezuma well, Arizona. *Hydrobiologia*, 52(2–3), 175–184. <https://doi.org/10.1007/BF00036441>
- Coleman, C. O., & Gonzalez, E. R. (2006). New hyaellids (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) from Lake Titicaca. *Organisms Diversity and Evolution*, 6(3), 218–219. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2005.11.001>
- Colgan, D. J., McLauchlan, A., Wilson, G. D. F., Livingston, S. P., Edgecombe, G. D., Macaranas, J., Cassis, G., & Gray, M. R. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology*, 46(5), 419–437. <https://doi.org/10.1071/ZO98048>
- Colla, M. F., & César, I. I. (2015). A new species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from the Atlantic forest of Misiones, Argentina. *ZooKeys*, 38(481), 25–38. <https://doi.org/10.3897/zookeys.481.9037>
- Colla, M. F., & César, I. I. (2019). Ecological aspects of natural populations of *Hyaella pampeana* (Crustacea, amphipoda, hyaellidae) from the natural reserve island of

- Martín García (Río de La Plata, Argentina). *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91(1), 1–21. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920170928>
- Conde, D., Arocena, R., & Rodríguez, L. (2002). Recursos Acuáticos Superficiales De Uruguay: Ambientes, Algunas Problemáticas Y Desafíos Para La Gestión Las Aguas Superficiales Continentales. *Ambios*, 2002, 5–9 y 32–33. <http://limno.fcien.edu.uy/cd/html/public/pdf/articulos/Conde-et-al-recursosacuaticos-2002AMBIOS.pdf>
- Correa-Araneda, F., Rivera, R., Urrutia, J., De Los Ríos, P., Contreras, Á., & Encina-Montoya, F. (2010). Efectos de un afluente urbano sobre la comunidad de macroinvertebrados bentónicos de un ecosistema fluvial del sur de Chile. *Limnetica*, 29(2), 183–194. <https://doi.org/10.23818/limn.29.15>
- Cummins, K. W., Merritt, R. W., & Andrade, P. C. N. (2005). The use of invertebrate functional groups to characterize ecosystem attributes in selected streams and rivers in south Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 40(1), 69–89. <https://doi.org/10.1080/01650520400025720>
- da Silva Castiglioni, D. (2007a). Os ciclos biológicos de duas espécies simpátricas de *Hyaella* Smith 1874 (Crustacea, Peracarida, Amphipoda, Dogielinotidae). Tesis de Doctorado. Universidad Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.
- da Silva Castiglioni, D. & Bond-Buckup, G. (2007). Reproductive strategies of two sympatric species of *Hyaella* Smith, 1874 (Amphipoda, Dogielinotidae) in laboratory conditions. *Journal of Natural History*, 41(25–28), 1571–1584. <https://doi.org/10.1080/00222930701464604>
- da Silva Castiglioni, D. & Bond-Buckup, G. (2008a). Pairing and reproductive success in two sympatric species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from southern Brazil. *Acta Oecologica*, 33(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2007.09.008>
- da Silva Castiglioni, D. & Bond-Buckup, G. (2008b). Ecological traits of two sympatric species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from southern Brazil. *Acta Oecologica*, 33(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2007.09.007>
- da Silva Castiglioni, D. & Bond-Buckup, G. (2009). Egg production of two sympatric

- species of *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in aquaculture ponds in southern Brazil. *Journal of Natural History*, 43(21–22), 1273–1289. <https://doi.org/10.1080/00222930902903756>
- da Silva Castiglioni, D., Limberger, M., Castro, V. da S., & Ubessi, F. (2020). Population and reproductive traits of a freshwater amphipod (Crustacea, peracarida, hyalellidae) from northwest of the state of rio grande do sul, Brazil. *Biota Neotropica*, 20(2). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2019-0872>
- da Silva Castiglioni, D., Ozga, A. V., Rodrigues, S. G., & Bueno, A. A. P. (2016). Population dynamics of a freshwater amphipod from South America (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae). *Nauplius*, 24(0). <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2016028>
- da Silva Castiglioni, D., Streck, M. T., Rodrigues, S. G., & Bueno, A. A. P. (2018). Reproductive strategies of a population of a freshwater amphipod (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae) from southern Brazil. *Biota Neotropica*, 18(2). <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0470>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- De los Ríos-Escalante, P., Morrone, J. J., & Rivera, R. (2012). Distributional patterns of the South American species of *Hyaella* (Amphipoda: Hyalellidae). *Gayana (Concepción)*, 76(2), 153–161. <https://doi.org/10.4067/s0717-65382012000300008>
- De los Ríos Escalante, Patricio; Morrone, Juan; Rivera, R. (2013). Freshwater Malacostracans in Chilean Inland Waters a checklist of *Hyaella* (amphipoda) from Chile by Freshwater amphipods inhabit superficial and underground waters . They have different trophic roles : herbivores , carnivores , detritivores or omnivore. *Crustaceana*, 86(12), 1426–1432.
- de Oliveira, P. . L. (1953). Crustacea Amphipoda do Rio de Janeiro. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 51(1), 288–376.
- del Puerto, L., García Rodríguez, F., Bracco, R., Castiñeira, C., Blasi, A., Inda, H., Mazzeo, N., & Rodríguez, A. (2011). Evolución climática holocénica para el sudeste de Uruguay Análisis multi-proxy en testigos de lagunas costeras. In F.

- García Rodríguez (Ed.), *El Holoceno en la zona costera de Uruguay* (Ediciones, pp. 117–147).
- Dionne, K., Vergilino, R., Dufresne, F., Charles, F., & Nozais, C. (2011). No evidence for temporal variation in a Cryptic species community of freshwater amphipods of the *Hyalella azteca* species complex. *Diversity*, 3(3), 390–404.
<https://doi.org/10.3390/d3030390>
- Dos Santos, A. L. F., Araujo, P. B., & Bond-Buckup, G. (2008). New species and new reports of *Hyalella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) from Argentina. *Zootaxa*, 36(1760), 24–36. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1760.1.2>
- Doyle, S. R., & Momo, F. R. (2009). Effects of body weight and temperature on the metabolic rate of *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 (Amphipoda). *Crustaceana*, 82(11), 1423–1439.
<https://doi.org/10.1163/001121609X12475745628540>
- Drumm, D. T., & Knight-Gray, J. (2019). A new species of the *Hyalella* ‘azteca’ complex (Crustacea: Amphipoda: Hyalellidae) from Florida. *Zootaxa*, 4545(1), 93–104. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4545.1.5>
- Duan, Y., Guttman, S. I., Oris, J. T., & Bailer, A. J. (2000). Genetic structure and relationships among populations of *Hyalella azteca* and *H. montezuma* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of the North American Benthological Society*, 19(2), 308–320. <https://doi.org/10.2307/1468073>
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A. H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Eoff, G., Boxshall, A., & Jaume, D. (2009). Exopodites, Epipodites and Gills in Crustaceans. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 67(2), 229–254.
- Faxon, W. (1876). Exploration of Lake Titicaca by Alexander Agassiz and S.W. Garman. IV. Crustacea. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 3, 361–375.

- Filatov, D. A. (2002). PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2, 621–624. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278>
- Galassi, M. E., Franceschini, C., & Poi de Neiff, A. (2006). Population estimates of *Hyaella curvispina* Shoemaker (Amphipoda) in Aquatic vegetation of Northeastern Argentinian Ponds. *Acta Limnologica Brasiliense*, 18(1), 101–108.
- Giorgi, A., & Tiraboschi, B. (1999). Evaluacion experimental del efecto de dos grupos de macroinvertebrados (anfipodos y gasteropodos) sobre algas epifitas. *Ecologia Austral*, 9(1–2), 35–44.
- González, E. R., Bond-Buckup, G., & Araujo, P. B. (2006). Two new species of *Hyaella* from Southern Brazil (Amphipoda: Hyaellidae) with a taxonomic key. *Journal of Crustacean Biology*, 26(3), 355–365. <https://doi.org/10.1651/C-2599.1>
- González, E. R., & Coleman, C. O. (2002). *Hyaella armata* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) and the description of a related new species from Lake Titicaca. *Organisms Diversity and Evolution*, 2(3), 271–273. <https://doi.org/10.1078/1439-6092-00047>
- González, E. R., Haye, P. A., Balanda, M. J., & Thiel, M. (2008). Lista sistematica de especies de peracaridos de Chile (Crustacea, Eumalacostraca). *Gayana*, 72(2), 157–177. <https://doi.org/10.4067/s0717-65382008000200006>
- González, E. R., & Watling, L. (2001). Three new species of *Hyaella* from Chile (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae). *Hydrobiologia*, 464, 175–199. <https://doi.org/10.1023/A:1013961904370>
- González, E. R., & Watling, L. (2002a). A new species of *Hyaella* from the Andes in Perú (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae). *Revista de Biología Tropical*, 50(2), 649–658.
- González, E. R., & Watling, L. (2002b). Redescription of the freshwater amphipod *Hyaella faxoni* from Costa Rica (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae). *Revista de Biología Tropical*, 50(2), 659–667.
- Gonzalez, E. R., & Watling, L. (2002c). Redescription of *Hyaella azteca* from its type locality, Vera Cruz, Mexico (Amphipoda: Hyaellidae). *Journal of Crustacean*

Biology, 22(1), 173–183. [https://doi.org/10.1651/0278-0372\(2002\)022\[0173:rohafi\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1651/0278-0372(2002)022[0173:rohafi]2.0.co;2)

- González, E. R., & Watling, L. (2003a). A new species of *Hyaella* from Brazil (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae), with redescrptions of three other species in the genus. *Journal of Natural History*, 37(17), 2045–2076. <https://doi.org/10.1080/00222930210133237>
- González, E. R., & Watling, L. (2003b). A new species of *Hyaella* from Colombia, and the redescription of *H. meinerti* Stebbing, 1899 from Venezuela (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Natural History*, 37(17), 2095–2111. <https://doi.org/10.1080/00222930210133255>
- González, E. R., & Watling, L. (2003c). A new species of *Hyaella* from the Patagonia, Chile, with redescription of *H. simplex* Schellenberg, 1943 (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Natural History*, 37(17), 2077–2094. <https://doi.org/10.1080/00222930210133246>
- González, E. R., & Watling, L. (2003d). Two new species of *Hyaella* from Lake Titicaca, and redescrptions of four others in the genus (Crustacea: Amphipoda). *Hydrobiologia*, 497(1876), 181–204. <https://doi.org/10.1023/A:1025451813972>
- Grapentine, L. C. & Rosenberg, D. M. (1992). Responses of the freshwater amphipod *Hyaella azteca* to environmental acidification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(1), 52-64.
- Grosso, L. E., & Peralta, M. (1999). Anfípodos de agua dulce sudamericanos. Revisión del género *Hyaella* Smith. I. *Acta Zoologica Lilloana*, 45(1), 79–98.
- Harris, P. M., Roosa, B. R., & Norment, L. (2002). Underground dispersal by amphipods (*crangonyx pseudogracilis*) between temporary ponds. *Journal of Freshwater Ecology*, 17(4), 589–594. <https://doi.org/10.1080/02705060.2002.9663936>
- Jaume, D., Zapelloni, F., Pons, J., Juan, C., & Jurado-Rivera, J. A. (2021). The *Hyaella* species flock of Lake Titicaca (Crustacea: Amphipoda): Perspectives and drawbacks of DNA-based Identification. In *Contributions to Zoology* (Vol. 125, Issue 1). <https://doi.org/10.1163/18759866-bja10021>

