



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Doctorado en Sistemática y Biodiversidad

**DIVERSIDAD, SISTEMÁTICA, BIOGEOGRAFÍA DE LA
MALACOFUNA DULCECÚICOLA CHILENA Y LA EVOLUCIÓN DE
LAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS EN HYRIIDAE (UNIONOIDA) Y
SPHAERIIDAE (VENEROIDA).**

CARMEN GLORIA FUENTEALBA JARA
CONCEPCIÓN-CHILE
2013

Profesor Guía: Cristián E. Hernández Ulloa
Facultad Ciencias Naturales y Oceanográficas. Dpto. Zoología
Universidad de Concepción

Profesor Guía Externo: Ricardo Figueroa Jara
Centro Eula
Universidad de Concepción

DIRECCIÓN DE POSTGRADO

Esta tesis ha sido aprobada por la siguiente Comisión Evaluadora:

Profesor Guía

Dr. Cristián E. Hernández Ulloa

Guía de tesis externo

Dr. Ricardo Figueroa Jara

Profesor Evaluador Interno

Dra. Lucila Moreno Salas



Dr. Enrique Rodríguez Serrano

Profesor Evaluador Externo

Dr. Antonio Brante Ramírez

Director de Programa Alterno

Dr. Luis Parra



"Dedicato agli amanti dei molluschi
d'acqua dolce, che con il loro sforzo
contribuirono allo studio
di questa fauna"



RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN GENERAL	6
CAPITULO I: MARCO GENERAL DE LOS MOLUSCOS DULCEACUÍCOLAS CHILENOS: DIVERSIDAD Y SISTEMÁTICA DE LA MALACOFUNA DULCEACUÍCOLA.....	15
ANTECEDENTES GENERALES DE LA DIVERSIDAD DE BIVALVOS CHILENOS.....	15
ANTECEDENTES GENERALES Y DIVERSIDAD DE GASTERÓPODOS CHILENOS.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	22
CAPITULO II: ENDEMISMO, PATRONES DE DIVERSIDAD, DISTRIBUCIÓN, NUEVOS REGISTROS DE GASTROPODA Y MODIFICACIONES NOMENCLATURALES.....	35
B- PROBLEMÁTICAS NOMENCLATURALES Y NUEVOS REGISTROS	35
NUEVOS APORTES Y MODIFICACIONES NOMENCLATURALES DEL GENERO <i>LITTORIDINA</i> (SOUYELET 1852). ..	35
RESUMEN	35
BIBLIOGRAFÍA.....	37
CAPITULO III: RELACIONES FILOGENÉTICAS DE SPHAERIIDAE (VENEROIDA) E HYRIIDAE (UNIONOIDA).	40
RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA DE SPHAERIINAE (VENEROIDA: BIVALVIA) Y LA POSICIÓN FILOGENÉTICA DE <i>PISIDIUM CHILENSE</i> (D'ORBIGNY, 1846).....	40
RESUMEN	40
INTRODUCCIÓN	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
RESULTADOS.....	45
DISCUSIÓN	46
BIBLIOGRAFÍA.....	48
TABLAS Y FIGURAS.....	52
RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA DE HYRIIDAE (UNIONOIDA: BIVALVIA) CON ÉNFASIS EN LOS GRUPOS DEL SUR DE SUDAMÉRICA (HYRIINAE)	55
RESUMEN	55
INTRODUCCIÓN	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
RESULTADOS.....	61
DISCUSIÓN	61
BIBLIOGRAFÍA.....	64
TABLAS Y FIGURAS.....	69
ORIGEN Y DISPERSIÓN DE LOS HYRIIDAE SUDAMERICANOS	71
RESUMEN	71
INTRODUCCIÓN	72
MATERIALES Y MÉTODO.....	77
RESULTADOS.....	80
DISCUSIÓN	82
BIBLIOGRAFÍA.....	85
TABLAS Y FIGURAS.....	94
CAPITULO IV: EVOLUCIÓN DE LAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS EN BIVALBOS DULCEACUÍCOLAS (UNIONOIDA Y SPHAERIIDAE).	99
EVOLUCIÓN DE LAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS EN UNIONOIDA: GLOQUIDIUM VERSUS LASIDIUM	99
RESUMEN	99
INTRODUCCIÓN	100
MATERIALES Y MÉTODO.....	104
RESULTADOS.....	106
DISCUSIÓN	107
BIBLIOGRAFÍA.....	110
TABLAS Y FIGURAS.....	120

EVOLUCIÓN DE LAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS EN SPHAERIIDAE: UNA TENDENCIA AL DESARROLLO DIRECTO	126
RESUMEN	126
INTRODUCCIÓN	127
MATERIALES Y MÉTODO.....	132
BIBLIOGRAFÍA.....	145
TABLAS Y FIGURAS.....	154
CONCLUSIONES GENERALES.....	163
BIBLIOGRAFIA	166
ANEXO: CAPITULO II: ENDEMISMO, PATRONES DE DIVERSIDAD, DISTRIBUCIÓN, NUEVOS REGISTROS DE GASTROPODA Y MODIFICACIONES NOMENCLATURALES.	169
A-ENDEMISMO Y DISTRIBUCIÓN	169
ANÁLISIS DE ENDEMISMO DE MOLUSCOS DULCEACUÍCOLAS DE CHILE	169
ENDEMIC GASTROPOD FAUNA LAKE TITICACA: CORRELATION BETWEEN MOLECULAR EVOLUTION AND HYDROGRAPHIC HISTORY.	179
NUEVA ESPECIE DE PLANORBIDAE (GASTROPODA: BASOMMATOPHORA) EN LA PATAGONIA CHILENA: <i>BIOMPHALARIA CRISTIANI</i> SP. NOV.	193
C- VARIACIÓN GENÉTICA POBLACIONAL LOCAL	200
VARIABILIDAD GENÉTICA LOCAL DEL BIVALVO DULCEACUÍCOLA <i>DIPLODON CHILENSIS</i> (GRAY 1828) PROVENIENTE DE TRES LAGOS NAHUEL BUTANOS.....	200





RESUMEN

A nivel nacional, actualmente el conocimiento de la fauna malacológica es bastante precario. El grupo ha sido escasamente estudiado, con un bajo número de aportes en investigación, atribuido principalmente al número de especialistas en el grupo, desconociéndose actualmente muchos aspectos básicos de su sistemática, diversidad y ecología.

Entre los grupos de los cuales se dispone de una mayor cantidad de información se encuentran los bivalvos. Existen en Chile, solo dos familias: Spheriidae e Hyriidae, ambos con interesantes estrategias de reproducción, entre ellas el desarrollo directo y parasitismo, las cuales han sido interpretadas como claves en la evolución y adaptación a los ecosistemas de agua dulce, rasgos que además han destacado por su valor en sistemática.

En base a estos antecedentes el objetivo general de esta tesis estuvo basado explorar, conocer, evaluar, dilucidar y entender los diversos mecanismos que explican la diversidad de la malacofauna dulceacuícola chilena y el rol de la evolución de las estrategias reproductivas en el origen de las especies actuales. Los resultados obtenidos nos permiten proponer:

1) Es necesario realizar una revisión taxonómica exhaustiva de algunas familias como Ancyliidae y Lymnaeidae, que permitan corroborar el número de especies existentes en territorio nacional; 2) La revisión de especies de la familia Planorbidae, permitió aumentar su rango distribucional hasta Patagonia, con la inclusión de una nueva especie (i.e. *Biomphalaria cristiani*); 3) La fauna endémica de gasterópodos del género *Heleobia* en el lago Titicaca, se originó posterior a los fenómenos paleohidrológicos del Plioceno, por lo que es atribuida a eventos de especiación intralacustre. De manera indirecta, se confirma que los ejemplares chilenos incorporados en este estudio, no corresponden al género *Littoridina*. Su anatomía interna y estudios moleculares demuestran que los ejemplares corresponden a *Heleobia*. Especies identificadas como *Littoridina*, pertenecientes a Hydrobiidae, cambian su asignación genérica a *Heleobia*, familia Cochliopidae, distribuida desde el Altiplano hasta Tierra del Fuego; 4). Los patrones de endemidad y distribución de la malacofauna dulceacuícola fue en parte producto de sucesos vicariantes, tales como las glaciaciones pleistocénicas y eventos tectónicos postglaciales que afectaron al sistema hidrográfico, destacando la Zona Hidrográfica V (44°-56°S), como la de mayor porcentaje

de endemismo, representado por las cuencas Cisnes, Aisén y Baker; 5) Las especies altiplánicas destacan por su tolerancia a la salinidad, factor importante en los procesos de diversificación y endemismo local; 6) En la filogenia de Hyriidae se reconstruyen las relaciones de las especies sudamericanas las que son asignadas a Hyriinae, se establecen relaciones filogenéticas con los grupos australianos, se recupera el clado de Sphaeriinae y las especies sudamericanas conforman un grupo monofilético; 7) Al analizar el origen y dispersión de los bivalvos dulceacuícolas en Sudamérica, se demuestra que los hyriidos sudamericanos tendrían un origen australiano, lo que a su vez se apoya en la evidencia fósil. Esta familia, según calibración del reloj molecular origino hace 95.25 Ma por formación de la cuenca marina Rocas Verdes; 8). En relación, a la evolución de rasgos de historia de vida de los bivalvos dulceacuícolas, en Hyriidae la condición ancestral de los estados larvales es de larva Gloquidium con tendencia hacia la gloquidización, cuyo patrón de distribución se explica por la condición generalista y la amplitud de nicho, 9) Se apoya la hipótesis larva primero (HLP), con una tendencia hacia el desarrollo directo y simplificación de la metamorfosis, correlación de los rasgos involucrados en los procesos incubatorios (i.e. asincronía, múltiples sacos, velum vestigial y euviviparidad), sustentando la ley de Dollo, pero con una reducción o tendencia a la vestigialidad del velum. Estos aportes desde los aspectos mas basicos como el de un reordenamiento de la diversidad de la malacofauna dulceacuícola y su endemidad, llegando a la intrerpretación evolutiva de las estrategias reproductivas, nos permiten conocer como se conforma la diversidad actual y proponer los mecanismos que explican estos patrones.

Sin embargo, aun quedan muchos grupos de los cuales no existe información disponible, ni están claro aun, aspectos básicos referentes a la taxonomía, como en los gasterópodos de la familia Ancyliidae, la incorporación de miembros de *Sphaerium* de la familia Sphaeriinae en estudios filogenéticos para comprender la filogenia de los esféridos sudamericanos y temáticas referentes a estudios evolutivos de algunos rasgos. Por otro lado, además se desconocen completamente las estrategias reproductivas de los gasterópodos, incluyendo aspectos referentes a su ecología y evolución.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La fauna malacológica dulceacuícola de nuestro país ha despertado poco interés por parte de los investigadores, por lo que ha sido escasamente valorada, pobremente estudiada e incluso actualmente los aportes anuales en investigación no superan 2 %, lo que nos aleja drásticamente de los estándares internacionales. Sin embargo, en los últimos años, ha habido un progresivo aumento en temáticas relacionadas a estudios filogenéticos, filogeográficos y biogeográficos. A diferencia de lo que ocurre con la descripción de nuevas especies, en lo que definitivamente no hay aportes (Valdovinos 2006).

Respecto a este punto, diversos autores reconocen la necesidad de hacer una revalidación de las especies de gasterópodos descritas, cuyos rasgos utilizados en un principio se limitaban a la forma de la concha, el cual es un rasgo drásticamente influenciado por condiciones locales del ambiente, por lo que se considera no recomendable en taxonomía (Valdovinos 2006; Parada & Peredo 2002; Parada & Peredo 2006). Razón por lo cual, los malacólogos basan sus descripciones en la anatomía blanda, específicamente en el sistema reproductor. Los grupos más estudiados a la fecha corresponden Hydrobiidae y Planorbidae. Para los bivalvos, la situación es diferente, en donde la literatura es más abundante. Es interesante destacar, que Chile es uno de los países de más baja diversidad y alto nivel endemismo, con un fuerte componente Gondwánico, tales aspectos que acentúan su singularidad y que generarían un gran porcentaje de fauna aun no descrita, especialmente de gasterópodos (Fuentealba et al. 2010).

El objetivo general de esta tesis es conocer, evaluar, dilucidar y entender, los diversos mecanismos que explican parte de la diversidad de la malacofauna dulceacuícola chilena y el rol de la evolución de las estrategias reproductivas en el origen de las especies actuales.

En el presente estudio para cumplir con este objetivo, se abordan variadas temáticas, relacionadas con la diversidad y sistemática de la malacofauna dulceacuícola, específicamente: su biogeografía, lo que permite tener una sinopsis de la diversidad y endemismo existente; el reconocimiento de nuevas especies de la familia Planorbidae, mediante la diagnosis del sistema reproductor.

Con esto se amplía su rango distribucional. Se generan nuevos aportes para Cochliopidae; mediante algunos mecanismos potenciales que explican la diversidad y la evolución del

grupo de los miembros del genero *Heleobia*, miembros de esta familia incluyendo análisis filogenéticos. Respecto a Hyriidae, se incluyen estudios genéticos poblacionales, lo que conduce a comprender diversos aspectos de su complejo ciclo reproductivo. Se reconstruyen las relaciones filogenéticas de Sphaeriinae incluyendo una nueva especie endémica *Pisidium chilense*. También se reconstruye la filogenia de Hyriinae, incluyendo nuevos ejemplares de *Diplodon chilensis*. En esta misma línea, mediante estudios filogenéticos, se propone un modelo para explicar el origen controversial de la malacofauna dulceacuícola en Sudamérica. Finalmente, para comprender procesos de adaptación y sugerir diversificación en los ecosistemas dulceacuícolas, se reconstruyen aspectos de su ciclo reproductivo mediante método comparado, destacando estrategias como el parasitismo de Hyriidae y el desarrollo directo de Sphaeriidae.