- Juan, C., Jurado-Rivera, J. A., Moreno, E., Wolff, C., Jaume, D., & Pons, J. (2016). The mitogenome of the amphipod *Hyalella lucifugax* (Crustacea) and its phylogenetic placement. *Mitochondrial DNA Part B*, 1(1), 755–756.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1214554>
- Jurado-Rivera, J. A., Zapelloni, F., Pons, J., Juan, C., & Jaume, D. (2020). Morphological and molecular species boundaries in the *Hyalella* species flock of Lake Titicaca (Crustacea: Amphipoda). *Contributions to Zoology*, 89(4), 353–372.
<https://doi.org/10.1163/18759866-bja10004>
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A. & Flouri, T. (2017). Multirate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 33, 1630–1638.
- Kestrup, Å., & Ricciardi, A. (2010). Influence of conductivity on life history traits of exotic and native amphipods in the St. Lawrence River. *Fundamental and Applied Limnology*, 176(3), 249–262. <https://doi.org/10.1127/1863-9135/2010/0176-0249>
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Laufer, G., Arim, M., Loureiro, M., Piñeiro-Guerra, J. M., Clavijo-Baquet, S., & Fagúndez, C. (2009). Diet of four annual killifishes: An intra and interspecific comparison. *Neotropical Ichthyology*, 7(1), 77–86. <https://doi.org/10.1590/s1679-62252009000100010>
- Leistikow, A. (2001). Phylogeny and biogeography of South American Crinocheta, traditionally placed in the family Philosciidae (Crustacea: Isopoda: Oniscidea). *Organisms Diversity & Evolution*, 1(3), 239–240. <https://doi.org/10.1078/1439-6092-00020>
- Limberger, M., Santos, S., Da, D., & Castiglioni, S. (2022). *Hyalella luciae* (Crustacea, Amphipoda, Hyalellidae)—a new species of freshwater amphipod from Southern

- Brazil. *Zootaxa*. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5174.5.5>
- Lowry, J. K., & Myers, A. A. (2013). A Phylogeny and Classification of the Senticaudata subord. nov. (Crustacea: Amphipoda). In *Zootaxa* (Vol. 3610, Issue 1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3610.1.1>
- Lowry, J. K., & Myers, A. A. (2017). A phylogeny and classification of the amphipoda with the establishment of the new order Ingolfiellida (Crustacea: Peracarida). In *Zootaxa* (Vol. 4265, Issue 1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4265.1.1>
- Major, K., Soucek, D. J., Giordano, R., Wetzel, M. J., & Soto-Adames, F. (2013). The common ecotoxicology laboratory strain of *Hyaella azteca* is genetically distinct from most wild strains sampled in Eastern North America. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(11), 2637–2647. <https://doi.org/10.1002/etc.2355>
- Marrón-Becerra, A. & Hermoso-Salazar, M. (2022) Morphological comparison and description of five new species of *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda) from Veracruz and Mexico City. *Journal of Natural History*, 56:25-28, 1215 1263, DOI: [10.1080/00222933.2022.2078241](https://doi.org/10.1080/00222933.2022.2078241)
- Marrón-Becerra, A., Hermoso-Salazar, M., & Rivas, G. (2020). A new species of the genus *Hyaella* (Crustacea, amphipoda) from Northern Mexico. *ZooKeys*, 2020(942), 1–19. <https://doi.org/10.3897/Zookeys.942.50399>
- Marrón-Becerra, A., Hermoso-Salazar, M., & Solís-Weiss, V. (2014). *Hyaella cenotensis*, a new species of Hyalellidae (Crustacea: Amphipoda) from the Yucatán Peninsula, Mexico. *Zootaxa*, 3811(2), 262–270. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3811.2.7>
- Marrón-Becerra, A., Hermoso-Salazar, M., & Solís-Weiss, V. (2018). *Hyaella maya*, a new hyalellidae species (Crustacea: Amphipoda) from a cenote in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Journal of Cave and Karst Studies*, 80(2), 1–11. <https://doi.org/10.4311/2017LSC0115>
- Martin, Joel and Davis, G. (2003). An Updated Classification of the Recent Crustacea. In *Journal of Crustacean Biology* (Vol. 23, Issue 2). [https://doi.org/10.1651/0278-0372\(2003\)023\[0495:br\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1651/0278-0372(2003)023[0495:br]2.0.co;2)
- Meyer, A. (1993). Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In P. Hochachka & T. .

- Mommsen (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes* (Vol. 1, Issue 7, pp. 1–38). Elsevier.
- Monod, T. (1970). V. Sur Quelques Crustacés Malacostracés des îles Galapagos récoltés par. N. ET. Leleup (1964-1965). *Mission Zoologique Belge Aux. Iles Galapagos et En Ecuador, II*, 11–53.
- Mugni, H., Paracampo, A., Marrochi, N., & Bonetto, C. (2013). Acute toxicity of cypermethrin to the non target organism *Hyaella curvispina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(1), 88–92.
<https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.11.008>
- Nel, J. L., Reyers, B., Roux, D. J., & Cowling, R. M. (2009). Expanding protected areas beyond their terrestrial comfort zone: Identifying spatial options for river conservation. *Biological Conservation*, 142(8), 1605–1616.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.031>
- Nelson, M. K., & Brunson, E. L. (1995). Postembryonic growth and development of *Hyaella azteca* in laboratory cultures and contaminated sediments. *Chemosphere*, 31(4), 3129–3140. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(95\)00171-4](https://doi.org/10.1016/0045-6535(95)00171-4)
- Peralta, M. A., & Miranda, Á. V. I. (2019). A new species of *Hyaella* (crustacea, amphipoda, hyalellidae) from the Puna biogeographic province in Argentina. *ZooKeys*, 2019(865), 87–102. <https://doi.org/10.3897/zookeys.865.32878>
- Peralta, M., & Grosso, L. E. (2009). Crustacea, Syncarida, Amphipoda y Decapoda. In E. Domínguez & H. R. Fernández (Eds.), *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos* (Fundación, pp. 469–496).
- Pereira, Vania F., & Goulart, C. (1985). Redescricao de *Hyaella pernix* (Moreira) (Amphipoda- Hyalellidae) com discussao de seu sinonimo *H. curvispina* Shoemaker. *Revista Brasileira de Zoologia*, 3(4), 209–217.
- Pereira, Vania F., & Goulart, C. (2004). *Hyaella dielaii* sp. nov. from São Paulo, Brazil (Amphipoda, Hyalellidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, 21(2), 179–184.
<https://doi.org/10.1590/s0101-81752004000200003>
- Pereira, Vânia F., & Goulart, C. (1989). Uma nova espécie de anfípode cavernícola do Brasil: *Hyaella caeca* sp.n. (Amphipoda, Hyalellidae). *Revista Brasileira de*

- Zoologia*, 6(1), 49–55. <https://doi.org/10.1590/s0101-81751989000100007>
- Pons, J., Barraclough, T.G., Gómez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D.P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D. & Vogler, A.P. (2006). Sequencebased species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55, 595– 609.
- Poore, G. C. B. (2005). Peracarida: monophyly, relationships and evolutionary success. *Nauplius*, 13(1), 1–27.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. In *Bioinformatics Applications Note* (Vol. 14, Issue 9, pp. 817–818). <https://doi.org/10.1063/1.2218048>
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G (2012) Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* 21(8): 1864–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Rambaut, A. (2018). *Fig tree Version 1.4.4*. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Reis, G. O., Penoni, L. R., & Bueno, A. A. P. (2020). First record of the genus *Hyaella* (Amphipoda: Hyaellidae) from Santa Catarina State, Brazil, with description of two new species. *Biota Neotropica*, 20(2), 2–12. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2019-0879>
- Rodrigues, S.G. (2011). *Hyaella* Smith 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) em áreas úmidas do Rio Grande do Sul, Brasil. Tesis de Maestría. Universidade Federal de Lavras. Brasil.
- Rodrigues, S. G. (2016). Filogenia Molecular , Biogeografía E Estrutura Populacional De Anfípodos De Água Doce (Crustacea , Hyaellidae) Da América Do Sul. Tesis de Doctorado. Universidade Federal de Lavras. Brasil.
- Rodrigues, S. G., Bueno, A. A. P., & Ferreira, R. L. (2012). The first hypothelminorheic Crustacea (Amphipoda, Dogielinotidae, *Hyaella*) from South America. *ZooKeys*, 236, 65–80. <https://doi.org/10.3897/zookeys.236.3930>
- Rodrigues, S. G., Bueno, A. A. P., & Ferreira, R. L. (2014). A new troglotibiotic species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Hyaellidae) with a taxonomic key for the Brazilian species. *Zootaxa*, 3815(2), 200–214.

<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3815.2.2>

- Rodrigues, S. G., Senna, A. R., Quadra, A., & Bueno, A. A. P. (2017). A new species of *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Itatiaia National Park, Brazil: An epigean freshwater amphipod with troglobiotic traits at 2,200 meters of altitude. *Zootaxa*, 4344(1), 147–159. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4344.1.6>
- Ruffo, S. (1947). Studi sui crostacei anfipodi. *Bolletino Del Laboratorio Di Entomologia Agraria*, 7(1), 326–332.
- Saigo, M., Marchese, M., & Montalto, L. (2009). Hábitos alimentarios de *Hyaella curvispina* Shoemaker, 1942 (Amphipoda : Gammaridea) en ambientes lénticos de la llanura aluvial del río Paraná medio. *Natura Neotropicalis*, 40, 43–59.
- Saldamando, C. I., & Marquez, E. J. (2012). Aproximación a la filogenia de Spodoptera (Lepidoptera: Noctuidae) con el uso de un fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI). *Revista de Biología Tropical*, 60(3), 1237–1248. <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i3.1775>
- Schellenberg, A. (1943). Susswasser amphipoden (Crust.). *Beitr. Zur Fauna Perus*, 2, 200–206.
- Serejo, C. S. (2004). Cladistic revision of talitroidean amphipods (Crustacea, Gammaridea), with a proposal of a new classification. In *Zoologica Scripta* (Vol. 33, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/j.0300-3256.2004.00163.x>
- Shoemaker, R. (1942). A new species of Amphipoda from Uruguay and Brazil. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 32(1), 80–83.
- Smith, S. I. (1875). *Report on the Amphipod Crustaceans. Annual Report of the United States Geological and Geographical Survey of the Territories, Embracing Colorado. The Exploration for the Year 1873, by F. V. Hayden, Washington, Government Printing Office, 1874.* 608–611.
- Soucek, D. J., Lazo-Wasem, E. A., Taylor, C. A., & Major, K. M. (2015). Description of two new species of *Hyaella* (amphipoda: Hyaellidae) from eastern North America with a revised key to North American members of the genus. *Journal of Crustacean Biology*, 35(6), 814–829. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002373>
- Stenert C., dos Santos E.M. & L. Maltichik. (2004). Levantamento da diversidade de