En base a estos antecedentes, las hipótesis a evaluar y objetivos son aquí presentadas para sus respectivos capítulos:

CAPÍTULO I: Marco general de los moluscos dulceacuícolas chilenos: Diversidad y sistemática de la malacofauna dulceacuícola

Objetivo: Aportar antecedentes generales de los moluscos dulceacuícolas con énfasis en la diversidad de Bivalvia.

CAPÍTULO II: Endemismo, patrones de diversidad, distribución, nuevos registros de gasterópoda, relaciones filogenéticas, origen y modificaciones nomenclaturales.

Hipótesis: -Existe una mayor riqueza específica, en el denominado “hotspot” de biodiversidad de invertebrados dulceacuícolas, situado entre la región del Maule VII (35° S) y Araucanía XI (43°S),

El mayor porcentaje de endemismo de la malacofauna dulceacuícola, se encuentra en el sistema de cuencas hidrográficas del Norte (entre la I y III región)

Objetivo: Analizar la riqueza y los patrones de endemismo de la diversidad moluscos dulceacuícolas, a lo largo del territorio nacional.

Artículo: Fuentealba C, Morrone J & R Figueroa (2010) Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83: 289-298.

Hipótesis: Los hallazgos de ejemplares de la familia Planorbidae en Patagonia chilena localidad Laguna Cisnes (Región Aysén 47°7'10.02"S, 72°27'40.65"W), corresponderían a una nueva especie de *Biomphalaria* sp.

Objetivo: Identificación de una especie de Planorbidae en Patagonia Chilena (Laguna Cisnes), mediante análisis de la estructura del sistema reproductor.

Artículo: Fuentealba C & R Figueroa (2012) Primer registro de *Biomphalaria cristiani* sp. Nov. (Preston, 1910) y nueva especie en la Patagonia Chilena. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40 (4): 929-935.

Hipótesis: Las poblaciones de *Diplodon (diplodon) chilensis*, proveniente de tres cuencas lacustres Nahuelbutanas desconectadas geográficamente, se encuentran genéticamente estructuradas.

Objetivo: Determinar la variabilidad genética en poblaciones de *Diplodon chilensis* mediante análisis del polimorfismo de isoenzimas.

Artículo: Fuentealba C, R Figueroa, F González & M Palma (2010) Variabilidad genética local del bivalvo dulceacuícola *Diplodon (diplodon) chilensis* proveniente de tres lagos Nahuelbutanos. *Gayana*, 74 (2): 113-124.

Hipótesis: Las especies endémicas de gasterópodos género *Heleobia*, del lago Titicaca, son el producto de eventos paleohidrológicos del Pleistoceno.

Objetivo: Mediante un análisis filogeográfico, con calibración del reloj molecular de miembros de género *Heleobia*, responder a:

1- El lago Titicaca actuó como reservorio de especies endémicas o existió un proceso de rápida especiación intralacutre?

2- Son eventos de diversificación en *Heleobia* sp. relacionados con las principales episodios paleohidrológicos en el Altiplano?

3- Hay niveles espaciales jerárquicos de endemidad en Lago Titicaca?

Artículo: Kroll O, R Hershler, C Albrecht, E M Terrazas, R Apaza, C Fuentealba, C Wolff & Thomas Wilke (2012) The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: correlation between molecular evolution and hydrographic history. *Ecology and Evolution*, 2(7): 1517-1530.

CAPÍTULO III: Relaciones filogenéticas de Hyriidae (Unionoida) y Sphaeriidae (Veneroida).

Artículo: Reconstrucción filogenética de Sphaeriinae (Veneroida: Bivalvia) y la posición filogenética de *Pisidium chilense* (d'Orbigny, 1846).

Hipótesis: *Pisidium* es un grupo monofilético.

Pisidium chilense, se encuentra relacionado filogenéticamente con las especies de *Pisidium* sudamericanas, conformando un grupo monofilético.

Objetivos: Reconstruir y evaluar las relaciones filogenéticas de Sphaeriidae (Veneroida: Bivalvia) con énfasis en los Sphaeriinae sudamericanos.

Determinar la posición filogenética de *Pisidium chilense*.

Artículo: Reconstrucción filogenética de Hyriidae (Unionoida: Bivalvia) con énfasis en los grupos del sur de Sudamérica (Hyriinae).

Hipótesis: La subfamilia de Hyriinae es un grupo monofilético.

Hyriinae se encuentra relacionado con los grupos australianos.

Objetivo: Reconstruir y evaluar las relaciones filogenéticas de Hyriidae (Unionoida: Bivalvia) con énfasis en los grupos del sur de Sudamérica (Hyriinae).

Determinar las relaciones filogenéticas de Hyriinae dentro de Hyriidae.

Artículo: Origen y dispersión de los Hyriidae Sudamericanos.

Hipótesis: Los bivalvos dulceacuícolas sudamericanos de la familia Hyriidae, tendrían un origen Australiano.

Dispersión y colonización a Sudamérica condicionada vía conexión Antártica, previa desintegración Gondwana (Origen).

Distribución actual eventos vicariantes gondwánicos.

Objetivos: Evaluar el origen de los hyriidos sudamericanos, basado en el método comparado filogenético, mediante la reconstrucción los estados ancestrales.

Datar la dispersión mediante la calibración del reloj molecular, para estimar tiempos de divergencia.

CAPÍTULO IV: Evolución de las estrategias reproductivas en bivalbos dulceacuícolas (Unionoida y Sphaeriidae).

Artículo: Evolución de las estrategias reproductivas en Unionoidea: Gloquidium versus Lasidium.

Hipótesis: El ancestro de las larvas Lasidium es una larva Gloquidium.

La evolución de las larvas Unionoidea se asocia a la condición generalista/especialista.

Prediciendo que:

1-Existe señal filogenética para el carácter tipo de larva gloquidium/lasidium.

2- El ancestro común más reciente en Hyriidae es una larva Gloquidium.

3-Existen diferencias en las tasas de transición evolutiva entre estados Lasidium/Gloquidium con una tendencia a uno de los tipos larvales.

Objetivos generales: Analizar e interpretar el patrón evolutivo de las estrategias reproductivas adoptadas por Hyriidae, mediante el método comparado filogenético y con aproximación bayesiana.

Objetivos específicos: Estimar la señal filogenética de las estrategias reproductivas adoptadas por Hyriidae (Unionoidea), en la evolución del tipo de larva Gloquidium y Lasidium.

Determinar el ancestro y modo de evolución de las larvas involucrado en las complejas estrategias reproductivas adoptadas por Hyriidae hacia el parasitismo.

Artículo: Evolución de las estrategias reproductivas en Sphaeriidae: Una tendencia al desarrollo directo.

Hipótesis: Basados en los complejos antecedentes de la historia de vida de Sphaeriidae, mediante los rasgos: velum vestigial, asincronía, presencia de sacos y euviviparidad,

sometemos a prueba la hipótesis larva primero (HLP), con una tendencia al desarrollo directo.

En segundo lugar, se somete a prueba la reversibilidad de esta tendencia apoyando o rechazando la ley de Dollo.

Prediciendo que:

1.- Existe señal filogenética para la presencia/ausencia de las siguientes estrategias reproductivas: ovoviviparidad/euviparidad, sacos embrionarios, patrón incubatorio, sincrónico/asincrónico, matrotrofia y reducción del velum.

2.- El ancestro común más reciente en Sphaeriidae se caracteriza por presentar ovoviviparidad, la ausencia de sacos, ser sincrónico en la eclosión, ausencia de traspaso de nutrientes entre la madre y el embrión y presencia de velum.

3.- Existen diferencias en las tasas de transición evolutiva entre estados de estrategias reproductivas, determinando una tendencia hacia la complejidad en el ciclo reproductivo (i.e. euviparidad, asincronía, presencia de múltiples sacos y matrotrofia).

4- Existen diferencias en las tasas de transición evolutiva entre estados de la morfología asociada a estrategias reproductivas, como es la reducción de estructuras larvales (i.e. el velum), lo cual determina una tendencia hacia el desarrollo directo.

5.- Existen correlaciones evolutivas entre los rasgos de estrategias reproductivas y la morfología asociada a ellos, lo cual habría determinado una evolución hacia el desarrollo directo.

Objetivos generales: Analizar e interpretar el patrón evolutivo de las estrategias reproductivas adoptadas por los Sphaeriidae mediante el método comparado filogenético, con aproximación bayesiana.

Objetivos específicos: Estimar la señal filogenética de las estrategias reproductivas adoptadas por Sphaeriidae como: estructuras incubatorias (sacos), matrotrofia, euviparidad, asincronía y el velum vestigial.

Determinar el ancestro y modo de evolución de cada rasgo involucrado en las complejas estrategias reproductivas adoptadas por Sphaeriidae, hacia el desarrollo directo.

Evaluar correlaciones entre reducción del velum (simplificación hacia desarrollo directo) y los rasgos adoptados como estrategias reproductivas complejas.

El capítulo II de la siguiente tesis corresponde al aporte de trabajos previos que conformaron la línea base para la arquitectura de los subsiguientes capítulos III y IV. Este aporte corresponde a una serie de trabajos publicados por lo que se incluyeron en la sección anexos.



Bibliografía

FUENTEALBA C, J MORRONE & R FIGUEROA (2010). Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 289-298.

PARADA E & S PEREDO (2002). Estado actual de la taxonomía de bivalvos dulceacuícolas chilenos: Progresos y conflictos. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 691-701.

PARADA E & S PEREDO (2006). Estado de conocimiento de los bivalvos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70: 82-87.

VALDOVINOS C (2006). Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70: 88-95.



CAPITULO I: MARCO GENERAL DE LOS MOLUSCOS DULCEACUÍCOLAS CHILENOS: DIVERSIDAD Y SISTEMÁTICA DE LA MALACOFUNA DULCEACUÍCOLA

Antecedentes generales de la diversidad de bivalvos chilenos

La diversidad de moluscos de agua dulce de Chile se encuentra representada por dos órdenes de bivalvos dulceacuícolas Veneroida y Unionoida. Los unionidos se encuentran representados solo por la familia Hyriidae, en los trabajos de revisión taxonómica realizado por Parada & Peredo (2002), son adscritos al género *Diplodon* representado por dos especies (*D. chilensis* y *D. solidulus*). Este trabajo incluye además la sinonimia, localidad tipo y distribución geográfica donde las especies han sido registradas. Los caracteres diagnósticos más confiables, para la identificación de las especies de Hyriidae, corresponden a la morfología de la charnela en adultos, en larvas la presencia o ausencia de los dientes larvales y la posición y forma de éstos (Parada & Peredo 2002). Sin embargo, en los trabajos de revisión de Letelier & Ramos (2006); Parada & Peredo (2008), se ha sugerido que para Chile solo existiría la especie *Diplodon chilensis*.

El conocimiento actual de los bivalvos dulceacuícolas en Chile es limitado y su estudio ha permanecido relegado en las últimas décadas. Diversos autores concuerdan que una causal sería la falta de interés de los especialistas en este grupo (Parada & Peredo 2002; 2006). Como consecuencia de ello, el conocimiento se encuentra fragmentado y aspectos relacionados con la diversidad taxonómica, filogenia y biogeografía en la literatura son escasos (Valdovinos 2006). No obstante, existen algunos aportes relacionados principalmente con aspectos ecológicos, lo que se ha evidenciado mayoritariamente en bivalvos de la familia Hyriidae, destacándose por su capacidad filtradora (Valdovinos & Cuevas 1996; Fuentealba & Henríquez 2006) y el importante rol trófico que desempeñan en los ecosistemas dulceacuícolas (Soto & Mena 1999). Por tal razón han sido reconocidos potenciales bioindicadores (Silva et al. 2007), siendo utilizados en procesos de biorremediación (Mena 1997; Lara et al. 2002; Parada 2008). Otros aspectos estudiados en el grupo comprenden parámetros de vida, biológicos, reproductivos, dinámica poblacional y descripción de patrones espaciales (Parada et al. 1987; Lara & Parada 1988; Parada et al.

1989; Parada et al. 1990; Lara & Parada 1991; Lara & Parada 2008). También se han desarrollado estudios de variabilidad genética poblacional, la que ha sido correlacionada con los parámetros fisicoquímicos (Fuentealba et al. 2011). Actualmente a nivel mundial la familia se encuentra restringida a Australasia y Sudamérica (Walker et al. 2001; Baker et al. 2004), compuesta de 93 especies las cuales representan el 10.9% de la diversidad del orden Unionoida (Walker et al. 2001, Graf & Cummings 2007). Esta familia se encuentra representada por las subfamilias Hyridellinae, Cucumerunioninae, Velesunioninae, Lortellinae e Hyriinae (McMichael & Hiscock 1958). El origen de la familia Hyriidae en Sudamérica ha sido enigmático de abordar (Parada & Peredo 2002). Desde el punto de vista filogenético, la información molecular disponible a diferencia de lo que ocurre con el resto de las otras familias de Unionoida es limitada (Parada & Peredo 2002). Trabajos preliminares han sugerido un origen norteamericano (Parodiz 1969) y otros alternativamente basados en la filogenia han sugerido un origen desde Australasia (Graf & Foiguil 2000). Su registro fósil, comprende especies datadas desde el Triásico (Henderson 1935) y una distribución acotada en Nueva Zelanda, Australasia, Sudamérica y Antártica durante Gondwana. Los miembros de estas familias se caracterizan por presentar larvas gloquideos (González 1998), gonocorismo, algunos serían hermafroditas facultativos y con desarrollo directo, sin embargo los estudios son muy limitados y esta modalidad de desarrollo directo se ha demostrado ocasionalmente para algunas especies (Fuentealba et al. 2010).