- macroinvertebrados en áreas úmidas do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Biologica Leopoldensia*, Sao Leopoldo, 2(26): 225-240.
- Stevenson, M. M., & Peden, A. E. (1973). Description and Ecology of *Hyaletta texana* n. sp. (Crustacea: Amphipoda) from the Edwards Plateau of Texas. *The American Midland Naturalist*, 89(2), 426. <https://doi.org/10.2307/2424045>
- Stock, J. H., & Platvoet, D. (1991). The freshwater amphipoda of the falkland islands. *Journal of Natural History*, 25(6), 1469–1491. <https://doi.org/10.1080/00222939100770941>
- Strayer, D. L., & Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: Recent progress and future challenges. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(1), 344–358. <https://doi.org/10.1899/08-171.1>
- Streck Marx, M. T., Cardoso, G. M., Graichen, D. A. S., Rodrigues, S. G., & da Silva Castiglioni, D. (2017). Two new species of *Hyaletta* (Crustacea, Amphipoda, Hyaletellidae) from state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Zootaxa*, 2(1), 263–278. <https://doi.org/https://doi.org/10.11646/zootaxa.4337.2.5>
- Streck Marx, M. T., & da Silva Castiglioni, D. (2020). A new species of freshwater amphipod (Crustacea, amphipoda, hyaletellidae) from state of Rio Grande do sul, southern Brazil. *Biota Neotropica*, 20(1), 1–12. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2019-0802>
- Stutz, H. L., Shiozawa, D. K., & Evans, R. P. (2010). Inferring dispersal of aquatic invertebrates from genetic variation: A comparative study of an amphipod and mayfly in Great Basin springs. *Journal of the North American Benthological Society*, 29(3), 1132–1147. <https://doi.org/10.1899/09-157.1>
- Subida, M. D., Cunha, M. R., & Moreira, M. H. (2005). Life history, reproduction, and production of *Gammarus chevreuxi* (Amphipoda:Gammaridae) in the Ria de Aveiro, northwestern Portugal. *Journal of the North American Benthological Society*, 24(1), 82–100. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2005\)024<0082:LHRAPO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2005)024<0082:LHRAPO>2.0.CO;2)
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1), 1–5. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>

- Talhaferro, J. T., De Padúa Bueno, A., Pires, M. M., Stenert, C., Maltchik, L., & Kotzian, C. B. (2021a). Three new species of *Hyalessa* (Crustacea: Amphipoda: Hyalessidae) from the Southern Brazilian Coastal Plain. *Zootaxa*, 4970(2), 257–292. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4970.2.2>
- Talhaferro, J. T., Pires, M. M., Stenert, C., Maltchik, L., Bueno, A. A. de P., & Kotzian, C. B. (2021b). Diversity and distribution of the genus *Hyalessa* (Crustacea: Amphipoda: Hyalessidae) in temporary wetlands from the southern Brazilian Coastal Plain, with a taxonomic key to the species in the region. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 00(00), 1–17. <https://doi.org/10.1080/01650521.2021.1964902>
- Thiel, M. (1999). Extended parental care in marine amphipods II. Maternal protection of juveniles from predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 234(2), 235–253. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00150-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00150-6)
- Vásquez, G. S., Castro, G. M., Gonzáles, I. M., Pérez, R. R., & Castro, T. B. (2006). Bioindicadores como herramientas para determinar la calidad del agua. *ContactoS*, 60, 41–48. <http://www.izt.uam.mx/contactos/n60ne/Bio-agua.pdf>
- Vergilino, R., Dionne, K., Nozais, C., Dufresne, F., & Belzile, C. (2012). Genome size differences in *Hyalessa* cryptic species. *Genome*, 55(2), 134–139. <https://doi.org/10.1139/g11-085>
- Vernica, I., & Peralta, A. M. (2022). A new *Hyalessa* species (Crustacea: Amphipoda: Hyalessidae) from South American Highlands (Argentina) with comments on its cuticular ultrastructure. *Zootaxa*, 5105(2), 202–218. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5105.2.2>
- Wantzen, K. M., & Wagner, R. (2006). Detritus processing by invertebrate shredders: A neotropical-temperate comparison. *Journal of the North American Benthological Society*, 25(1), 216–232. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2006\)25\[216:DPBISA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2006)25[216:DPBISA]2.0.CO;2)
- Weckel, A. L. (1907). The fresh water amphipoda of North America. *Proceedings U.S. National Museum*, XXXII(1507), 25–58.
- Wellborn, G. A. (1995). Determinants of reproductive success in freshwater amphipod species that experience different mortality regimes. *Animal Behaviour*, 50(2), 353–

363. <https://doi.org/10.1006/anbe.1995.0251>
- Wellborn, G. A., & Bartholf, S. E. (2005). Ecological context and the importance of body and gnathopod size for pairing success in two amphipod ecomorphs. *Oecologia*, *143*(2), 308–316. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1786-x>
- Wellborn, G. A., & Broughton, R. E. (2008). Diversification on an ecologically constrained adaptive landscape. *Molecular Ecology*, *17*(12), 2927–2936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03805.x>
- Wellborn, G. A., & Cothran, R. D. (2004). Phenotypic similarity and differentiation among sympatric cryptic species in a freshwater amphipod species complex. *Freshwater Biology*, *49*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2426.2003.01160.x>
- Wen, Y. H. (1993). Sexual Dimorphism and Mate Choice in *Hyaella azteca* (Amphipoda). *American Midland Naturalist*, *129*(1), 153. <https://doi.org/10.2307/2426444>
- Wilke, T., Schultheiß, R., & Albrecht, C. (2009). As time goes by: A simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates. *American Malacological Bulletin*, *27*(1–2), 25–45. <https://doi.org/10.4003/006.027.0203>
- Witt, J. D. S., Blinn, D. W., & Hebert, P. D. N. (2003). The recent evolutionary origin of the phenotypically novel amphipod *Hyaella montezuma* offers an ecological explanation for morphological stasis in a closely allied species complex. *Molecular Ecology*, *12*(2), 405–413. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01728.x>
- Witt, J. D. S., & Hebert, P. D. N. (2000). Cryptic species diversity and evolution in the amphipod genus *Hyaella* within central glaciated North America: A molecular phylogenetic approach. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *57*(4), 687–698. <https://doi.org/10.1139/f99-285>
- Witt, J. D. S., Threlkoff, D. L., & Hebert, P. D. N. (2006). DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: Implications for desert spring conservation. *Molecular Ecology*, *15*(10), 3073–3082. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02999.x>
- Worsham, M. L. D., Julius, E. P., Nice, C. C., Diaz, P. H., & Huffman, D. G. (2017).

Geographic isolation facilitates the evolution of reproductive isolation and morphological divergence. *Ecology and Evolution*, 7(23), 10278–10288. <https://doi.org/10.1002/ece3.3474>

Xia, X. (2018). DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1550–1552. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy073>

Zapelloni, F., Pons, J., Jurado-Rivera, J. A., Jaume, D., & Juan, C. (2021). Phylogenomics of the *Hyaella* amphipod species-flock of the Andean Altiplano. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79620-4>

Zimmer, A.D. (2007). Ultraestructura cuticular de duas especies simpátricas de *Hyaella* Smith, 1874 (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). Tesis de Maestría. Universidad Federal do Rio Grande do Sul. Brasil.

Zimmer, A., Araujo, P. B., & Bond-Buckup, G. (2009). Diversity and arrangement of the cuticular structures of *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda: Dogielinotidae) and their use in taxonomy. *Zoologia*, 26(1), 127–142. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702009000100019>

MATERIAL ANEXO

ANEXO TABLAS

Tabla SI. Localidades y sus coordenadas geográficas de *H. curvispina* y los morfotipos recolectados en Uruguay.

	Localidad	Latitud (S)	Longitud (W)
H1	Colonia	34°26'03.1"	57°49'28.3"
H2	Colonia Rosell y Rius	33°12.8'76'	55°41.4'85"
H3	Durazno	33°38.8'79"	56°53.6'66"
H4	Lavalleja	34°30.4'36"	55°22.3'14"
H5	Paso de los Toros	32°39.5'43"	56°28.7'03"
H6	Achar	32°23'49.4"	56°09'26"
H7	Batoví	31°52'55.7"	56°00'42.7"
H8	San José	34°18'39"	56°52'42"
<i>H. curvispina</i>	Montevideo FC	34°52'50"	56°07'03"
<i>H. curvispina</i>	Montevideo Localidad tipo	34°50'22"	56°16'3"

Tabla SII. Número de voucher, Molecular Operational Taxonomic Units (Jurado-Rivera et al.2020) y código de acceso a GenBank de las secuencias de los géneros *Hyaella* y *Platorchestia* utilizadas como grupos externos para cada marcador molecular.

Nº de voucher	MOT U	Especie	COI	12S	28S	H3
26-2 ^a	C1	<i>H. armata</i> Perú	MT67203 8.	MT672038. 1	MW0471 12.1	MN5824 14.1
2319-B	E1	<i>H. kochi A</i> Perú	MT67204 3.1	MT672043. 1	MW0471 28.1	MN5823 76.1
AP18	A2	<i>H. kochi C</i> Perú	MT67204 6.1	MT672046. 1	MW0471 36.1	MN5824 01.1
4747	E3	<i>H. kochi B</i> Perú	MT67204 4.1	MT672044. 1	MW0471 31.1	MN5823 74.1
EC6-1	EC2	<i>H. cajasi</i> Ecuador	MT67202 8.1	-----	MW0471 39.1	MN5823 86.1

EC3-1	F1	<i>H. cajasi</i> A Ecuador	MT67202 6.1	MT672026. 1	MW0471 38.1	MN5823 85.1
2304	D1	<i>H. tiwanaku</i> A Perú	MT67202 0.1	MT672020. 1	MW0471 24.1	MN5823 51.1
4743	D2	<i>H. tiwanaku</i> Bolivia	MT67204 5.1	MT672045. 1	-----	MN5824 19.1
2316D	A1	<i>H. neveulemai</i> <i>rei</i> Perú	MT67203 2.1	-----	MW0471 26.1	MN5824 07.1
2310E	A1	<i>H. nefrens</i> A Bolivia	MT67202 4.1	MT672024. 1	MW0471 25.1	MN5823 94.1
30-5D	A1	<i>H. neveulemai</i> <i>rei</i> A Perú	MT67203 9.1	MT672039. 1	MW0471 14.1	MN5823 95.1
30-5C	A6	<i>H. hirsuta</i> Perú	MT67201 9.1	MT672019. 1	MW0471 13.1	MN5823 93.1
2015_2D	E2	<i>H. montforti</i> Perú	MT67204 2.1	MT672042. 1	MW0471 21.1	MN5823 79.1
2319-A	D1	<i>H. solida</i> Perú	MT67202 1.1	MT672043. 1	-----	MN5823 65.1
-----	-----	<i>H. azteca</i> EEUU	JQDR030 04943.1	JQDR0300 5174.1	XM0181 59072	XM0181 64572
-----	-----	<i>H. simplex</i> Chile	AF52043 4.1	-----	-----	-----
-----	-----	<i>H. lucifugax</i> Perú	LT59476 7.1	LT594767. 1	-----	-----
-----	-----	<i>H. muerta</i> EEUU	-----	-----	DQ46472 9.1	-----
CHL-1	CH1	<i>H. franciscae</i> Chile	MT67204 8.1	MT672048. 1	MW0471 37.1	-----
1356B	A1	<i>H. longipalma</i> Perú	MT67201 7.1	MT672017. 1	MW0471 17.1	-----
-----	-----	<i>H. cuprea</i> Perú	MT67201 8	MT672018	-----	-----