Dentro de los bivalvos dulceacuícolas veneroideos, la familia Sphaeriidae ha sido ampliamente estudiada, reconocida como un grupo diverso y de distribución cosmopolita (Burch 1975; Kuiper 1983). Sin embargo, aspectos relacionados con la sistemática del grupo son controversiales, dada la gran variabilidad alométrica y ecofenotípica de las valvas, variación que es observada en la mayoría de los taxa dulceacuícolas (Holopainen & Kuiper 1982; Bailey et al. 1983; Dyduch-Falinowska 1988). Esta situación, ha contribuido a la sobreestimación de la diversidad específica en Sphaeriidae (Kuiper 1983). En este sentido, diversos autores concuerdan que la sistemática ha sido confusa de abordar por dos razones: 1- el número de caracteres morfológicos analizados han sido limitados y 2- los análisis preliminares sobre la base de la morfología se restringieron a una única

metodología cladística, sobre la cual derivaron las primeras propuestas para el reordenamiento taxonómico (Meier-Brook 1986; Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000; Dreher Mansur 1993; Korniushev 1998a). Esta problemática se ha intensificado aún más, cuando se han realizado estudios de sistemática molecular (Cooley 1998; Park & Ó Foighil 2000; Cooley & Ó Foighil 2000), los cuales caen en contradicción con los análisis que incorporan morfología, siendo estos, actualmente la base que sustentan la sistemática del grupo. El sistema conservativo apoyado por los estudios cladísticos tradicionales y basados en la morfología reconocen a dos subfamilias: Euperiinae y Sphaeriinae. Euperiinae, con dos géneros (*Eupera* Bourguignat, 1854 y *Byssanodonta* d' Orbigny, 1835), fue reconocida originalmente por Heard (1965), quien además de observar diferencias en los sifones y glándula del biso consideró aspectos del desarrollo embrionario, caracterizando la incubación en los ctenidios y el desarrollo de grandes huevos con contenido nutritivo. Sphaeriinae presenta tres géneros (*Sphaerium* Scopoli, 1777, *Pisidium* Pfeiffer, 1821 y *Musculium* Link, 1807), los cuales tienen huevos más pequeños sin contenido nutritivo y desarrollo en sacos de incubación.

Los géneros de estas subfamilias son diagnosticados fundamentalmente sobre la base de caracteres conchológicos, morfología de la anatomía blanda y aspectos reproductivos involucrados en el desarrollo embrionario (Burch 1975; Kuiper 1983; Heard 1977; Ituarte 1988, 1989), lo cual ha tenido un consenso mundial, excepto con la escuela con la propuesta malacológica rusa de Starobogatov. La propuesta de esta escuela, según diversos investigadores sobrestima la diversidad alfa actualmente existente (Korniushev 1998a y b; Bogan & Bouchet 1998). A nivel específico los principales caracteres utilizados en la identificación son el contorno, forma general y aspecto de la conchilla, ornamentación de la superficie, ciertas características de la charnela, posición y forma del ligamento, se incluyen además caracteres de la anatomía blanda (número de aberturas del manto, número de branquias, desarrollo de las mismas, morfología del nefridio) y el desarrollo de la musculatura radial interna del manto (incluyendo los retractores de los sifones).

Adicionalmente, bajo el nivel genérico para los Sphaeriinae, se han propuesto subgéneros, sistema actualmente validado para Norteamérica (Burch 1975). Esta propuesta surgió de los trabajos de Lee & Ó Foighil (2003), a partir de un análisis filogenético utilizando

secuencias ribosómicas nucleares y mitocondriales. Estos autores proponen una clasificación genérica y subgenérica de la subfamilia Sphaeriinae. Este nuevo esquema propone cinco, en lugar de los tres géneros (*Sphaerium*, *Musculium* y *Pisidium*), del sistema tradicional, cuatro de los cuales corresponden a los tradicionales subgéneros previamente reconocidos: 1- *Pisidium*: *Pisidium* s.s. Pfeiffer, 1821; 2-*Cyclocalyx* Dall, 1903; 3-*Afropisidium* Kuiper, 1962; 4-*Odhneripisidium* Kuiper; 5-*Sphaerium* Scopoli, 1777, éste último con 2 subgéneros (*Sphaerium* s. Scopoli, 1777 y *Musculium* Link, 1807). La condición monofilética de la mayoría de los géneros propuestos por Lee & Ó Foighil (2003) tienen sólido soporte, sin embargo, los autores reconocen que la información incluida sobre representantes de Sudamérica austral es limitada. Esta problemática se acentúa en el reordenamiento subgenérico de miembros de *Pisidium*, clado que cae en conflicto con las filogenias basadas en morfología (Dreher-Mansur & Meier-Brook 2000; Lee 2001; Korniuschin & Glaubrecht 2002, 2006). Por tal razón, se prefiere actualmente seguir considerando la diversidad subgenérica del sur de Sudamérica según el esquema tradicional, reconociendo solo a la designación genérica de *Pisidium* (Ituarte 2007).

Respecto a la distribución global de Sphaeriidae, *Eupera* se distribuye solamente en las regiones Neotropical y Etiópica; *Pisidium*, *Musculium* y *Sphaerium* son cosmopolitas estando representados en Sudamérica Austral por 22 especies, de las cuales 19 corresponden a *Pisidium*, el género más diverso en la Región Neotropical y Holártica; *Byssanodonta* un género muy próximo a *Eupera*, tiene una distribución muy restringida siendo endémica de un sector en la cuenca alta del Río Paraná, reconocido como género monotípico (Ituarte 2007). Para Chile, se reconocen tres géneros: *Pisidium* representado por siete especies distribuidas a lo largo del territorio nacional. *P. chilense* (d Orbigny 1846), *P. magellanicum* (Dall 1908), *P. lebruni* (Mabille 1884), *P. observationis* (Pilsbry 1911), *P. meierbrooki* (Kuiper & Hinz 1983) *P. huillichum* (Ituarte 1999) y *P. llanquihuense* (Ituarte 1999). El género *Sphaerium* representado por dos especies *S. lauricochae* (Philippi 1869) y *S. forbesi* (Philippi 1869), ocupando el área altoandina de las tres regiones, compartiendo territorio con Perú y Bolivia. El género *Musculium*, también representado por dos especies *M. argentinum* (d Orbigny 1835) y *M. patagonicum* (Pilsbry 1911), ocupan la región

centro-sur y austral de Chile, compartiendo áreas de distribución con Argentina (Parada & Peredo 2002; Parada & Peredo 2006).

Desde su origen, el cual data a partir del Cretácico (Keen & Dance 1969), esta familia ha tenido la facultad de radiar exitosamente en una gran variedad de sistemas límnicos (Haas 1969; Hubendick 1979; Kuiper 1983). Actualmente, habitan una gran diversidad de cuerpos dulceacuícolas desde sistemas lóticos como lénticos incluyendo estuarios (Burch 1975; Kuiper 1983; Morton 1985). Destacan por su gran capacidad adaptativa, algunos ejemplares sobreviven en pequeños charcos y presentan la facultad de resistir periodos de desecación estacionales, tales como *Sphaerium occidentale* y *Musculium securis* (McKee & Mackie 1980) y *Pisidium personatum* y *Pisidium obtusale* (Kerney 1999). Se ha demostrado, que los Sphaeriinae frente a la presión por alimento, son capaces de adoptar nuevas estrategias durante la fase reproductiva tales como, la modificación tamaño y número de la nidada, asegurando la sobrevivencia de los descendientes (Beekey & Karlson 2003). En general los esféridos se caracterizan por ser poliploides, presentar hermafroditismo y viviparia. En este sentido: euvivíparos corresponden a la subfamilia Sphaeriinae y ovovivípara es típica de los Euperiinae (Korniushin & Glaubrecht 2002). Sphaeriidae presenta desarrollo directo, complejidad en los ciclos de vida, incubación de embriones y liberación de juveniles bentónicos (Mackie et al. 1974). Si bien la ovoviviparía, en general, es considerada inusual en moluscos, tal condición es encontrada frecuentemente en moluscos dulceacuícolas (Graf & Ó Foighil 2000; Glaubrecht 1996), lo que pudo ser clave en la adaptación de estos organismos a los ambientes de agua dulce (Heard 1977; Mackie 1978; Hetzel 1994; Cooley & Ó Foighil 2000). Los tamaños adultos varían desde 6 a 22 mm de longitud valvar, aunque la mayoría oscilan alrededor de 1cm, por lo que su estudio ha sido considerado laborioso y complejo fundamentalmente bajo una perspectiva taxonómica (Valdovinos 2008; Souza et al. 2008). De acuerdo las características morfológicas y al tamaño de la valva, han sido llamados comúnmente “pill clams” o “fingernail clams” (Sobarzo et al. 2002). Respecto a estudios Sphaeriidae a nivel nacional, la literatura es menos abundante y los aspectos que se han abordado corresponden a temáticas citogenéticas (Jara-Seguel et al. 2005). Algunos aportes dan cuenta de la dinámica e historia de vida pero solo a nivel intraespecífico (Peredo et al. 2009). Nuestra

meta en este primer capítulo es aportar antecedentes generales sobre los bivalvos dulceacuícolas y una breve síntesis sobre Gasterópoda.

Antecedentes generales y diversidad de gasterópodos chilenos

En los ecosistemas dulceacuícolas de Chile, al igual que en los de otros países del extremo sur de Sudamérica, se encuentran especies de gasterópodos con un elevado grado de endemismo, que presentan relaciones zoogeográficas arcaicas de tipo gondwánico (von Ihering 1891; Meier-Brook 1984; Van Bruggen 1980, Pugh & Scott 2002), los cuales constituyen elementos funcionalmente relevantes en las comunidades bentónicas de tales ecosistemas (Valdovinos 1989; Muñoz et al. 2001; Figueroa et al. 2002; Parra et al. 2002; Valdovinos et al. 2004). A pesar de estos antecedentes no existen estudios biogeográficos, ni revisiones sistemáticas actuales. Considerando su rol ecosistémico y potenciales bioindicadores, como se les ha considerado en otras latitudes, tampoco existen estudios ecológicos. Como consecuencia de estos antecedentes, el estado del conocimiento en términos generales de los gasterópodos dulceacuícolas en Chile, ha progresado mucho más lento en comparación a los bivalvos. Respecto a la diversidad de familias y géneros, podemos afirmar que la fauna de gasterópodos se encuentra integrado por las familias: Chilinae (género *Chilina* Gray 1828), Physidae (género *Physa* Draparnaud 1801), Lymnaeidae (género *Lymnaea* Lamarck 1799), Planorbidae (género *Biomphalaria* Preston 1910), más lapas de la familia Ancyliidae (*Anisancylus* Pilsbry 1924 y *Uncancylus* Pilsbry 1913) e Hydrobiidae (una especie del género *Potamolithus* Pilsbry 1896 y *Littoridina* Souleyet 1852). La familia Chilinae se distribuye en el Neotrópico, Australasia y Nueva Zelanda, Physidae se distribuye en el Neártico y Neotrópico, Lymnaeidae Holártico, Neotrópico y Australasia, Planorbidae y Ancyliidae ambas de distribución cosmopolita exceptuando la Antártica. Si bien, el inventario de los gasterópodos dulceacuícolas chilenos se inició de manera incipiente en el siglo XVIII (e.g. Bruguière 1789) y continuó en el siglo XIX (e.g. Gray 1828, King & Broderip 1832, Broderip & Sowerby 1832, d'Orbigny 1835, 1837, Sowerby 1838, 1874, Anton 1839, Gould 1847, Philippi 1860, Dall 1870, von Frauenfeld 1865, Smith 1881, Rochebrune & Mabilie 1885, Clessin 1886, Jousseume 1887, Mabilie & Rochebrune 1891), no es hasta inicios y mediados del siglo XX que el número de nuevas especies descritas comienza a estabilizarse (con las contribuciones de

Smith 1905, Strebel 1907, Pilsbry 1911, Marshall 1924, 1933, Biese 1944, 1947, 1948, 1951, Haas 1951). Con posterioridad, desde la última mitad del siglo XX hasta ahora, el número de nuevas especies descritas ha sido notablemente bajo (e.g. Valdovinos & Stuardo 1991). Posteriormente un trabajo reciente de Valdovinos (2006), entrega un listado completo de las especies encontradas a lo largo del territorio nacional, cuantificando un total de 73 especies, que se encuentran en permanente estado de revisión, llevando consigo a modificaciones nomenclaturales que serán discutidas más adelante. En relación a estudios filogenéticos de los grupos nacionales, ambos bastante recientes han sido llevados a cabo en Planorbidae y de manera preliminar en Hydrobiidae. Respecto a Planorbidae los estudios filogenéticos se han limitando a algunas especies de la zona norte. Sin embargo han permitido aportar valiosa información sobre eventos vicariantes y las relaciones específicas de *Biomphalaria* durante el Pleistoceno (Collado et al. 2011). Los estudios filogenéticos relacionados a Hidrobiidae han permitido inferir sobre las relaciones filogenéticas existentes con grupos provenientes desde el lago Titicaca y confirmar la existencia de *Heleobia* reemplazando de esta forma a *Littoridina*, en territorio nacional (Kroll et al. 2012).