16 2B	B1	<i>H. kochi</i> Perú	MT67202 9.1	-----	MW0471 46.1	-----
3TK27	E1	<i>H. kochi</i> Perú	MT67203 7.1	MT672037. 1	MW0471 45.1	-----
1410C	E2	<i>H. montfoti</i> Perú	MT67204 2.1	MT672040. 1	MW0471 19.1	-----
ecuador02	EC3	<i>H. cajasi</i> Ecuador	MT67204 9	MT672049. 1	MW0471 40.1	-----
4822	A1	<i>H. kochi</i> Perú	MT67204 7.1	-----	MW0471 35.1	MN5824 02.1
4798 ^a	A1	<i>H. nefrens</i> Bolivia	MT67202 2.1	MT672022. 1	MW0471 32.1	-----
1377B	A5	<i>H. longipalma</i> Perú	MN58228 2.1	-----	MW0471 18.1	-----
31-10C	A1	<i>H. sp.</i> Perú	MT67203 0.1	-----	MW0471 16.1	-----
3TK17B	A4	<i>H. kochi</i> Perú	MT67203 6.1	MW04714 4.1	-----	-----
IZCAS:IA 1700i	-----	<i>P. japonica</i> Asia	MK28654 9.1	-----	-----	-----
YP8	-----	<i>P. japonica</i> Asia	-----	-----	KC5783 42.1	-----
NIBRIV0 00000000 0	-----	<i>P. parapacific</i> a Asia	-----	MG010371 .1	-----	-----
DF1	-----	<i>P. pacifica</i> Asia	-----	-----	-----	KC5784 02.1

Tabla SIII. Código de acceso a GenBank y código de las muestras de las secuencias de *Hyaella* obtenidas para ejemplares de Uruguay.

Código de la muestra	Especie	Localidad	COI GenBank accession number	12S GenBank accession number	28S GenBank accession number	H3 GenBank accession number
HFC(1)	<i>H. curvispin</i> a	Montevideo	MZ75451 8	-----	-----	-----
HFC(2)	<i>H. curvispin</i> a	Montevideo	MZ75451 9	MZ75090 0	MZ75089 0	MZ73685 0
HFC(3)	<i>H. curvispin</i> a	Montevideo	-----	MZ75090 1	-----	-----
HMV D	<i>H. curvispin</i> a	Montevideo	-----	MZ75090 2	MZ75089 1	MZ73685 1

		Localidad tipo				
H1(1)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia	MZ75452 <u>0</u>	MZ75090 <u>3</u>	MZ75089 <u>3</u>	MZ73685 <u>2</u>
H1(2)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia	MZ75452 <u>1</u>	----	----	----
H1(3)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia	----	MZ75090 <u>4</u>	MZ75089 <u>4</u>	----
H1(4)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia	----	MZ75090 <u>5</u>	----	----
H1(5)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia	----	MZ75090 <u>6</u>	----	----
H2(1)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia Rosell y Rius- Durazno	MZ75452 <u>2</u>	MZ75091 <u>1</u>	MZ75089 <u>4</u>	MZ73685 <u>5</u>
H2(2)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia Rosell y Rius- Durazno	----	MZ75091 <u>2</u>	----	----
H2(3)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia Rosell y Rius- Durazno	----	MZ75091 <u>3</u>	----	----
H2(4)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Colonia Rosell y Rius- Durazno	----	MZ75091 <u>4</u>	----	----
H3(1)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Durazno	MZ75452 <u>3</u>	MZ75092 <u>4</u>	MZ75089 <u>7</u>	MZ73685 <u>7</u>
H3(2)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Durazno	MZ75452 <u>4</u>	MZ75092 <u>2</u>	----	----
H3(3)	<i>H. curvispin</i> <i>a</i>	Durazno	----	MZ75092 <u>3</u>	----	----
H4(1)	<i>H. sp. n.</i> 1	Lavalleja	MZ75452 <u>5</u>	MZ75092 <u>6</u>	MZ75089 <u>9</u>	MZ73685 <u>9</u>
H4(2)	<i>H. sp. n.</i> 1	Lavalleja	MZ75452 <u>5</u>	MZ75092 <u>8</u>	----	----
H4(2V)	<i>H. sp. n.</i> 1	Lavalleja	MZ75452 <u>7</u>	MZ75092 <u>5</u>	----	----
H4(3)	<i>H. sp. n.</i> 1	Lavalleja	----	MZ75092 <u>7</u>	----	----

H5	<i>H. curvispinosa</i>	Paso de los Toros-Tacuarembó	MZ74215 <u>4</u>	MZ75092 <u>1</u>	MZ75089 <u>8</u>	MZ73685 <u>8</u>
H6(2)	<i>H. curvispinosa</i>	Achar-Tacuarembó	-----	MZ75091 <u>5</u>	MZ75089 <u>5</u>	MZ73685 <u>4</u>
H6(4)	<i>H. curvispinosa</i>	Achar-Tacuarembó	-----	MZ75091 <u>6</u>	-----	-----
H7(1)	<i>H. sp. n. 2</i>	Batoví-Tacuarembó	-----	MZ75091 <u>7</u>	MZ75089 <u>6</u>	MZ73685 <u>6</u>
H7(2)	<i>H. sp. n. 2</i>	Batoví-Tacuarembó	-----	MZ75092 <u>0</u>	-----	-----
H7(3)	<i>H. sp. n. 2</i>	Batoví-Tacuarembó	-----	MZ75091 <u>8</u>	-----	-----
H7(4)	<i>H. sp. n. 2</i>	Batoví-Tacuarembó	-----	MZ75091 <u>9</u>	-----	-----
H8(1)	<i>H. curvispinosa</i>	San José	-----	MZ75091 <u>0</u>	MZ75089 <u>2</u>	MZ73685 <u>3</u>
H8(2)	<i>H. curvispinosa</i>	San José	-----	MZ75090 <u>7</u>	-----	-----
H8(3)	<i>H. curvispinosa</i>	San José	-----	MZ75090 <u>8</u>	-----	-----
H8(4)	<i>H. curvispinosa</i>	San José	-----	MZ75090 <u>9</u>	-----	-----

Tabla S IV. COI. Distancia genética por pares medida bajo el modelo de sustitución K2P entre secuencias de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
1	<i>Hyalella maculipes</i>																																										
2	K1, Montevideo <i>Hyalella maculipes</i>	0.00																																									
3	H1(1) Colonia	0.00	0.00																																								
4	H1(2) Colonia	0.06	0.06	0.06																																							
5	CK, Durazno H1(1)	0.08	0.08	0.08	0.14																																						
6	Durazno H1(2)	0.05	0.05	0.05	0.09	0.05																																					
7	Durazno H5	0.04	0.04	0.04	0.10	0.04	0.01																																				
8	PT, Trentinhó H1(2)	0.08	0.08	0.08	0.15	0.10	0.08	0.05																																			
9	Lavalleja H1(2)	0.01	0.01	0.01	0.07	0.07	0.05	0.05	0.09																																		
10	Lavalleja H1(2)	0.17	0.17	0.17	0.25	0.21	0.17	0.16	0.19	0.18																																	
11	Lavalleja H1(2)	0.18	0.18	0.18	0.26	0.21	0.17	0.16	0.18	0.19	0.04																																
12	<i>H. maculipes</i> 201520 (E2)	0.10	0.10	0.10	0.18	0.16	0.11	0.10	0.12	0.11	0.21	0.21																															
13	<i>H. maculipes</i> AT18 (A3)	0.26	0.26	0.26	0.29	0.29	0.26	0.24	0.26	0.26	0.20	0.20	0.23																														
14	<i>H. maculipes</i> 47 (E3)	0.15	0.15	0.15	0.21	0.19	0.15	0.18	0.15	0.20	0.22	0.07	0.27																														
15	<i>H. maculipes</i> 4822 (A1)	0.26	0.26	0.26	0.27	0.30	0.26	0.25	0.26	0.26	0.26	0.30	0.12	0.29																													
16	<i>H. maculipes</i> 23108 (E1)	0.18	0.18	0.18	0.24	0.24	0.18	0.18	0.21	0.19	0.22	0.09	0.23	0.08	0.28																												
17	<i>H. maculipes</i> 1620 (B1)	0.24	0.24	0.24	0.30	0.29	0.24	0.23	0.28	0.26	0.24	0.30	0.18	0.28	0.25	0.28																											
18	<i>H. maculipes</i> 37823 (E1)	0.14	0.14	0.14	0.21	0.19	0.18	0.14	0.17	0.15	0.17	0.18	0.08	0.27	0.07	0.25	0.08	0.30																									
19	<i>H. maculipes</i> 37867 (A4)	0.25	0.25	0.25	0.28	0.27	0.21	0.22	0.25	0.25	0.30	0.31	0.24	0.03	0.27	0.09	0.23	0.18	0.25																								
20	<i>H. maculipes</i> 4743 (D2)	0.21	0.21	0.21	0.24	0.27	0.20	0.21	0.20	0.23	0.19	0.16	0.22	0.26	0.25	0.24	0.17	0.22	0.19	0.23																							
21	<i>H. maculipes</i> 3110C (A3)	0.29	0.29	0.29	0.29	0.31	0.26	0.28	0.28	0.29	0.20	0.31	0.27	0.11	0.28	0.21	0.25	0.09	0.25	0.21	0.25																						
22	<i>H. maculipes</i> 4798 (A1)	0.26	0.26	0.26	0.28	0.28	0.24	0.25	0.26	0.26	0.24	0.08	0.24	0.09	0.25	0.20	0.20	0.04	0.05	0.25	0.06	0.08	0.28																				
23	<i>H. maculipes</i> 23841 (D1)	0.20	0.20	0.20	0.23	0.26	0.18	0.20	0.19	0.21	0.22	0.19	0.22	0.27	0.20	0.25	0.19	0.23	0.24	0.03	0.13	0.27	0.24																				
24	<i>H. maculipes</i> 23803 (A3)	0.29	0.29	0.29	0.30	0.31	0.26	0.28	0.30	0.29	0.24	0.25	0.30	0.09	0.27	0.09	0.28	0.18	0.25	0.10	0.28	0.24	0.05	0.07	0.30																		
25	<i>H. maculipes</i> 3650 (A1)	0.28	0.28	0.28	0.28	0.30	0.26	0.25	0.29	0.28	0.26	0.28	0.08	0.27	0.18	0.24	0.09	0.27	0.23	0.04	0.06	0.28	0.03	0.04																			
26	<i>H. maculipes</i> 2310E (A1)	0.20	0.20	0.20	0.24	0.26	0.18	0.20	0.19	0.21	0.18	0.14	0.21	0.24	0.24	0.18	0.24	0.18	0.23	0.02	0.12	0.25	0.23	0.05	0.28	0.27	0.27																
27	<i>H. maculipes</i> 13778 (A5)	0.26	0.26	0.26	0.28	0.28	0.24	0.28	0.28	0.24	0.11	0.24	0.08	0.25	0.23	0.20	0.09	0.24	0.20	0.04	0.05	0.25	0.06	0.08	0.24																		
28	<i>H. maculipes</i> 13778 (A5)	0.26	0.26	0.26	0.28	0.28	0.24	0.28	0.28	0.24	0.11	0.24	0.08	0.25	0.23	0.20	0.09	0.24	0.20	0.04	0.05	0.25	0.06	0.08	0.24																		
29	<i>H. maculipes</i> 13778 (A5)	0.26	0.26	0.26	0.28	0.28	0.24	0.28	0.28	0.24	0.11	0.24	0.08	0.25	0.23	0.20	0.09	0.24	0.20	0.04	0.05	0.25	0.06	0.08	0.24																		
30	<i>H. maculipes</i> 13808 (A1)	0.26	0.26	0.26	0.28	0.28	0.24	0.28	0.28	0.24	0.11	0.24	0.08	0.25	0.23	0.20	0.09	0.24	0.20	0.04	0.05	0.25	0.06	0.08	0.24																		
31	<i>H. maculipes</i> 305C (A8)	0.24	0.24	0.24	0.29	0.27	0.21	0.22	0.21	0.24	0.28	0.24	0.13	0.25	0.12	0.22	0.26	0.20	0.12	0.19	0.27	0.14	0.14	0.23	0.17	0.18	0.18	0.14	0.10														
32	<i>H. maculipes</i> CHL1 (CH)	0.29	0.29	0.29	0.33	0.30	0.26	0.25	0.29	0.29	0.26	0.29	0.28	0.28	0.28	0.32	0.29	0.28	0.32	0.33	0.29	0.28	0.27	0.33	0.27	0.28	0.25																
33	<i>H. caprea</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.26	0.20	0.21	0.26	0.24	0.26	0.23	0.05	0.07	0.24	0.21	0.22	0.04	0.24	0.23	0.08	0.06	0.25	0.07	0.08	0.06	0.24	0.05	0.07	0.13	0.25												
34	<i>H. caprea</i>	0.25	0.25	0.25	0.32	0.29	0.24	0.23	0.22	0.26	0.24	0.21	0.19	0.22	0.22	0.22	0.22	0.20	0.24	0.16	0.16	0.23	0.24	0.17	0.25	0.27	0.25	0.14	0.28	0.28	0.23	0.28	0.28										
35	<i>H. caprea</i>	0.24	0.24	0.24	0.29	0.28	0.24	0.22	0.24	0.25	0.24	0.18	0.24	0.31	0.20	0.23	0.25	0.15	0.18	0.26	0.31	0.29	0.15	0.26	0.31	0.29	0.15	0.26	0.31	0.29	0.15	0.26	0.31	0.29	0.15	0.26	0.31	0.29	0.15	0.26	0.31	0.29	
36	<i>H. caprea</i>	0.24	0.24	0.24	0.30	0.27	0.20	0.21	0.20	0.25	0.23	0.21	0.17	0.19	0.24	0.29	0.22	0.25	0.21	0.19	0.22	0.26	0.24	0.18	0.23	0.24	0.17	0.25	0.27	0.25	0.14	0.28	0.29	0.23	0.28	0.25	0.02	0.06					
37	<i>H. simplex</i>	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.27	0.22	0.21	0.25	0.25	0.21	0.22	0.21	0.28	0.21	0.21	0.19	0.22	0.26	0.24	0.18																					

Table S VI. 28S. Distancia genética por pares medida bajo el modelo de sustitución K2P entre secuencias de *Hyalella uruguayas* y grupos externos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38			
<i>Hyalella curvispinis</i>																																									
1 RC, Montevideo																																									
2 <i>Hyalella curvispinis</i>	0.00																																								
3 San José	0.01	0.01																																							
4 Colonia	0.01	0.01	0.00																																						
5 CR Durazno	0.01	0.01	0.01	0.01																																					
6 ACU, Tacuarembó	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01																																				
7 BNT, Tacuarembó	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01																																			
8 Durazno	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.02																																		
9 PT, Tacuarembó	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01																																	
10 HH	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01																																
11 Lavalleja	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02																															
12 H. montforti	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00																														
13 231, Montevideo	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00																													
14 IG3B (B1)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02																												
15 H. kochi	0.11	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.10	0.11	0.11																											
16 H. kochi	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12																										
17 H. kochi	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00	0.02	0.10	0.03																										
18 H. kochi	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.00	0.00	0.02	0.10	0.03	0.00																									
19 H. kochi	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.12	0.01	0.03	0.03																							
20 H. kochi	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.00																						
21 H. thomasi	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.10	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03																						
22 H. thomasi	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02																				
23 H. janssenae	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.07	0.08	0.07	0.07	0.07	0.05	0.08	0.07	0.07	0.08	0.08	0.06	0.07																				
24 H. janssenae	0.10	0.10	0.10	0.10	0.11	0.10	0.10	0.11	0.10	0.11	0.10	0.10	0.10	0.11	0.10	0.10	0.10	0.12	0.11	0.10	0.11	0.05																			
25 H. casti	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.10	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	0.05	0.07																			
26 H. casti	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.10	0.04	0.04	0.04	0.05	0.04	0.03	0.05	0.07	0.09																		
27 H. casti	0.04	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.10	0.05	0.04	0.04	0.05	0.05	0.03	0.05	0.07	0.10	0.00	0.00																
28 H. aculeiventris	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00	0.07	0.11	0.05	0.05															
29 H. aculeiventris	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00	0.07	0.11	0.05	0.05	0.05														
30 H. sp.	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00	0.07	0.11	0.05	0.05	0.05	0.00													
31 H. sp.	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00	0.07	0.11	0.05	0.05	0.05	0.00	0.00												
32 H. longipinna	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00	0.07	0.11	0.05	0.05	0.05	0.00	0.00												
33 H. longipinna	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.00	0.07	0.11	0.05	0.05	0.05	0.00	0.00												
34 H. sp.	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03	0.00	0.08	0.12	0.05	0.05	0.05	0.00	0.00											
35 H. sp.	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.02	0.12	0.01	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02	0.00	0.07	0.11	0.05	0.05	0.05	0.00	0.00												
36 H. murina	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.14	0.08	0.08	0.10	0.10	0.09	0.10	0.11	0.14	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.09	0.10						
37 H. azteca	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.12	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.12	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.04			
38 H. japonica	0.25	0.24	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.26	0.24	0.24	0.24	0.26	0.27	0.24	0.24	0.24	0.27	0.27	0.27	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.24		

ANEXO FIGURAS

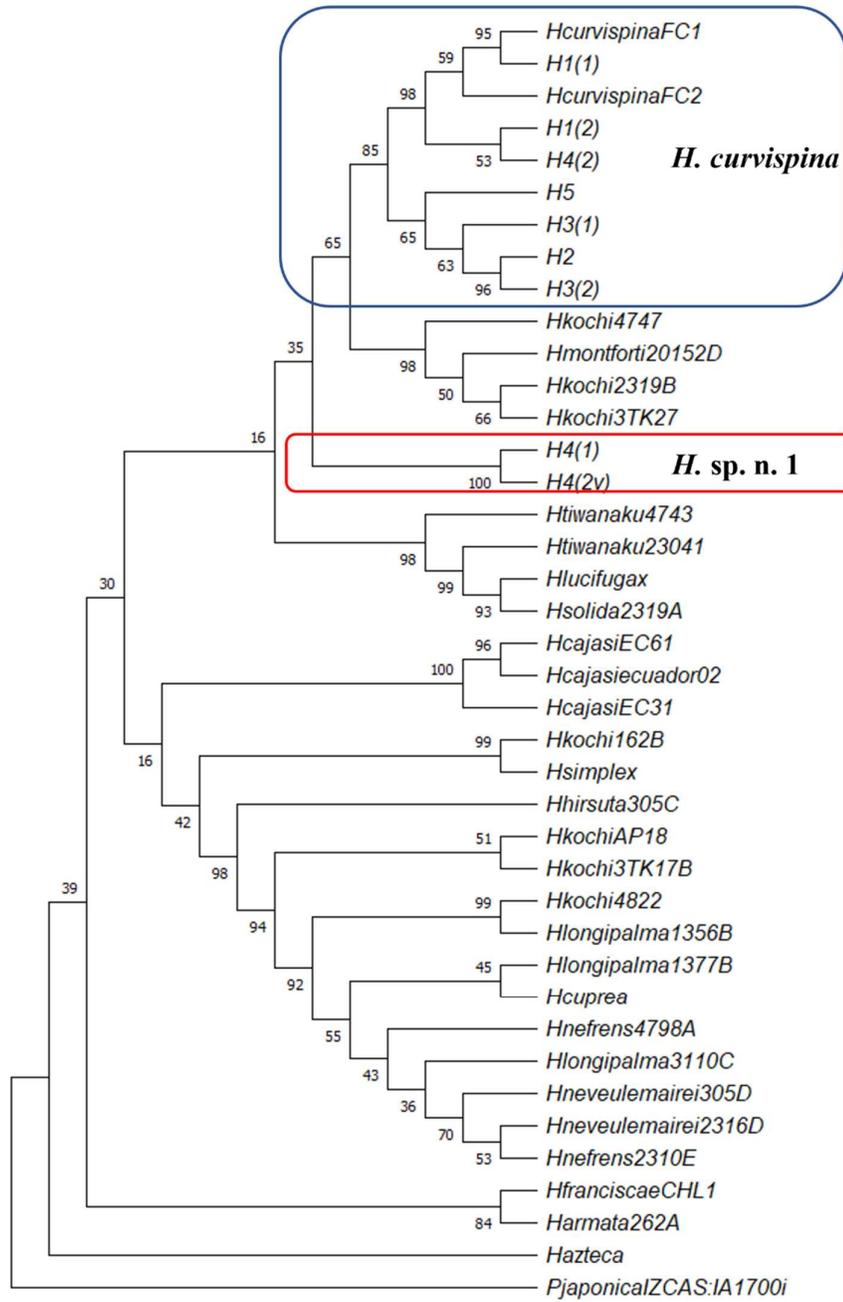


Figura S1. Reconstrucción de máxima parsimonia para secuencias parciales del gen **COI** de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