Bibliografía

ANTON H.E (1839). Verzeichniss der Conchylien, welche sich in der Sammlung von Hermann Eduard Anton befinden, Halle. 110 pp.

BAILEY RC, EH ANTHONY & GL MACKIE (1983). Environmental and taxonomic variation in fingernailclam (Bivalvia: Pisidiidae) shell morphology. *Canadian Journal of Zoology* 61: 2781- 2788.

BAKER AM, F SHELDON, J SOMERVILLE, K F WALKER & JM HUGHES (2004). Mitochondrial DNA phylogenetic structuring suggests similarity between two morphologically plástic genera of Austraiian freshwater mussels (Unionida: Hyriidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:902-912.

BEEKEY M. A. & R H. KARLSON (2003). Effect of food availability on reproduction and brood size in a freshwater brooding bivalve. *Journal of Zoology* 81:1168–1173.

BIESE WA (1944). Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte I, Familia Amnicolidae. *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 22:169-190.

BIESE WA. (1947). Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte II, Familia Amnicolidae (continuación). *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 23:63-77

BIESE WA (1948). Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte III, Familias Ancyliidae y Physidae. *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 24:217-239.

BIESE WA (1951). Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte VII, Familia Planorbidae. Boletín del Museo de Historia Natural, Chile 25:121-230.

BOGAN A & P BOUCHET (1998). Cementation in the freshwater bivalve family Corbiculidae (Mollusca: Bivalvia): a new genus and species from Lake Poso, Indonesia. Hydrobiologia 389:131–139.

BRODERIP WJ. & GB SOWERBY. (1832). New species of Mollusca and Conchifera collected by Mr. Cuming. Proceedings of the Committee of Science and Correspondence of the Zoological Society of London 2:50-61.

BRUGUIÈRE JG (1789). Encyclopédie méthodique ou par ordre de matières. Histoire naturelle des Vers, des Mollusques, Paris. 758 pp.

BURCH JB (1975). Freshwater Sphaeriacean clams (Mollusca: Pelecypoda) of North America. Revised Edition. Hamburg: Malacological Publications.

COLLADO G, I VILA & M MENDEZ (2012). Monophyly, candidate species and vicariance in Biomphalaria snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano Zoologica Scripta 1-10.

COOLEY LR (1998). Molecular phylogeny and evolution of brooding systems of Sphaeriidae. In R. Bieler & P. M. Mikkelsen (Eds) Abstracts of the World Congress of Malacology (Washington DC (p. 70). Chicago: Unitas Malacologica.

COOLEY LR & D Ó FOIGHIL (2000). Phylogenetic analysis of the Sphaeriidae (Mollusca: Bivalvia) based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. Invertebrate Biology 119: 299–308.

CLESSIN S (1886). Die Familie der Limnaeiden enthaltend die Genera Planorbis, Limnaeus, Physa und Amphipeplea. En: Systematisches Conchylien-Cabinet (Eds. H.C. Küster, F.W. Martini & J.H. Chemnitz), pp. 311-430.

DALL WH (1870). On the genus Pompholyx and its allies, with a revision of the Limnaeidae of authors. Annals of The Lyceum of Natural History New York 9:333-361.

D'ORBIGNY A (1835-43). Voyage dans L'Amerique Méridionale 5(3 Mollusques). 758 pp.

D'ORBIGNY A. (1835-43). Voyage dans L'Amerique Méridionale 5(3 Mollusques). 758 pp.

DYDUCH-FALINOWSKA A (1988). The conchological variability of *Sphaerium corneum* (Linnaeus, 1758) in the Polish waters. Folia Malakologica, Krak6v. 2: 82-96.

DREHER-MANSUR MC & C MEIER-BROOK (1992). Morphology of *Eupera Bourguignat*, 1854 and *Byssanodonta Orbigny*, 1843 and the phylogenetic affinities within the family Sphaeriidae (Bivalvia, Veneroida). In: Abstracts of the 11th International Malacological Congress. Giusti F & Manganelli G, eds., pp. 335-336, Unitas Malacologica, Siena.

DREHER-MANSUR MC & C MEIER-BROOK (2000). Morphology of *Eupera Bourguignat*, 1854 and *Byssanodonta Orbigny*, 1846 with contributions to the phylogenetic systematics of Sphaeriidae and Corbiculidae (Bivalvia, Veneroida). Archiv für Molluskenkunde 128: 1-59.

FIGUEROA R, C VALDOVINOS, E. ARAYA & O PARRA (2002). Macroinvertebrados bentónicos como indicadores de calidad de agua en ríos del sur de Chile. Revista Chilena de Historia Natural 79:191- 201.

FUENTEALBA C & O HENRIQUEZ (2006). Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay 9 (92): 195-200.

FUENTEALBA C, J MORRONE & R FIGUEROA (2010). Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 289-298.

FUENTEALBA C, R FIGUEROA, F GONZALES & M PALMA (2011). Variabilidad genética local del bivalvo dulceacuícola *Diplodon (diplodon) chilensis* proveniente de tres lagos Nahuelbutanos. *Gayana* 74 (2): 113-124.

GLAUBRECHT M (1996). *Evolutionsökologie und Systematik am Beispiel von Süß- und Brackwasserschnecken (Mollusca: Caenogastropoda: Cerithioidea): Ontogenese-Strategien, Paläontologische Befunde und Historische Zoogeographie*. Leiden: Backhuys .

GONZÁLEZ MR (1998). Larvas de *Diplodon chilensis chilensis* (Gray, 1828): ¿De vida libre o parásitas de peces? Seminario para optar al Título de Biólogo Marino. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

GOULD AA (1847). On the shells collected by the United States Exploring Expedition. *Proceedings of the Boston Society of Natural History*. 325 pp.

GRAF D L & D Ó FOIGHIL (2000). The evolution of brooding characters among the freshwater pearly mussels (Bivalvia: Unioniodes) of North America. *Journal of Molluscan Studies* 66: 157–170.

GRAF DL & K CUMMINGS (2007). Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoidea). *Journal of Molluscan Studies* 73:291–314.

GRAY JE (1828). *Spicilegium zoologicum; or original figures and short systematic descriptions of new and unfigured animals*, London. 214 pp.

HAAS F (1951). Remarks on and descriptions of South American non-marine shells. *Fieldiana Zoology* 31(46):503-545.

HAAS F (1969). Superfamily Unionacea. In: Moore RC, ed. *Treatise on invertebrate paleontology*. Part N, Vol. 1, Mollusca 6, Bivalvia. Lawrence, KA: Geological Society of America and University of Kansas Press, N411–N470.

HENDERSON J (1935). Fossil non-marine Mollusca of North America. Geological Society of America Special Paper 3-313 pp.

HETZEL U (1994). Reproduktionsbiologie- Aspekte der Viviparie bei Sphaeriidae mit dem Untersuchungsschwerpunkt *Musculium lacustre* (O. F. Müller 1774) (Bivalvia; Eulamellibranchiata). Doctoral dissertation, University of Hannover. 273 pp.

HEARD WH (1965). Recent *Eupera* (Pelyceopoda: Sphaeriidae) in the United States. *The American Midland Naturalist* 74: 309-317.

HEARD W H (1977). Reproduction of fingernail clams (Sphaeriidae: *Sphaerium* and *Musculium*). *Malacologia* 16: 421-455.

HOLOPAINEN IJ & JG KUIPER (1982). Notes on the morphometry and anatomy of some *Pisidium* and *Sphaerium* species (Bivalvia, Sphaeriidae). *Annales. Zoologici. Fennici*. 19: 93–107.

HUBENDICK B (1979). Systematics and comparative morphology of the Basommatophora. In: Fretter V, Peake J, eds. *The pulmonates*, Vol. 2A. London: Academic Press, 1–47.

ITUARTE CF (1988). Características de la incubación branquial en *Eupera platensis* Doello-Jurado, 1921 y *Byssanodonta paranensis* d'Orbigny, 1846 (Pelecypoda: Sphaeriidae). *Iheringia* 68: 41-47.

ITUARTE CF (1989). Los géneros *Byssanodonta* d'Orbigny, 1846 y *Eupera* Bourguignat, 1854 (Bivalvia: Sphaeriidae) en el área Paranoplatense. Descripción de *Eupera iguazuensis* n. sp. Del Río Iguazui, Misiones, Argentina. Neotrópica 35: 53-63.

ITUARTE C (2007). Las especies de *Pisidium Pfeiffer* de Argentina, Bolivia, Chile, Perú y Uruguay (Bivalvia-Sphaeriidae). Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales, n. s. 9 (2): 169-203.

JARA-SEGUEL P, S PEREDO & E PARADA (2005). Registro de poliploidía en la almeja dulceacuícola *Musculium argentinum* (D'Orbigny 1835) (Bivalvia: Sphaeriidae). Gayana Zoológica 69(1): 35-39

JOUSSEAUME F (1887). Mollusques nouveaux de la République de l'Equateur. Bulletin de la Société Zoologique de France. 128 pp.

KEEN M & P DANCE (1969). Family Pisidiidae. In: Moore RC, ed. Treatise on invertebrate paleontology. Part N, Vol. 2, Mollusca 6, Bivalvia. Lawrence, KA: Geological Society of America and University of Kansas Press, N669–N670.

KERNEY M. (1999) Atlas of the land & freshwater molluscs of Britain & Ireland. Harley Books, Colchester.

KING PP & WJ BRODERIP (1832). Description of the Cirripedia, Conchifera and Mollusca in a collection formed by the officies of HMS Adventure and Beagle employed between the years 1826 and 1830 in surveying the southern coast of South America including the Strait of Magellans and the coast of Tierra del Fuego. Zoological Journal 5:332-349.

KUIPER J G (1983). The Sphaeriidae of Australia. Basteria, Leiden 47: 3-52.

KORNIUSHIN AV (1998a). Review of the studies on freshwater bivalve mollusc systematics carried out by the Russian taxonomic school. Malacological Review Supplement. 7: 65-82.

KORNIUSHIN AV (1998b). A comparative investigation of nephridia in fingernail and pill clams. Malacological Review, Supplement. 7:53-63.

KORNIUSHIN AV & M GLAUBRECHT (2002). Phylogenetic analysis based on the morphology of viviparous freshwater clams of the family Sphaeriidae (Mollusca, Bivalvia, Veneroidea) Zoologica Scripta 31: (5) 415– 459.

KROLL O, R HERSHLER, C ALBRECHT, EDMUNDO M. TERRAZAS, R APAZA , C FUENTEALBA, C WOLFF & T WILKE (2012) The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: correlation between molecular evolution and hydrographic history 1517-1530.

LARA G & E PARADA (1988). Distribución espacial y densidad de *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) (Mollusca: Bivalvia) en el lago Villarrica. Boletín Sociedad de Biología. Concepción 59: 105-114.

LARA G & E PARADA (1991). Seasonal changes in the condition index of *Diplodon chilensis chilensis* (Gray, 1828) in sandy and muddy substrata. Villarrica Lake .Chile (39°18'S; 72°05'W). Boletín Sociedad de Biología de Concepción 62:99-106.

LARA G, CONTRERAS A & F ENCINA (2002). La almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae) potencial biofiltro para disminuir los niveles de coliformes en pozos. Experimento de laboratorio. Gayana Zoología 66 (2): 113-118.

LARA, G. & E. PARADA (2008). Mantención del patrón de distribución espacial, densidad y estructura de tamaños de la almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* Gray, 1828 (Bivalvia: Hyriidae) en el Lago Panguipulli, Chile. Gayana 72 (1): 45-51.

LEE T (2001). Systematic revision of the Sphaeriinae (Mollusca, Bivalvia, Veneroida, Sphaeriidae). D Phil Thesis, University of Michigan.

LEE T & D Ó FOIGHIL (2003). Phylogenetic structure of the Sphaeriinae, a global clade of freshwater bivalve molluscs, inferred from nuclear (ITS-1) and mitochondrial (16S) ribosomal gene sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137:245–260.

LETELIER S & AM RAMOS (2006). Distribución geográfica de *Diplodon* (*Diplodon chilensis* (Gray 1828) basado en la colección del Museo de Historia Natural (MNHCL), Santiago de Chile. *Amici Molluscarum* (9): 13-15.

MABILLE J & A.T ROCHEBRUNE. 1891. Mollusques. Mission Scientifique du Cap Horn. 1882-1883. 6 (zool. 2) :1-129.

MACKIE GL, SU QUADRI & AH CLARKE (1974). Development of brood sacs in *Musculium securis* Bivalvia: Sphaeriidae. *Nautilus*, 88 (4): 109-111.

MACKIE GL (1978). Are sphaeriid clams ovoviviparous or viviparous? *Nautilus* 92: 145–147.

MARSHALL WB. (1924). New species of Mollusks of the genus *Chilina*. *Proceedings of the United States National Museum* 66(2550):1-5.

MARSHALL WB (1933). New freshwater gastropod molluscs of the Genus *Chilina* of South America. *Proceeding of the United States National Museum* 82(8):1-7.

MCKEE PM & GL MACKIE (1980). Desiccation resistance in *Sphaerium occidentale* and *Musculium securis* (Bivalvia: Sphaeriidae) from a temporary pond. *Can. J. Zool.* 58: 1693–1696.

MCMICHAEL DF & ID HISCOCK (1958). A monograph of freshwater mussels (Mollusca: Pelecypoda) of the Australian region Australian. Journal of Marine and Freshwater Research 9:372–508.