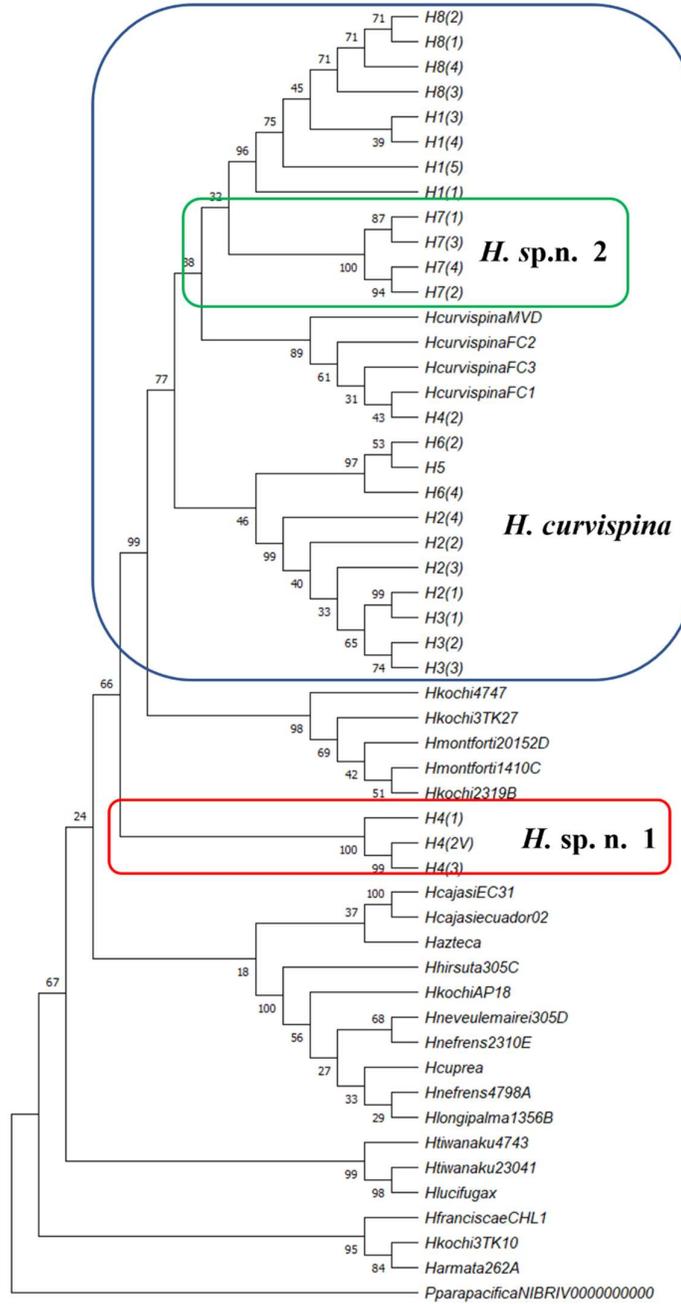


Figura S2. Reconstrucción de máxima parsimonia para secuencias parciales del gen 12S de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

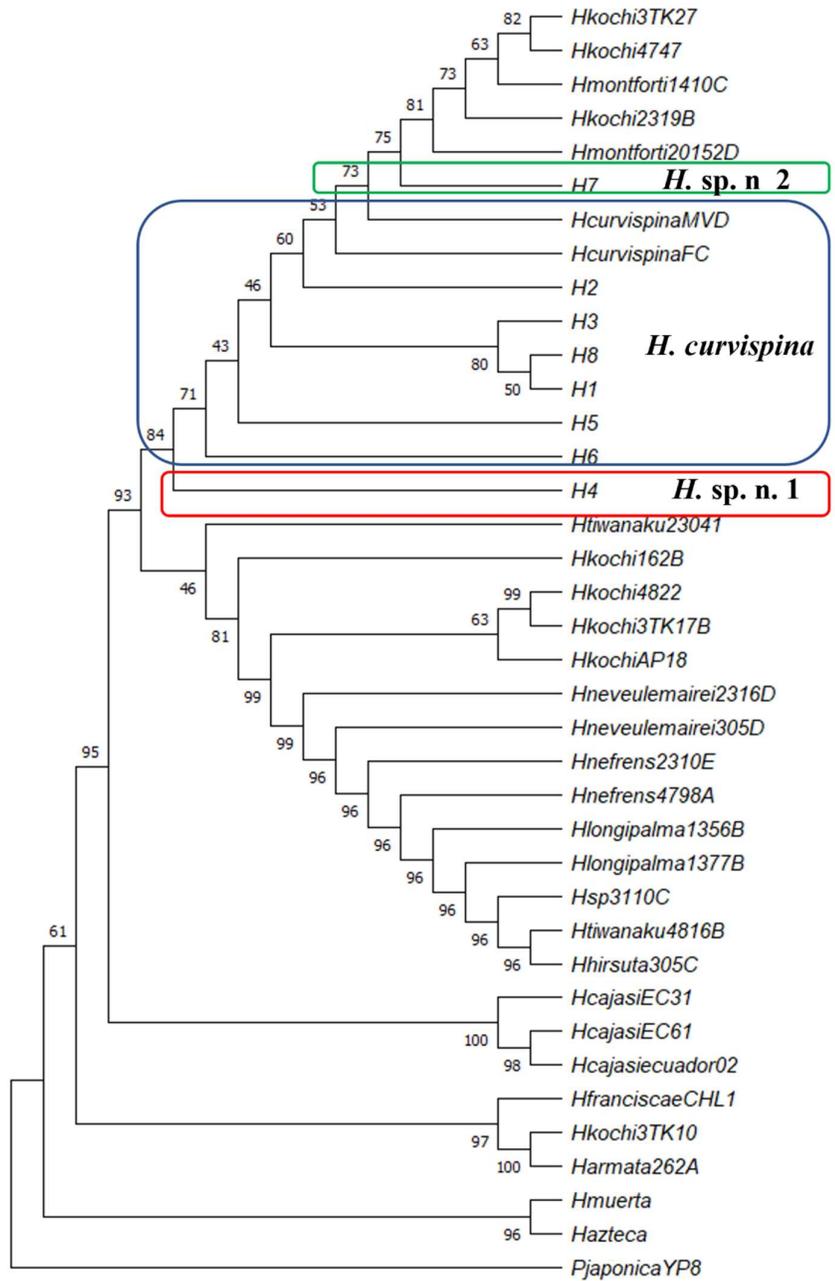


Figura S3. Reconstrucción de máxima parsimonia para secuencias parciales del gen 28S de *Hyalella uruguayas* y grupos externos.

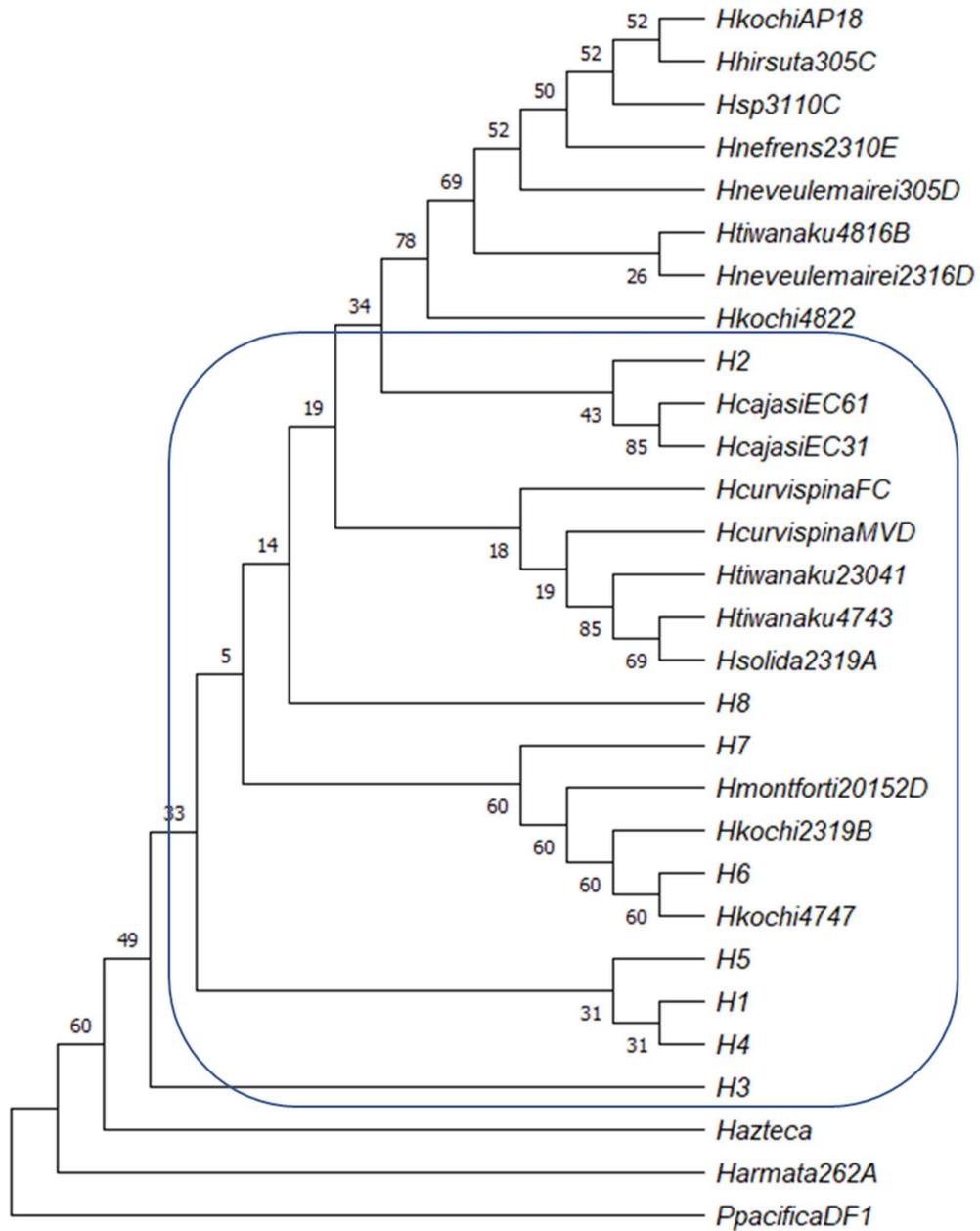


Figura S4. Reconstrucción de máxima parsimonia para secuencias parciales del gen **H3** de *Hyalella* uruguayas y grupos externos. En azul se identifica la polifilia de las *Hyalella* uruguayas.

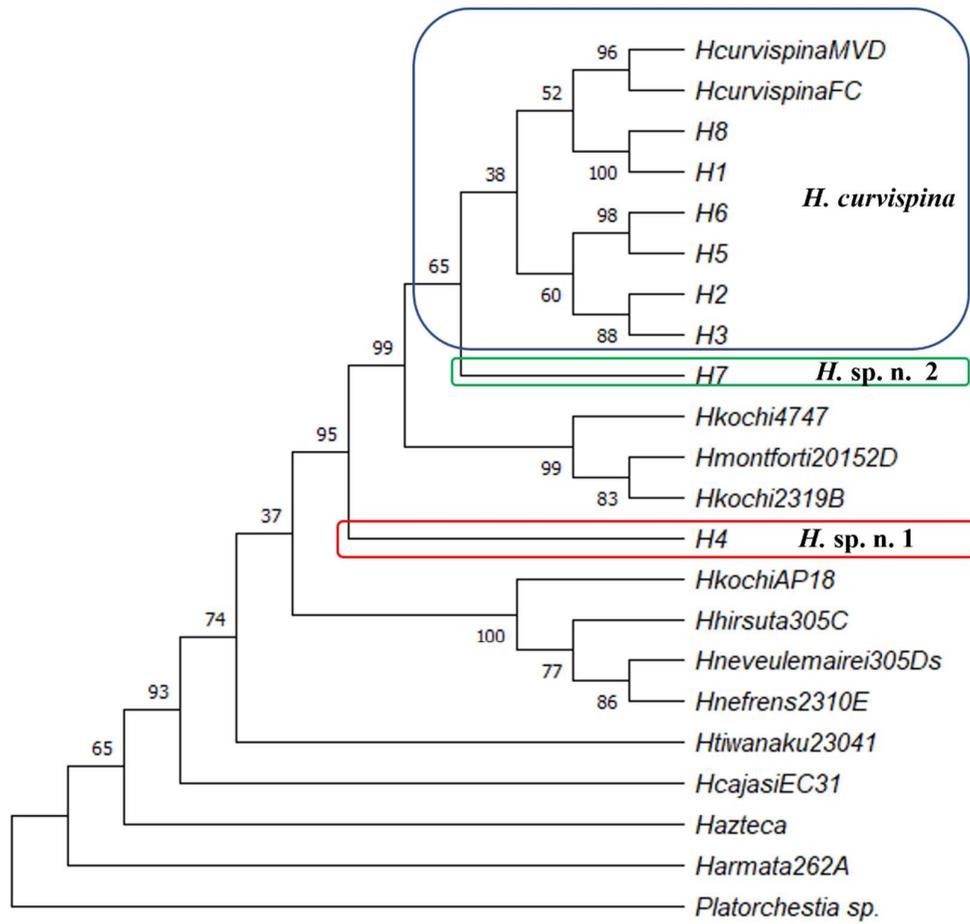


Figura S5. Reconstrucción de máxima parsimonia para secuencias concatenadas de los genes 12S, 28S y H3 de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