MENA G (1997). Evaluación experimental de la capacidad de *Diplodon chilensis* para procesar los excedentes orgánicos generados por la salmonicultura. Tesis de grado para optar al grado de Licenciado en Biología Marina. Universidad Austral de Chile. 66 p.

MEIER-BROOK C. (1984). A preliminary biogeography of freshwater pulmonate gastropods. En: World-wide Snails: Biogeographical Studies on Non-marine Mollusca (Eds. A. Solem & A. C. van Bruggen), pp. 32-37. E. J. Brill and Dr. W. J. Backhuys, Leiden.

MEIER-BROOK C (1986). The question of subgrouping in *Pisidium* (Eulamellibranchiata: Sphaeriidae). In Proceedings of the 8th International Malacological Congress. Budapest: Unitas Malacologica.

MORTON B (1985). The population dynamics, reproductive strategy and life history tactics of *Musculium lacustre* (Bivalvia: Pisidiidae) in Hong Kong. Journal Zoology of London 207:581-603.

MUÑOZ S, G MENDOZA & C VALDOVINOS (2001). Evaluación rápida de la biodiversidad de cinco lagos costeros de la VIII Región de Chile. Gayana Zoología 65:173-180.

PARADA E, S PEREDO & C GALLARDO (1987). Reproductive effort in *Diplodon chilensis chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia, Hyriidae) a proposition for its determination. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción (Chile) 58: 121-126.

PARADA E & S PEREDO & F ANTONIN (1989). Contribución al Conocimiento de los Hyriidae chilenos. Boletín de la Sociedad Biología Concepción 60:173-182.

PARADA E, S PEREDO & C GALLARDO (1990). Tácticas reproductivas y dinámica poblacional de *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia: Hyriidae). Revista Chilena de Historia Natural 63: 23-35.

PARADA E & PEREDO S (2008). *Diplodon patagonicus* (Bivalvia: Hyriidae): to be or not to be. Gayana 72(2): 266-267.

PARADA E & S PEREDO (2002). Estado actual de la taxonomía de bivalvos dulceacuícolas chilenos: Progresos y conflictos. Revista Chilena de Historia Natural 75: 691-701.

PARADA E & S PEREDO (2005). La relocalización como una herramienta de conservación y manejo de la biodiversidad: Lecciones aprendidas con *Diplodon chilensis* (Gray 1828) (Bivalvia, Hyriidae). Gayana 69: 41-47.

PARADA E & S PEREDO (2006). Estado de conocimiento de los bivalvos dulceacuícolas de Chile. Gayana 70: 82-87.

PARK JK & DÓ FOIGHIL (2000). Sphaeriid and Corbiculid clams represent separated heterodont bivalve radiations into freshwater environments. Molecular Phylogenetic Evolution 14: 75-88.

PARODIZ J (1969). The Tertiary Non-Marine of South America. Annals Carnegie Museum, 40:5-76.

PARRA, O., C. VALDOVINOS, R. URRUTIA, M. CISTERNAS, E. HABIT & M. MARDONES (2002). Caracterización y tendencias tróficas de cinco lagos costeros de Chile central. Limnetica 22(1-2):51-83.

PEREDO S, E PARADA & P JARA-SEGUEL (2009). Life Histories and Dynamics of Stream and Lacustrine Populations of *Musculium argentinum* (D'Orbigny 1835) (Bivalvia: Sphaeriidae) in Southern Chile. *Malacología* 51(1): 29-38.

PHILIPPI RA (1860). Viaje al desierto de Atacama hecho por orden del Gobierno de Chile en el verano 1853-1854 por el Dr. Rodolfo Amando Philippi. E. Anton, Halle en Sajonia. 254 pp

PILSBRY H (1911). Non marine mollusca from Patagonia 3. Princeton University Reports, Princeton Expedition to Patagonia 1896-1899 :513-633.

PUGH PJA. & B. SCOTT (2002). Biodiversity and biogeography of non-marine Mollusca on the islands of the Southern Ocean. *Journal of Natural History* 36:927-952.

ROCHEBRUNE AT & J MABILLE (1885). Diagnoses de mollusques nouveaux, recueillis par les membres de la mission du Cap Horn et M. Lebrun, Préparateur au Muséum, chargé d'une mission à Santa-Cruz de Patagonie. *Bulletin de la Société Philomathique de Paris* 7(9): 100-111.

SILVA J, C FUENTEALBA, E BAY-SCHMITH & A LARRAÍN (2007). Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Gayana* 71: 135-141.

SMITH EA (1881). Mollusca and molluscoidea. Account of the zoological collections made during the survey of H.M.S. "Alert" in the Straits of Magellan and on the coast of Patagonia. *Proceedings of the Zoological Society of London*: 22-44.

SMITH EA (1905). On a small collection of mollusca from Tierra del Fuego. *Proceedings of the Malacological Society of London* 6(6): 333-339

SOBARZO C, P JARA-SEGUEL, S PEREDO & E PARADA (2002). Primer registro de *Musculium argentinum* (d'Orbigny 1835) (Bivalvia: Sphaeriidae) en aguas continentales chilenas. *Gayana Zoología* 66(1) :39-43.

SOTO D & G MENA (1999). Filter feeding by the freshwater mussel *Diplodon chilensis* as a biocontrol of salmon farming eutrophication. *Aquaculture* 171: 65-81

SOUSA R, P MORAIS, C ANTUNES & L GUILHERMINO (2008). Factors Affecting *Pisidium amnicum* (Muller, 1774; Bivalvia: Sphaeriidae) Distribution in the River Minho Estuary: Consequences for its Conservation. *Estuaries Coasts* 31(6), 1198-1207.

SOWERBY GB (1838). A descriptive catalogue of the species composing the genus *Chilina* of Gray. *Malacological & Conchological Magazine*: 51-54

SOWERBY G. B. (1874). *Conchologia Iconica*. L. Reeve & Co., London. 19 pp.

STREBEL H. (1907). Beiträge zur Kenntnis der Molluskenfauna der Magalhaen-Provinz. No. 5. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Tiere* 25:79-196.

VAN BRUGGEN A C (1980). Gondwanaland connections in the terrestrial molluscs of Africa and Australia, *Journal of the Malacological Society of Australia* 4:215-222.

VALDOVINOS C (1989). Catálogo de los moluscos terrestres y dulceacuícolas de la Cordillera de Nahuelbuta y áreas adyacentes. *Comunicaciones del Museo Regional de Concepción* 3:7-14.

VALDOVINOS C. & J STUARDO (1991). Planórbidos Altoandinos del Norte de Chile y *Biomphalaria aymara* spec. nov. (Mollusca: Basommatophora). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 26(4):213-224

VALDOVINOS C & R. CUEVAS (1996). Tasas de aclarancia de *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae): un suspensívoro bentónico dulceacuícola de Chile Central. Medio Ambiente 13(1): 114-118.

VALDOVINOS C, C MOYA & V OLMOS (2004). Biodiversidad de moluscos terrestres en la Ecorregión Valdiviana (Chile). En: Biodiversidad y Ecología de los bosques de la Cordillera de la Costa (Eds. C. Smith, J. Armesto & C. Valdovinos), pp. 292-306. Editorial Universitaria, Chile.

VALDOVINOS C (2006). Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. Gayana 70: 88-95.

VALDOVINOS C (2008). Invertebrados dulceacuícolas En: Rovira J, J Ugalde & M Stutzin (eds) Biodiversidad de Chile. Patrimonios y desafíos: 202-223p. Conama, Chile.

VALDOVINOS C & R CUEVAS (1996). Tasas de aclarancia de *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae): Un suspensívoro bentónico dulceacuícola de Chile Central. Medio Ambiente 13: 114-118.

VON FRAUENFELD GR (1865). Zoologische miscellen. VII. Bemerkungen über Assiminea und Chilina und einige paludinen. Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien 16(1866):185-199.

VON IHERING H. (1891). On the ancient relations between New Zealand and South America. Transactions and Proceedings of the New Zealand Institute 24:431-445.

WALKER KF, M BYRNE, CW HICKEY & DS ROPER (2001). Freshwater mussels (Hyriidae) of Australasia. En: Ecology and Evolution of the freshwater mussels Unionoida. (Eds. G. Bauer & K. Wachtler), 145. pp. 5-31. Ecological Studies, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

CAPITULO II: ENDEMISMO, PATRONES DE DIVERSIDAD, DISTRIBUCIÓN, NUEVOS REGISTROS DE GASTROPODA Y MODIFICACIONES NOMENCLATURALES.

B- Problemáticas nomenclaturales y nuevos registros

Nuevos aportes y modificaciones nomenclaturales del genero *Littoridina* (Souyelet 1852).

Resumen

Se entregan antecedentes sobre la modificación nomenclatural del genero *Littoridina* (Souyelet 1852), los que actualmente son reconocidos como *Heleobia*. Se destacan los principales avances en los dos últimos años, basados en la morfología peniana y análisis moleculares que permitieron validar a las siguientes especies: *Heleobia chimbaensis*, *Heleobia cumingii*, *Heleobia limariensis* y *Heleobia loaensis*.

Palabras claves: *Littoridina*, *Heleobia*, morfología peniana, glándulas apocrinas

En Chile el género *Littoridina* se encuentra representado por un total de 21 especies, distribuidas a lo largo de todo el territorio nacional (Valdovinos 2006), compuesto por las especies, *Littoridina atacamensis* (Philippi, 1860); *Littoridina bruninensi* Biese, 1944; *Littoridina compacta* Biese, 1944; *Littoridina copiapoensis* Biese, 1944; *Littoridina coquimbensis* Biese, 1944; *Littoridina chimbaensis* Biese, 1944 ; *Littoridina choapaensis* Biese, 1944; *Littoridina cumingii* Biese, 1944; *Littoridina gracilis* Biese, 1944; *Littoridina limariensis* Biese, 1944; *Littoridina loaensis* Biese, 1947; *Littoridina magallanica* Biese, 1947; *Littoridina oblonga* Biese, 1944; *Littoridina obtusa* Biese, 1944, *Littoridina opachensis* Biese, 1947; *Littoridina pachispira* Biese, 1944; *Littoridina pueloensis* Biese, 1944; *Littoridina santiaguenses* Biese, 1944; *Littoridina simples* Pilsbry, 1911; *Littoridina striata* Biese, 1944 y *Littoridina transitoria* Biese, 1947.

Estos gasterópodos descritos para Hydrobiidae, fueron asignados a *Littoridina* hasta el año 2011, bajo dudosos criterios taxonómicos, basados en la morfología de la concha (Souleyet 1852; Valdovinos 2006; Fuentealba et al, 2010). Un rasgo, cuya variación es fuertemente

influenciada por las condiciones locales del ambiente Rummi (1991), por lo que se prefiere utilizar para la diagnosis el sistema reproductor.

La diagnosis de *Heleobia* (Fig.1), se basa en el sistema reproductor masculino, la presencia de glándulas apocrinas y para *Littoridina* la presencia de papilas en el pene (Hershler & Thompson 1992)

Estudios previos realizados Hubendick (1955), describieron por primera vez el órgano copulatorio de un ejemplar asignado como *Littoridina*, determinando posteriormente, que este material correspondería indudablemente al genero *Heleobia* (Stimpson, 1865), perteneciente a la familia Cochliopidae y a la especie *H. chimbaensis* (Biese, 1944). Esta situación indudablemente, incremento la confusión existente en la identificación correcta de los miembros de Hydrobiidae y Cochliopidae en Chile (Fuentealba et al. 2010). El primer trabajo, destinado a esclarecer la presencia de ambos grupos consistió en una revisión exhaustiva, basado en la morfología penianana realizado por Collado et al. (2011). Este trabajo, permitió, descartar la presencia de algunos miembros de *Littoridina* en territorio nacional, registrando un total de 28 especies de *Heleobia* y 10 subespecies de las cuales 26 serían formas endémicas, excluyendo la existencia de *Littoridina*

Con la incorporación de especies nacionales de Cochliopidae en la siguiente tesis, se confirma la existencia de las siguientes especies del genero *Heleobia*: *Heleobia chimbaensis*, *Heleobia cumingii*, *Heleobia limariensis* y *Heleobia loaensis*. Estos análisis sugieren además, que estas especies, se habrían originado en el altiplano Boliviano y mediante eventos promovidos por procesos de colonización recientes, se habrían establecido en territorio nacional (Kroll et al. 2012).

Finalmente, aún queda un grupo de especies que validar al extremo Sur, a partir de los 46°S del territorio nacional, las que podrían aportar información relevante sobre la distribución y diversidad de este grupo de gasterópodos.

Bibliografía

COLLADO GA, M A MÉNDEZ & L SERGIO (2011). Morfología peniana y taxonomía de especies chilenas del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda: Cochliopidae) junto a una revisión de los ejemplares tipo del Museo Nacional de Historia Natural de Chile. *Amici Molluscarum*, Número especial: 49-58

FUENTEALBA C, MORRONE J & R FIGUEROA (2010) Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83: 289-298.

HERSHLER, R. & FG THOMPSON (1992). A review of the Aquatic gastropod subfamily Cochliopinae (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Malacological Review (Supplement)* 5: 1–140.

HUBENDICK B (1955). XVIII. The anatomy of the Gastropoda. En: The Percy Sladen Trust Expedition to Lake Titicaca in 1937. *Transactions of the Linnean Society, London*, series 3, 1(3): 309–327.

KROLL O, R HERSHLER, C ALBRECHT, E M TERRAZAS, R APAZA, C FUENTEALBA, C WOLFF & THOMAS WILKE (2012) The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: correlation between molecular evolution and hydrographic history. *Ecology and Evolution*, 2(7): 1517-1530.

RUMMI A. (1991). La familia *Planorbidae* Rafinisque, 1815 en la Republica Argentina. *Fauna de agua dulce de la Republica Argentina*, 15: 5-51.

VALDOVINOS C (2006). Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70(1): 88–9.

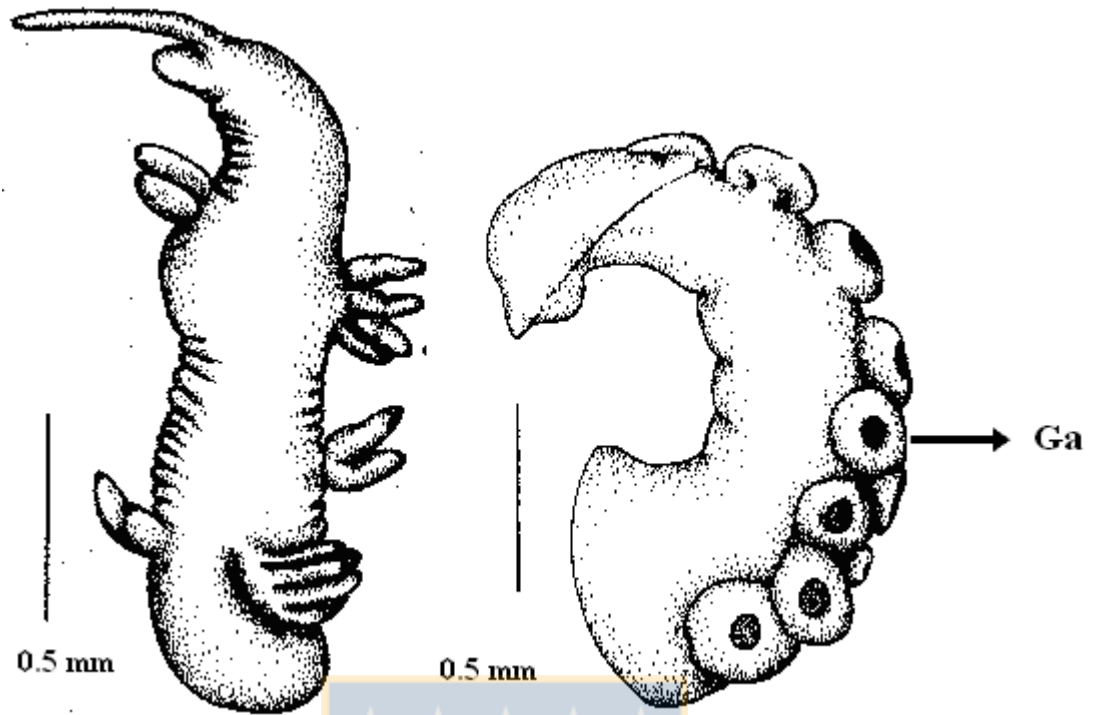


Figura 1: Anatomía estructura peniana de *Littoridina* (izquierda) y *Heleobia* (derecha). Ga: glándulas apocrinas modificado de Hershler & Thompson (1992).



CAPITULO III: RELACIONES FILOGENÉTICAS DE SPHAERIIDAE (VENEROIDA) E HYRIIDAE (UNIONOIDA).

Reconstrucción filogenética de Sphaeriinae (Veneroidea: Bivalvia) y la posición filogenética de *Pisidium chilense* (d'Orbigny, 1846).

Resumen

Sphaeriidae es una familia de bivalvos dulceacuícolas de distribución cosmopolita, conocidos como “finger clams”. Estudios filogenéticos han contrastado principalmente la monofilia del género *Pisidium*, clado que se recupera en los árboles morfológicos, sin embargo en los árboles de genes es parafilético. Estos estudios han sugerido, que la incorporación de taxa sudamericanos podría ayudar a resolver el problema. En el presente estudio se somete a prueba la hipótesis de monofilia de *Pisidium* y la posición filogenética de la especie *P. chilense*, mediante la incorporación de nuevas secuencias de esta especie endémica a Chile. Se utilizó secuencias del gen ribosomal nuclear del primer espaciador interno (ITS-1), analizadas bajo inferencia Bayesiana (IB). Los resultados revelan que Sphaeriinae es un clado monofilético PP=98, dentro del cual es posible reconocer dos grupos monofiléticos representado por miembros de *Pisidium* PP=98 y *Musculium* PP=98, sin embargo *Sphaerium* es parafilético. *Pisidium chilense* forma un grupo monofilético con las especies sudamericanos PP=98.

Palabras claves: Sphaeriidae, Sphaeriinae, *Pisidium chilense*, reconstrucción filogenética

Introducción

Los bivalvos dulceacuícolas de la familia Sphaeriidae conocidos como “finger clams”, se encuentran distribuidos a lo largo de todo el territorio nacional (18°S a 56°S), habitando una gran variedad de ecosistemas de agua dulce (Fuentealba et al. 2010).

En los últimos años el conocimiento sistemático de Sphaeriidae en Chile, ha presentado avances considerables desde la publicación “Estado actual de la taxonomía de bivalvos dulceacuícolas chilenos: Progresos y conflictos” Parada & Peredo (2002). Este trabajo ha

permitido por primera vez, el reordenamiento taxonómico y territorial de las especies actuales, incluyendo nuevos registros descritos para las cuencas trasandinas (Sobarzo et al. 2002). Posteriormente el trabajo de Sobarzo et al. (2002), es complementado con los estudios de revisión de Ituarte (2007), en su publicación sobre las especies de *Pisidium* Pfeiffer de Argentina, Bolivia, Chile, Perú y Uruguay, reconociéndose actualmente, un total de once especies distribuidas entre los géneros *Sphaerium*: *S. lauricochae* Ituarte (1995), *S. forbesi* Ituarte (1995), *Musculium*: *M. argentinum*, *M. patagonicum* y *Pisidium*: *P. magellanicu*, *P. Lebruni*, *P. observationis*, *P. meierbrooki*, *P. huillichum*, *P. llanquihuense*. De estas especies la mas abundante en la zona centro desde los 35° a 40° S, corresponde a *Pisidium chilense* (Parada & Peredo 2006).

Sin embargo, los estudios filogenéticos recientes de Sphaeriidae, han considerado un mínimo de los taxa sudamericanos, incorporando únicamente ejemplares desde Argentina y Ecuador, por lo que las relaciones filogenéticas de ejemplares chilenos, aún permanecen desconocidas e inciertas (Lee & Ó Foighil 2003).

La reconstrucción filogenética de la familia Sphaeriidae en un contexto mundial, ha sido compleja de abordar. Según lo planteado por a Lee (2004), los estudios filogenéticos entre los datos morfológicos y moleculares de Sphaeriidae, han producido resultados contradictorios, Inclusive, el autor afirma que existe incongruencia, entre las propias reconstrucciones filogenéticas morfológicas (Dreher-Mansur & Meier-Brook 2000; Lee 2004; Korniuschin & Glaubrecht 2002, 2006). Para Graf (2013), ambas filogenias resultan inconciliables y que el mayor obstáculo para progresar en temáticas filogenéticas y evolutivas, es el número de investigadores que trabajan en estos grupos de bivalvos, lo que influye sin duda en el número de organismos incluidos en la filogenia. Sin embargo, la naturaleza de los caracteres también puede influir directamente en los resultados obtenidos. Los primeros estudios filogenéticos realizados por Meier-Brook (1986) se enfocaron en *Pisidium* y en resolver las relaciones subgenéricas de la subfamilia Sphaeriinae. Este análisis soportado por 13 caracteres morfológicos sustentaron la monofilia de Sphaeriinae, sin embargo, las relaciones entre *Pisidium*, *Odhneripisidium* y *Afropisidium* no fueron resueltas demostrando la polifilia para *Pisidium*. Históricamente, el primer análisis filogenético a nivel mundial, en Sphaeriidae fue realizado por Dreher-Mansur & Meier-Brook (2000) a nivel de subfamilia y abordó fundamentalmente las relaciones

intragénicas. Este análisis, consideró un set de 49 caracteres de la anatomía blanda y de la valva. Los resultados sostuvieron la monofilia de Sphaeriidae mediante diez sinapomorfias. Respecto a las relaciones a nivel genéricas se encontraron, dos clados, uno representado por *Eupera* y *Byssanodonta* al que llamaron Euperiinae (monofilético), apoyado por siete sinapomorfias, y otro conformado por la topología (*Sphaerium* (*Musculium*, *Pisidium*)), asignado como Sphaeriinae (monofilético), apoyado por cuatro sinapomorfias, todas derivadas del nefridio. Respecto a *Sphaerium*, *Musculium* y *Pisidium* son recuperados como un clado.

No obstante, estos resultados sustentados por un conjunto de caracteres del nefridio, para diversos investigadores fueron incongruentes con los primeros estudios taxonómicos que consideraban otros rasgos anatómicos (Koningsmann 1975). Estos estudios, fueron enfocados en el objetivo central de determinar si *Sphaerium* y *Musculium* eran lo suficientemente diferenciables, como para ser considerados en un status genérico independiente. Según Korniuschin (1991), ambos géneros tienen relaciones filogenéticas cercanas, según la modalidad de reproducción compartida, sugiriendo a *Sphaerium* y *Musculium* son clados hermanos. Otra filogenia morfológica, propuesta por Lee (2004), que incluyó un mayor número de taxa, sostiene que *Sphaerium* y *Musculium*, sostienen un grupo monofilético, sin embargo *Pisidium* es parafilético. Estos resultados, no son congruentes con los árboles basados en morfología anteriores, por lo que el autor concluye que los caracteres morfológicos informativos son aun insuficientes para validar las relaciones filogenéticas entre los miembros de Sphaeriinae.

Estudios posteriores, realizados por Korniuschin & Glaubrecht (2006), basados en 69 caracteres morfológicos involucrando rasgos reproductivos y morfología blanda, recuperan a Sphaeriinae y Euperiinae como clados, a *Pisidium* como otro clado y hermano de *Musculium*, reafirmando la propuesta inicial planteada por Dreher-Mansur & Meier-Brook (2000).

Con la incorporación de datos moleculares, en la reconstrucción filogenética realizada por Park & Ó Foighil (2000), utilizando secuencias del gen 28 rDNA, se recupera nuevamente la monofilia de Sphaeriidae, la cual queda representada por dos grupos monofiléticos, a los que designaron a las subfamilias Sphaeriinae y Euperinae. No obstante, en el interior de

estos clados resultan inconsistentes las relaciones de *Pisidium* y *Sphaerium*, los cuales resultaron parafiléticos.

Una nueva propuesta filogenética planteada por Cooley & Ó Foighil (2000), basada en el gen 16 S rDNA, sugiere que *Sphaerium* y *Musculium* forman un clado, en donde *Musculium* es monofilético anidado dentro de *Sphaerium*. Además, *Pisidium* es recuperado como parafilético, en donde *P. sterkianum* es hermana del resto de los Sphaeriinae.

Reconstrucciones posteriores, realizadas por Lee & Ó Foighil (2003) incorporando el gen nuclear ITS-1 y mitocondrial 16S, proponen en lugar de los tres géneros reconocidos por Park & Ó foighil (2000) cinco subgéneros: *Afropisidium*, *Odhneripisidium*, *Pisidium*, *Cyclocalyx* y *Sphaerium*. Cuatro de estos fueron reconocidos monofiléticos dentro de Sphaeriinae, sin embargo, la parafilia de *Pisidium* se mantiene. Además, estos mismos trabajos concluyen que la posición de *Pisidium sterkianum* (Argentina) y *Pisidium* sp. (Ecuador) es confuso, siendo las únicas especies sudamericanas de *Pisidium* representadas en esta filogenia y finalmente resueltas como grupos parafiléticos dentro de Sphaeriidae. Por tal razón los autores de esta filogenia, consideran que esta situación podría ser resuelta con la incorporación de un mayor número de otras latitudes.

Esta diferencia entre la evidencia molecular y morfológica, planteada por Lee (2004), quien sugirió que podría ser consecuencia de la falta de un mayor número de caracteres morfológicos informativos, nos permite actualmente sugerir que ambas propuestas podrían seguir patrones de evolución distintos. En este caso la inconsistencia entre estas evidencias se debería a que los caracteres morfológicos son bastante plásticos y convergentes evolutivamente.

En el presente estudio se somete a prueba la hipótesis de monofilia de *Pisidium* y la posición filogenética de la especie *Pisidium chilense*, mediante la incorporación de una nueva secuencia del gen ITS de esta especie endémica en Chile.

Materiales y métodos

Obtención y extracción de secuencias de ADN de Sphaeriidae

Se obtuvieron secuencias de aproximadamente 645 bp del gen del transcrito interno ITS-I desde Genbank de 43 especies. El grupo interno estuvo conformado por 42 especies representativas de los géneros *Musculium*, *Pisidium* y *Sphaerium* (Sphaeriinae), y el grupo externo por *Eupera cubensis* y *Eupera platensis* (Euperiinae). A esta base de datos se incorporo una secuencia de un ejemplar de *Pisidium chilense*, una especie endémica a Chile previamente no secuenciada. Detalles de los taxa incluidos, número de acceso a Genbank y referencias bibliográficas, son mostrados en la Tabla I. El ejemplar de *Pisidium chilense* fue colectado desde Chile, Región del Biobío Laguna chica de San Pedro (73° 05' S; 73°10' O), y conservado en alcohol al 95%. Las extracciones de *Pisidium* se realizaron con el ejemplar completo incluyendo la concha, mediante el protocolo CHELEX. Este consiste en 2 µl de Proteinasa K de concentración 10 microgramos/microlitros en agua miliQ y 150 µl de Chelex. Para la posterior amplificación se utilizaron los primers del gen ITS-1 (White et al. 1996). El protocolo de amplificación de Sphaeriidae se realizó a una temperatura inicial de 65 °C la cual decrecerá cada 2°C por ciclo hasta alcanzar una temperatura 50-55°C durante 35 ciclos. Los productos de PCR amplificados, fueron separados en un gel de agarosa al 1% (TAE). Los amplificados se enviaron para su posterior secuenciación a Macrogen (Korea). Las secuencias fueron editadas con CodonCode Aligner v 4.04 Demo.