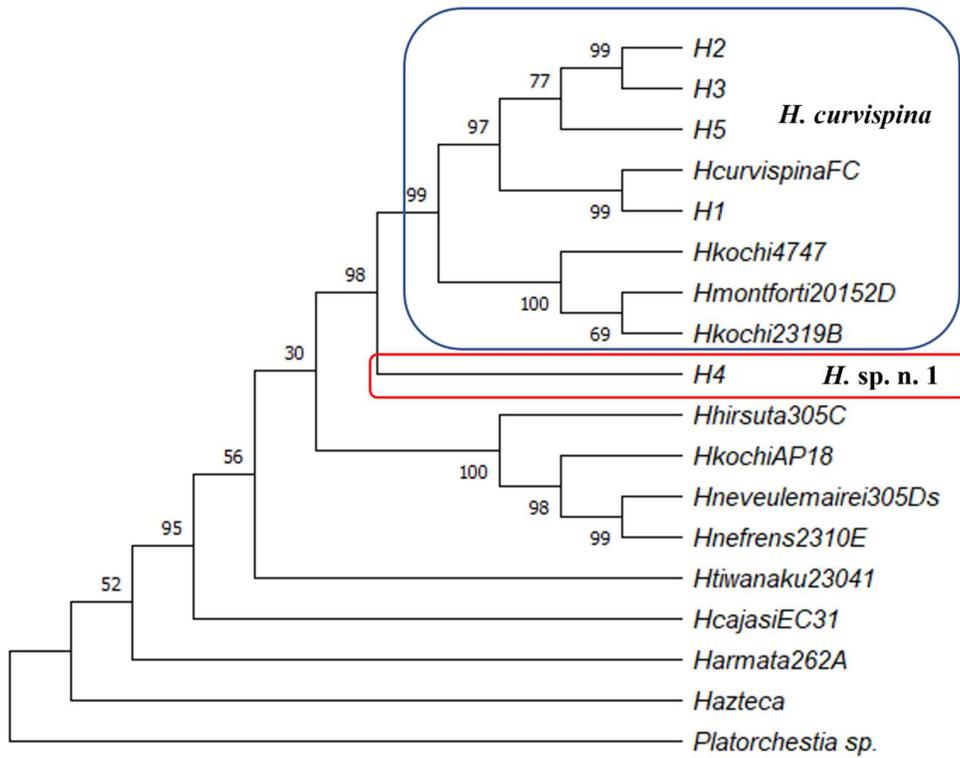


Figura S6. Reconstrucción de máxima parsimonia para secuencias concatenadas de los genes **COI**, **12S**, **28S** y **H3** de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

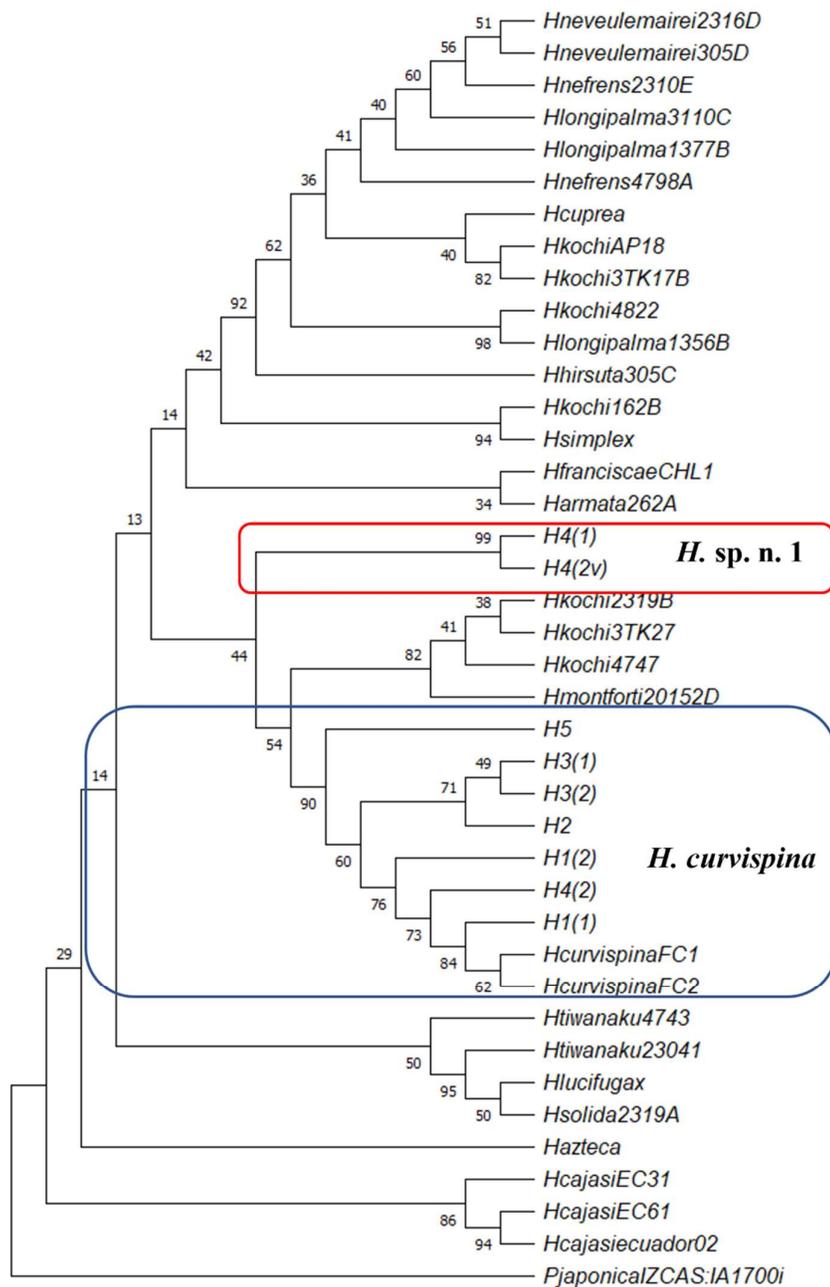


Figura S7. Reconstrucción de NJ para secuencias parciales del gen **COI** de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

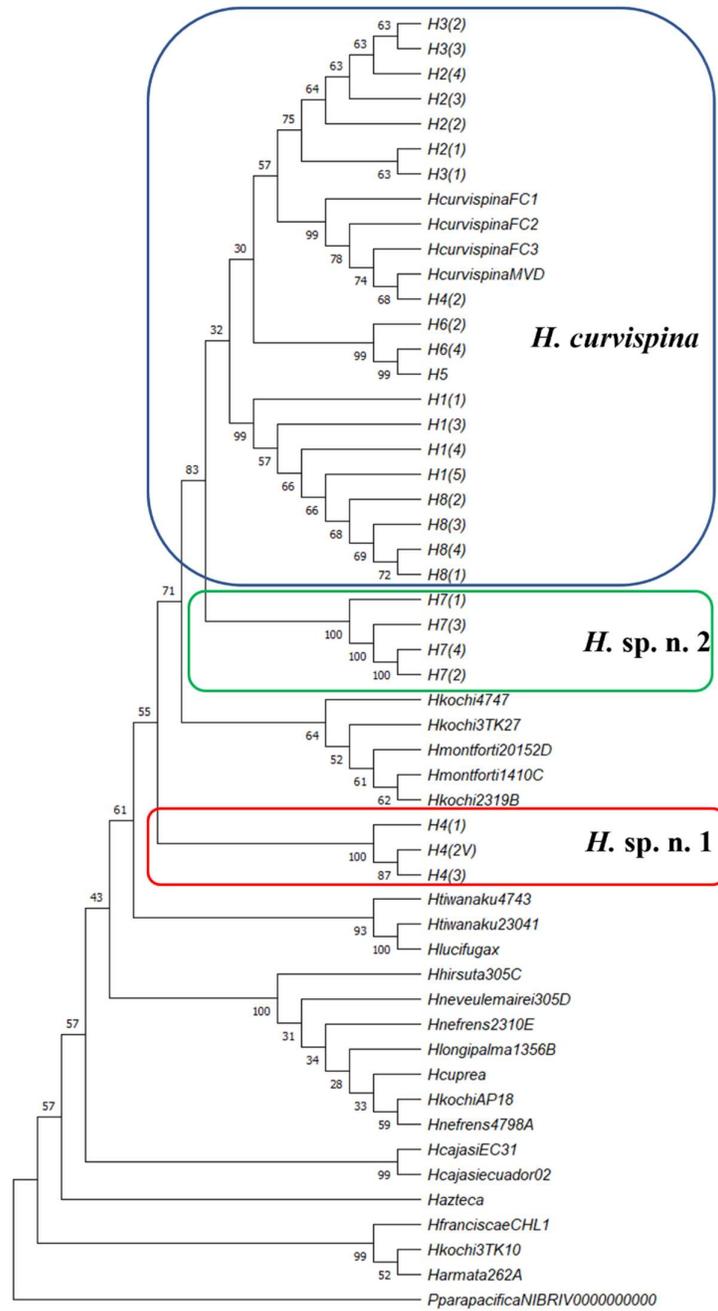


Figura S8. Reconstrucción de NJ para secuencias parciales del gen 12S de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