Reconstrucción filogenética

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL X versión 2.0 (Larkin et al. 2007). Los valores de los parámetros de alineamiento usados fueron los especificados (gap opening penalty=15, gap extensión penalty=6.6 y delay divergent sequences=30). Los gaps en la secuencia fueron tratados como datos faltantes. Luego de la edición y alineamiento se evaluó la calidad de las secuencias para los análisis filogenéticos mediante el test de saturación desarrollado por Xia et al. (2003) e implementado en el programa

DAMBE 4.2 (Xia & Xie 2001). Esta prueba estima un índice de saturación de las secuencias (Iss) y lo compara con un índice de saturación crítico (Iss.c) generado mediante un proceso de aleatorización con un 95% de confianza (Xia 2000; Xia & Lemey 2009; Xia & Xie 2001). Para estimar la probabilidad *a posteriori* de los árboles filogenéticos, se utilizaron Cadenas de Markov Monte Carlo con inferencia Bayesiana (BMCMC). El método BMCMC asegura que los árboles sean muestreados de acuerdo a su probabilidad de ocurrencia utilizando un modelo de evolución de secuencias.

Para considerar explícitamente en el análisis la heterogeneidad en las tasas y patrones de evolución se utilizaron modelos mixtos según lo descrito por Pagel & Meade (2004), basados en el modelo General de Tiempo Reversible (GTR; Rodríguez et al. 1990). Los modelos mixtos permiten detectar diferentes patrones de evolución en las secuencias, sin el conocimiento *a priori* de esos patrones ni necesidad de particionar los datos. El procedimiento Reversible Jump Markov Chain Monte Carlo (RJMCMC) fue utilizado para encontrar el número de matrices GTR del modelo mixto que mejor se ajustó a los datos. Esta aproximación permite explorar diferentes modelos de evolución (en este caso número de matrices GTR) y sus respectivos parámetros, convergiendo en el modelo que mejor se ajusta a los datos en la muestra de árboles (Pagel & Meade 2008). Nueve cadenas independientes fueron generadas, obteniendo aproximadamente 100.000.000 árboles filogenéticos mediante el método BMCMC, muestreando cada 10.000 árboles para asegurar la independencia de los muestreos. Se escogió una de las cadenas que convergieron en la misma zona (*i.e.* tuvieron la misma probabilidad *a posteriori*), quitando los primeros 1000 árboles que estaban fuera de la zona de convergencia. Se remuestreo cada 29 árboles obteniendo una muestra de 269 árboles no autocorrelacionados ($p < 0,0001$). Estos análisis se llevaron a cabo en el software Bayes Phylogenies v 1.0 (Pagel & Meade 2004) y las autocorrelaciones parciales en el software Statistica v 7 (Statsoft Inc. 2001). Las distintas topologías de los diferentes análisis fueron visualizados en Bayes Trees 1.0 (Meade & Pagel 2009) donde se estimó el valor de probabilidad *a posteriori* de los nodos (PP).

Resultados

El test Xia et al. (2003) mostró valores de saturación significativamente menores al Índice de saturación calculado ($Iss=0.5678 < Iss.c=0.7896$, $p = 0.002$), indicando de esta forma,

un bajo grado de saturación en ellas lo que hace que estas sean óptimas para su uso en reconstrucciones filogenéticas.

Los resultados obtenidos a partir del método RJMCMC muestran que el modelo que mejor se ajustó a la evolución de las secuencias y describe las relaciones filogenéticas es 3 GTR+G. La reconstrucción filogenética mostró valores de probabilidad *a posteriori* sobre 80 % para los principales clados estudiados y permite recuperar un clado para Sphaeriinae Nodo 1; PP= 98. Dentro de este clado es posible reconocer dos grupos monofiléticos para *Pisidium* Nodo 2; PP= 99 y *Musculium* Nodo 5; PP=98. Sin embargo, *Sphaerium* es parafilético respecto a *Musculium*, el cual se encuentra anidado dentro de *Sphaerium*. Además destaca la conformación del clado sudamericano, para miembros de *Pisidium* con un valor de PP=98 (Fig.1).

Discusión

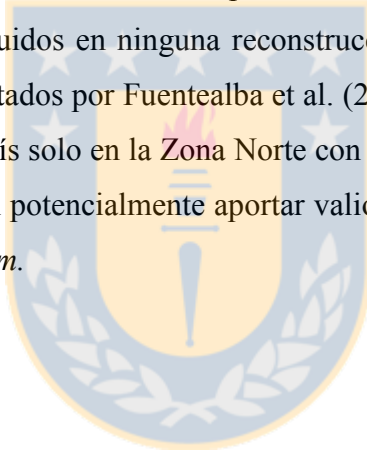
Respecto a la controversial filogenia de Sphaeriidae y sus relaciones intragenericas, la topología obtenida permitió recuperar como grupos monofiléticos a Sphaeriinae. Este patrón es consistente con los patrones topológicos propuestos por varios estudios basados en morfología de la concha y anatomía blanda (Dreher-Mansur & Meier- Brook 2000; Korniusshin & Glaubrecht 2002; Korniusshin & Glaubrecht 2006) y también con estudios basados en caracteres moleculares (Cooley & Ó Foighil 2000; Lee & Ó Foighil 2003). Respecto a la monofilia de los géneros de Sphaeriinae, esta es soportada para *Musculium* y *Pisidium*. No obstante, el género *Sphaerium*, es parafilético en relación a *Musculium*. La monofilia de *Musculium* y la posición parafilética de *Sphaerium*, se recupera en todas las reconstrucciones previamente propuestas (moleculares y morfológicas), al igual que las relaciones filogenéticas existente entre ambos. Se replantea, el efecto de muestreo de taxa para *Sphaerium*, sobre los cuales se reconoce que aun falta por incorporar a estudios filogenéticos (Graf 2013), incluyendo ejemplares nacionales, sin embargo las relaciones al interior de este clado son debilmente sustentadas. Este aspecto es relevante, porque potencialmente podría resolver las inconsistencias filogenéticas, mejorando las estimaciones filogenéticas propuestas (Zwickl & Hillis 2002).

Por otra parte, nuestros resultados recuperan la monofilia de *Pisidium*, existiendo congruencia de este clado, con los obtenidos previamente de las filogenias morfológicas de

de Glaubrecht (2006) y Dreher-Mansur & Meier Brook (2000). Estos resultados contrastan también con las filogenias moleculares propuestas por Cooley & Ó Foighil (2000) basada en el gen 16 S y Lee & Ó Foighil (2002) quienes utilizaron los genes 16 S y COI,

La incorporación de *Pisidium chilense*, permitió recuperar la monofilia de *Pisidium* con una topología altamente sustentada, definiendo la relación filogenética entre las dos especies sudamericanas (i.e. *Pisidium sterkianum* de Argentina, y *Pisidium* sp de Ecuador), conformando además un clado sustentado con el apoyo de metodologías probabilísticas en que se basan los modelos mixtos, para describir la evolución del gen ITS, metodologías que no habían sido incorporados en análisis filogenéticos previos.

Respecto a los miembros de *Sphaerium* grupo parafilético, se plantea la necesidad de aumentar el esfuerzo de muestreo de taxa para incorporar especies sudamericanas, actualmente miembros no incluidos en ninguna reconstrucción filogenética. De acuerdo a los datos distribucionales, aportados por Fuentealba et al. (2010), este género tendría mayor representatividad en nuestro país solo en la Zona Norte con *Sphaerium forbesi* y *Sphaerium lauricochae*, los cuales podrían potencialmente aportar valiosa información para resolver el status filogenético de *Sphaerium*.



Bibliografía

COOLEY LR & D O FOIGHIL (2000). Phylogenetic analysis of the Sphaeriidae (Mollusca: Bivalvia) based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Invertebrate Biology*. 119: 299–308.

DJ. ZWICKL & D M. HILLIS (2002). Increased Taxon Sampling Greatly Reduces Phylogenetic Error. *Syst. Biol.* 51(4):588-598.

DREHER-MANSUR MC & C MEIER-BROOK (2000). Morphology of Eupera Bourguignat, 1854 and Byssanodonta Orbigny, 1846 with contributions to the phylogenetic systematics of Sphaeriidae and Corbiculidae (Bivalvia, Veneroidea). *Arch. Molluskenkunde* 128: 1-59.

FUENTEALBA C, MORRONE J & R FIGUEROA (2010). Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 289-298.

GRAF D (2013). Patterns of Freshwater Bivalve Global Diversity and the State of Phylogenetic Studies on the Unionoidea, Sphaeriidae, and Cyrenidae. *American Malacological Bulletin* 31(1): 135–153.

HEARD WH (1965). Recent Eupera (Pelycepoidea: Sphaeriidae) in the United States. *The American Midland Naturalist*. 74: 309-317.

ITUARTE C (2007). Las especies de *Pisidium* Pfeiffer de Argentina, Bolivia, Chile, Perú y Uruguay (Bivalvia-Sphaeriidae). *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*, n. s. 9 (2): 169-203.

KORNIUSHIN AV (1991). Anatomical aspects of the taxonomy and phylogeny of Pisidionidea (Bivalvia). In: *Proceedings of the Tenth International Malacological Congress (Tubingen 1989)*. *Unitas Malacologica*, Tubingen, pp. 601–605

KORNIUSHIN AV & M GLAUBRECHT (2002). Phylogenetic analysis based on the morphology of viviparous freshwater clams of the family Sphaeriidae (Mollusca, Bivalvia, Veneroidea) *Zoologica Scripta* 31: (5) 415– 459.

KORNIUSHIN A & M GLAUBRECHT (2006). Anatomy and reproduction of viviparous *Pisidium* (Parapisidium) *reticulatum* Kuiper, 1966: implications for the phylogeny of Sphaeriidae (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta). *Org. Divers. Evol.* 6:185–195.

KONIGSMANN, E. (1975): Termini der phylogenetischen Systematik. *Biol. Rundsch.*, 13(2) : 99-115 . Jena.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R , MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM F, VALENTIN H, WALLACE I M, WILM A, LOPEZ R , THOMPSON JD, GIBSON TJ & DG HIGGINS (2007). ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.

LEE T (2004). Morphology and phylogenetic relationships of genera of North American Sphaeriidae (Bivalvia, Veneroidea). *American Malacological Bulletin*. 19(1/2):1-13.

LEE T & D Ó FOIGHIL (2003). Phylogenetic structure of the Sphaeriinae, a global clade of freshwater bivalve molluscs, inferred from nuclear (ITS-1) and mitochondrial (16S) ribosomal gene sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society* 137:245–260.

MEADE A & M PAGEL (2009). Software Bayes trees V.1.3
<http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesTrees.html>

MEIER-BROOK C (1986). The question of subgrouping in *Pisidium* (Eulamellibranchiata: Sphaeriidae). In *Proceedings of the 8th International Malacological Congress*. Budapest: *Unitas Malacologica*.

PAGEL M & A MEADE (2004). A Phylogenetic Mixture Model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data. *Systematic Biology* 53: 571–81.

PAGEL M & A MEADE (2008). Modelling heterotachy in phylogenetic inference by reversible jump Markov chain Monte Carlo. *Philosophical Transactions B Royal Society B* 363:3955-3964.

PARK, JK & D Ó FOIGHIL (2000). Sphaeriid and Corbiculid clams represent separated heterodont bivalve radiations into freshwater environments. *Molecular. Phylogenetic. Evolution.* 14: 75-88.

PARADA E & S PEREDO (2002). Estado actual de la taxonomía de bivalvos dulceacuícolas chilenos: Progresos y conflictos. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 691-701.

PARADA E & S PEREDO (2006). Estado de conocimiento de los bivalvos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70: 82-87.

RODRIGUEZ F, OLIVER J F, MARIN A & JR MEDINA (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *ournal of Theoretical Biology.* 142:485–501.

STATSOFT INC. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 7 www.statsoft.com.

SOBARZO C, JARA-SEGUEL P, PEREDO S & E PARADA (2002). Primer registro de *Musculium argentinum* (d' Orbigny, 1835) (Bivalvia: Sphaeriidae) en aguas continentales chilenas. *Gayana Zoologia* 66(1): 39-43.

WHITE LR, MCPHERON BA & JR STAUFFER (1996). Molecular genetic identification tools for the unionids of French Creek, Pennsylvania. *Malacologia* 38: 181–202.

XIA X (2000). Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers, Boston.

XIA X & Z XIE (2001). DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92:371–373.

XIA X, Z XIE, M SALEMI, L CHEN & Y WANG (2003). An index of substitution saturation and its application *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 1–7.

XIA X & P LEMEY (2009). *A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* Second edition, Cambridge University Press.



Tablas y figuras

Tabla II: Detalles de los taxa incluidos para Sphaeriidae, número de acceso a Genbank y referencias bibliográficas de las publicaciones asociadas a las secuencias utilizadas en el siguiente estudio (*) Grupo externo.