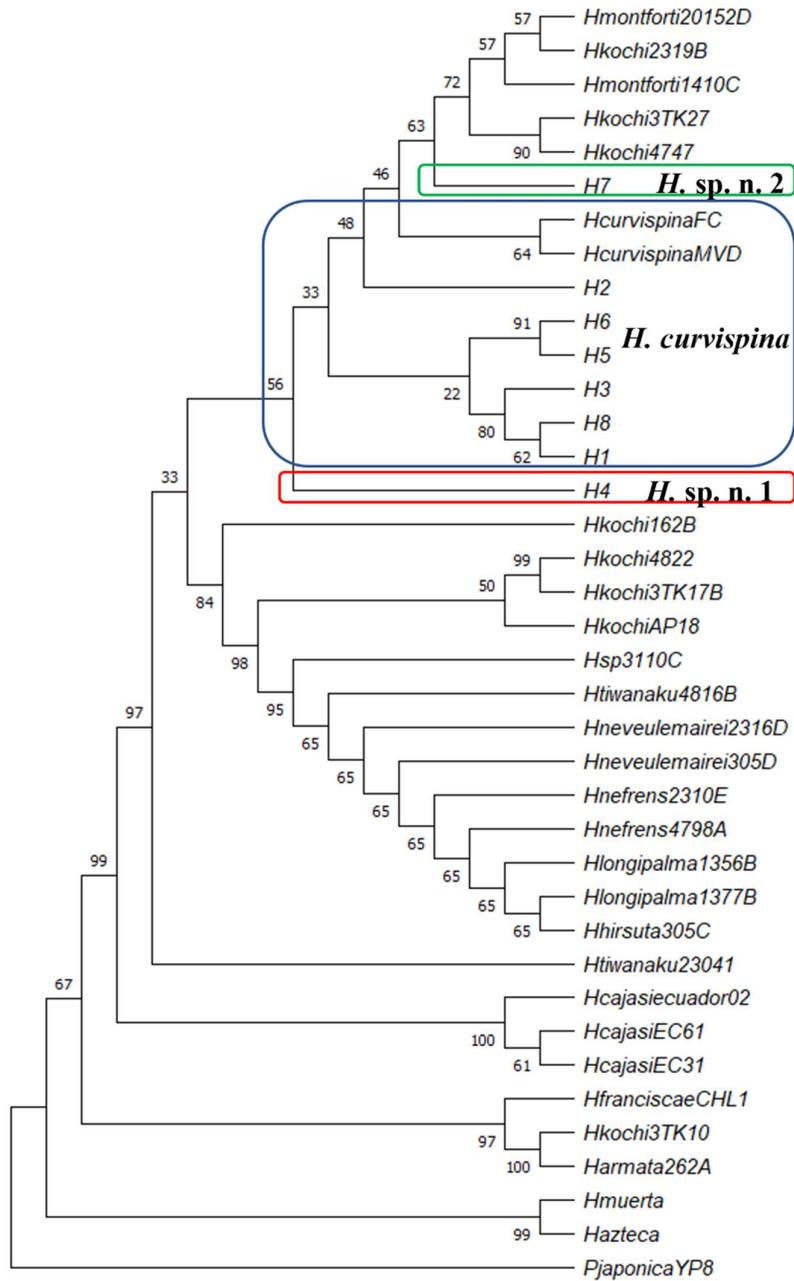


Figura S9. Reconstrucción de NJ para secuencias parciales del gen **28S** de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

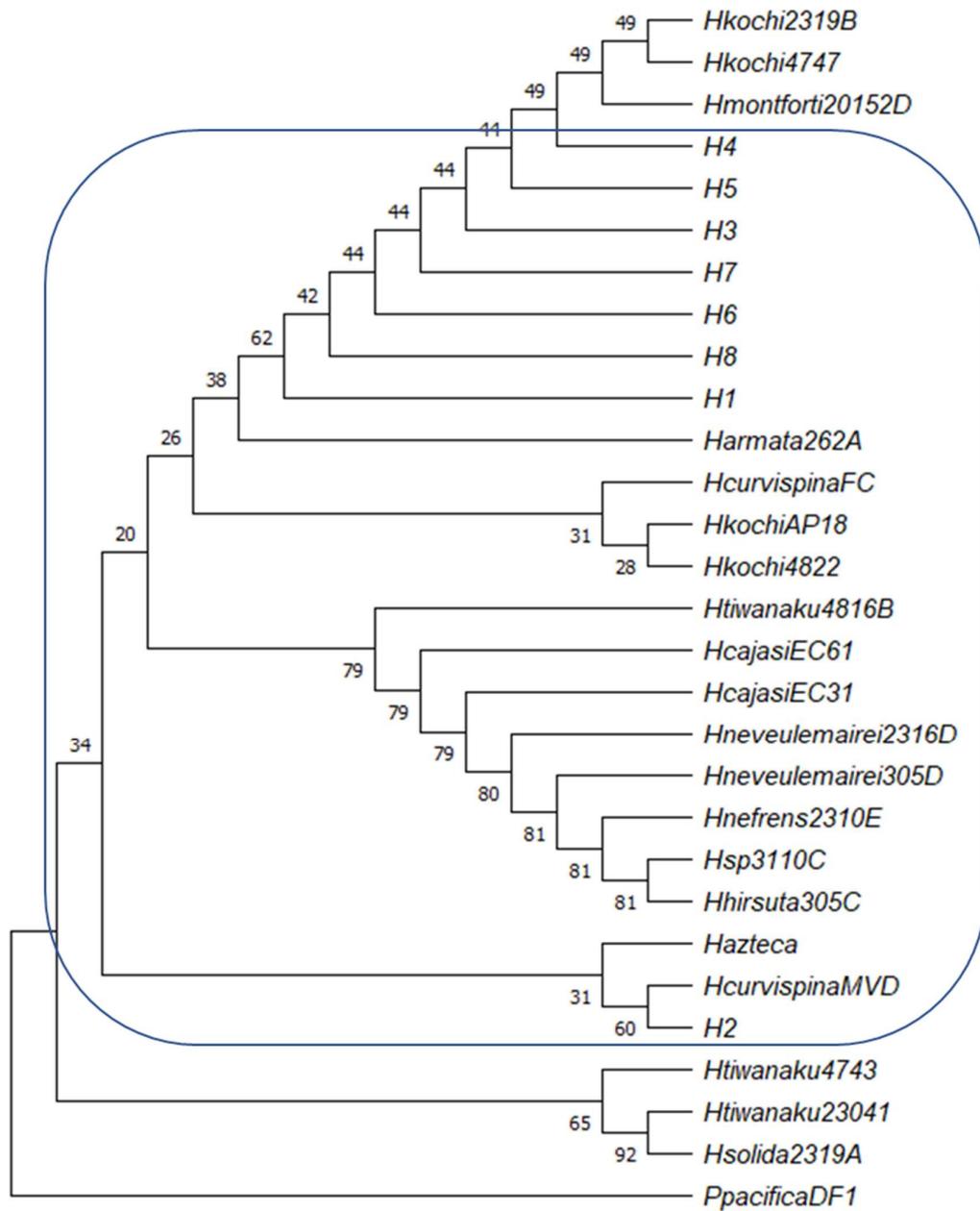


Figura S10. Reconstrucción de NJ para secuencias parciales del gen **H3** de *Hyalella* uruguayas y grupos externos. En azul se identifica la polifilia de las *Hyalella* uruguayas.

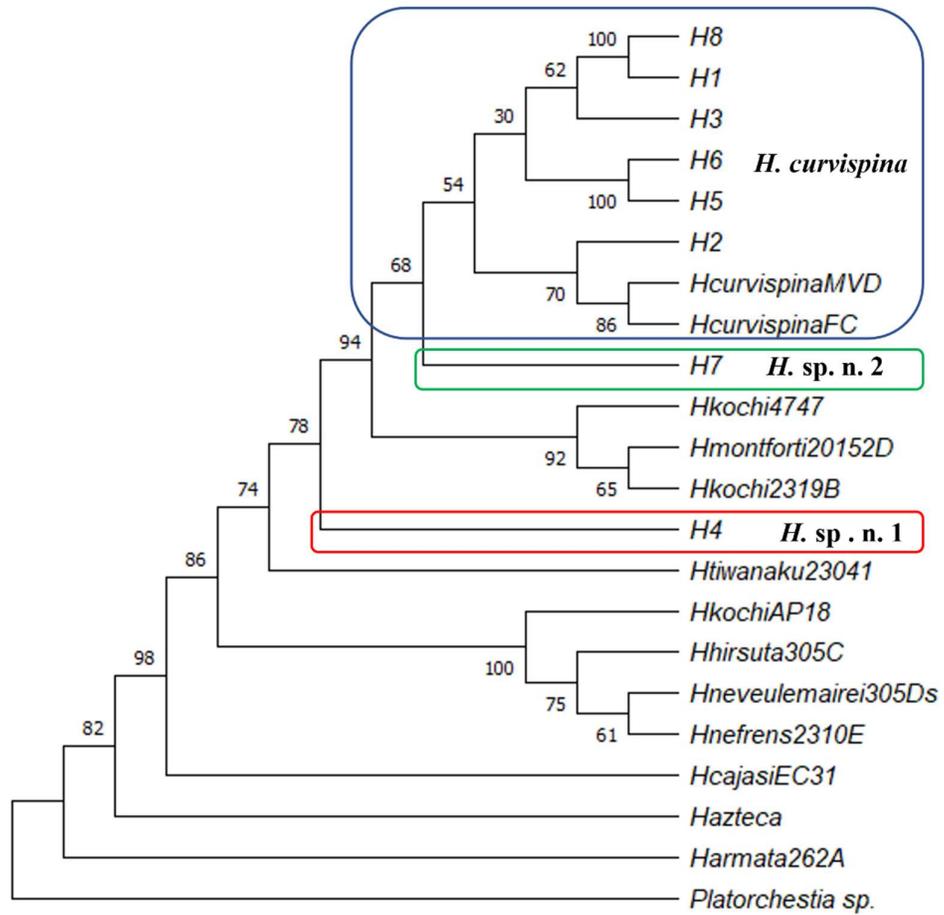


Figura S11. Reconstrucción de unión de vecinos (NJ) para secuencias concatenadas de los genes 12S, 28S y H3 de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.

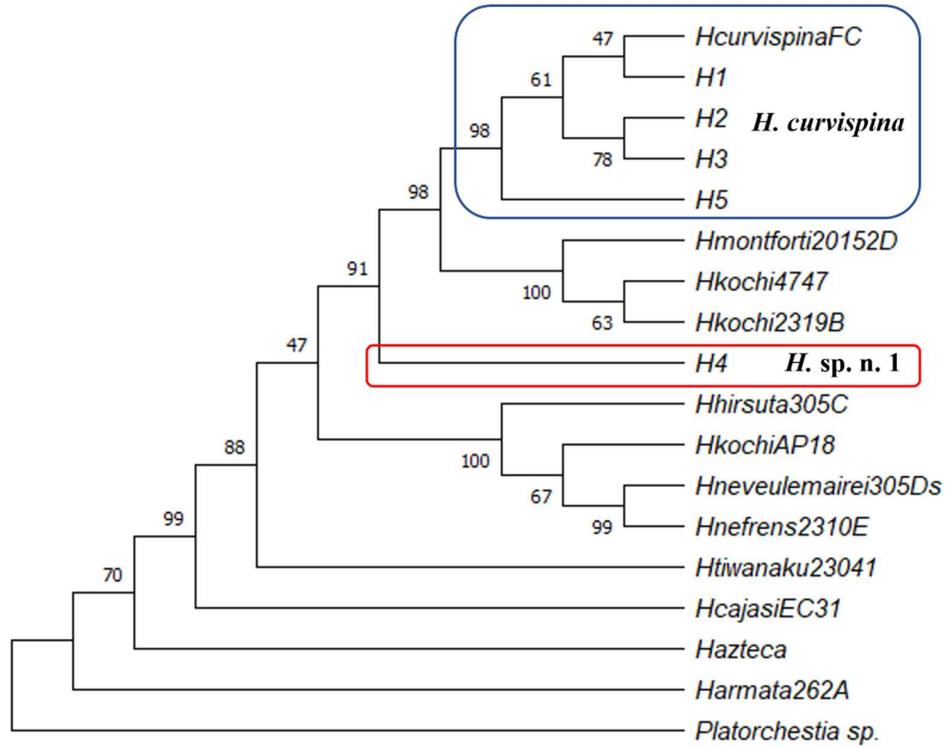


Figura S12. Reconstrucción de unión de vecinos (NJ) para secuencias concatenadas de los genes **COI**, **12S**, **28S** y **H3** de *Hyalella* uruguayas y grupos externos.