FAMILIA	Nº Acceso Genbank ITS 1	Referencias
SPHAERIIDAE		
SUBFAMILIA		
EUPERIINAE (*)		
<i>Eupera cubensis</i>	AY093501	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Eupera platensis</i>	AY093502	Lee & O'Foighil (2003)
SUBFAMILIA		
SPHAERIINAE		
<i>Musculium argentinum</i>	AY093503	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Musculium japonicum</i>	AY093504	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Musculium lacustre</i>	AY093505 AY093506	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Musculium miyadaii</i>	AY09507	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Musculium partumeium</i>	AY093508	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Musculium securis</i>	AY093509	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Musculium transversum</i>	AY093510	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium sterkianum</i>	AY093512	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium sp.</i>	AY093511	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium adamsi</i>	AY093513-AY093548	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium casertanum</i>	AY093515-AY093514	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium compressum</i>	AY093518	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium fallax</i>	AY093519	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium hallae</i>	AY093520	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium hibernicum</i>	AY093522	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium lilium</i>	AY093523- AY093524	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium nipponense</i>	AY093525	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium nitidum</i>	AY093526	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium personatum</i>	AY093527	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium subtruncatum</i>	AY093528	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium supinum</i>	AY093529	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium variabile</i>	AY093530	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium parvum</i>	AY093531	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium japonicum</i>	AY093532	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium dubium</i>	AY093533	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium lilljeborgi</i>	AY093531	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Pisidium moitessierianum</i>	DQ062591	Steiner (2005)
<i>Pisidium henslowanum</i>	DQ0625832	Steiner (2005)
<i>Pisidium chilense</i>	Indet.	En este estudio
<i>Sphaerium corneum</i>	AY093535 -AY093547	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium fabale</i>	AY093536	Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium nucleus</i>	AY093537 -HM208260 -HM208261- HM208262 -HM208263	Lee & O'Foighil 2003

<i>Sphaerium rhomboideum</i>	AY093538			Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium simile</i>	AY093540			Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium striatinum</i>	AY093541			Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium occidentale</i>	AY093541			Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium novaezelandiae</i>	AY093543			Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium tasmanicum</i>	AY093544			Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium solidum</i>	GU123690			Stunzenas V (2009)
<i>Sphaerium baicalense</i>	AY093534			Lee & O'Foighil (2003)
<i>Sphaerium rivicola</i>	AY093539- HM01467	HM01465-	HM01466	- Lee & O'Foighil (2003)



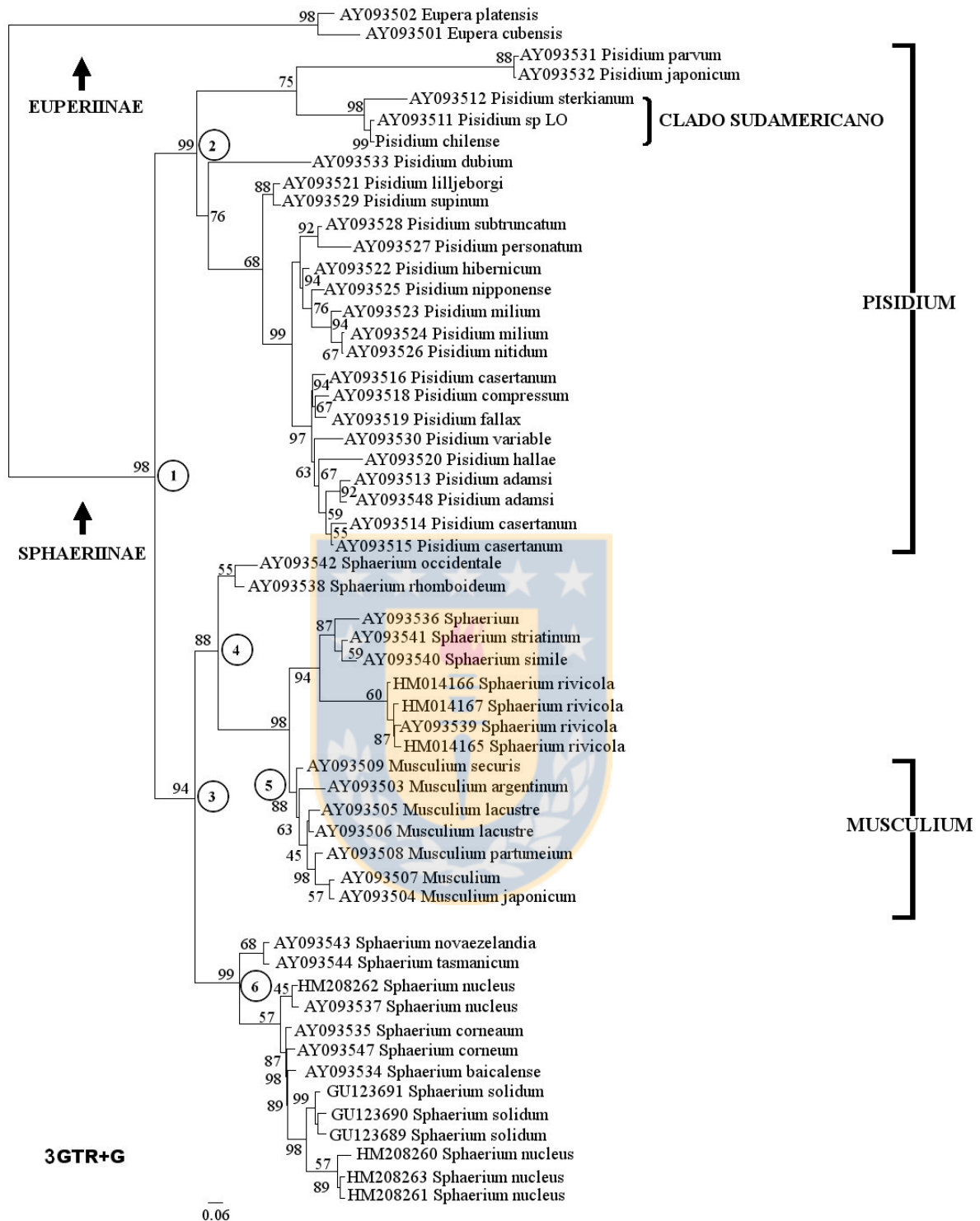


Figura 1. Arbol consenso bayesiano por regla de la mayoría de Sphaeriidae, en los nodos se muestran los valores de probabilidad a *posteriori*. Los círculos corresponden a los nodos de interés. Las flechas las subfamilias de Sphaeriidae.

Reconstrucción filogenética de Hyriidae (Unionoidea: Bivalvia) con énfasis en los grupos del sur de Sudamérica (Hyriinae).

Resumen

Hyriidae es una familia de bivalvos estrictamente dulceacuícolas con distribución en Sudamérica, Australia, Nueva Zelanda, incluyendo las Islas Solomons. Los estudios filogenéticos realizados en Hyriidae son limitados y sus relaciones filogenéticas han sido pobremente abordadas. Actualmente es la única familia de Unionoidea presente en Chile, sin embargo el número de taxa incluidos en reconstrucciones filogenéticas han sido bastante escaso, especialmente a esta latitud. Los objetivos del siguiente trabajo son: reconstruir la filogenia de Hyriidae (Unionoidea), con énfasis en los grupos del sur de Sudamérica, incorporando ejemplares de la especie *Diplodon chilensis* provenientes de la cuenca argentina y chilena. Los resultados basados en Inferencia Bayesiana (IB), utilizando el gen Citocromo Oxidasa I (COI) revelan que: Hyriidae es un grupo monofilético PP= 99. Dentro de este grupo monofilético es posible reconocer tres clados principales: clado 1, representado por especies de Nueva Zelanda, con un valor PP=100; clado 2, representado por especies australianas PP=98; y clado 3 con especies sudamericanas PP=89. Se observa a nivel de subfamilia el sustento de Hyriinae con PP=89, sin embargo Hyridellinae es parafilética.

Introducción

En Chile, estudios relacionados a establecer las relaciones filogenéticas de la familia Hyriidae, son bastante precarios, inclusive para la mayoría de las especies sudamericanas (Fuentelba et al. 2010). Esta familia de bivalvos, en territorio nacional se distribuyen desde los 20° a los 56° S de latitud (Peredo & Parada 2006), con una diversidad que se encuentra representada sólo por el género *Diplodon*, con una única especie validada: *Diplodon chilensis* (Gray 1828).

A nivel mundial, Hyriidae presenta una distribución Gondwánica, encontrándose en Sudamérica, Australia y Nueva Zelanda, incluyendo las Islas Solomons. En el pasado habitaron Norteamérica, en donde actualmente solo es posible encontrar ejemplares fósiles

(Graf & Ó Foighil (2000a), lo que hace de esta familia un interesante sustrato de estudio, enfocados a esclarecer aspectos relacionados con su actual distribución y origen.

Subfamilias de Hyriidae

Históricamente, las primeras propuestas a nivel de subfamilia surgen de los trabajos de Simpson (1914), agrupando a todos los miembros australianos dentro de Hyriinae. Posteriormente Iridale (1934), descarta a esta subfamilia y es el primero que propone asignar a cuatro subfamilias; Hyridellinae, Cucumerunioninae, Velesunioninae, Lortiellinae, basado en la morfología valvar. De esta manera, cada género conocido hasta entonces representó a una subfamilia. Mas tarde, McMichael & Hiscock (1958) valida a estas subfamilias, mediante el análisis de caracteres de la anatomía interna y la morfología de la valva. Posteriormente Hiscock & McMichael (1967), retoman sus estudios y analizan larvas gloquideos, planteando que existe bastante similitud entre Lortiellinae y Velesunioninae. Haas (1969), paralelamente propone recuperar a Hyriinae, basándose en la escultura radial del umbo, reconociendo que sería endémica de Sudamérica, para asignar a todos los miembros sudamericanos. La posterior revisión detallada, de la anatomía interna de miembros de Hyridellinae, realizada por Bonetto et al. (1987), reveló que existe similitud entre todas las subfamilias australasianas mencionadas por McMichael & Hiscock (1958).

Recientemente, enfatizando en los patrones de distribución geográfica, estudios filogenéticos, caracterización del umbo y el grado de similitud entre estas subfamilias, se han propuesto dos grupos: Los australianos que corresponderían a Hyridellinae y los sudamericanos a Hyriinae (Parodiz & Bonetto 1963; Graf & Ó Foighil 2000; Graf & Cummings 2006).

Filogenia de Hyriinae

Reconstrucciones filogenéticas para sustentar y entender las relaciones a nivel de subfamilia han sido bastante escasos. La mayoría de estos trabajos han abordado la filogenia de Hyriidae de forma parcial, considerando un bajo número de miembros de las subfamilias sudamericanas; Walker et al., 2006; Hoeh et al. 2009; Whelan et al. 2011; Graf 2013). El objetivo de estos trabajos estuvieron centrados en resolver hipótesis relacionadas con la monofilia de Hyriidae dentro del orden Unionoida (Bogan & Hoeh 2000; Graf 2000, Graf & Ó Foighil 2000 a,b; Hoeh et al. 2001; Hoeh et al, 2002;Graf 2002; Roe & Hoeh 2003; Graf & Cummings 2006; Walker et al., 2006; Hoeh et al. 2009; Whelan et al. 2011; Graf 2013).

Históricamente, son los autores McMichael & Hiscock (1958), quienes plantean las primeras especulaciones respecto a las relaciones evolutivas dentro de Hyriidae, sugiriendo que los hyriidos Australasianos miembros de Velesunioninae eran primitivos, mientras que Lortiellinae e Hyridellinae habrían derivado de Velesunioninae, y finalmente Cucumerunioninae habría derivado de Hyridellinae. Este escenario evolutivo estuvo, basado fundamentalmente en el grado de complejidad del diafragma que divide las cámaras infra y suprabranquial de las estructuras filtradoras. Posteriormente, otro estudio a nivel embrionario, realizado por Bonetto et al. (1986) al comparar la morfología de las larvas gloquideos de grupos sudamericanos y australianos basándose en las similitud encontrada en los ganchos de fijación, los lleva a concluir que ambos grupos se encuentran relacionados.

Numerosas reconstrucciones filogenéticas posteriores, basadas en morfología y caracteres moleculares y algunos basados evidencia total, han recuperado la monofilia de Hyriidae dentro del Orden Unionoida, sin embargo solo los trabajos realizados por (Graf & Cummings 2000; Graf & Cummings 2006) han propuesto agrupar jerárquicamente bajo el nivel de familia. Graf & Ó foighil (2000), a la subfamilia Hyriinae e Hyridellinae. En su propuesta preliminar utilizando secuencias del gen Citocromo Oxidasa (COI) mitocondrial y ribosomal nuclear (28S), basada en un bajo muestreo taxonómico de ejemplares, recuperan con altos valores de soporte el clado de Hyriinae representado por: *Diplodon chilensis* y *Castalia* sp. Sin embargo Hyridellinae (*Hyridella australis*, *Hyridella depressa*, *Hyridella menziesi* y *Velesunio angasi*), es parafilética respecto a Hyriinae, por lo que

proponen que los hyriidos sudamericanos, se habrían originado por un evento de cladogénesis y estarían relacionados a los Hyriidos Australianos, respecto a nueva Zelanda, los grupos son relictos de colonizadores australianos corroborando de esta forma la propuesta de Bonetto et al. (1986).

Posteriormente Graf & Cummings (2006), utilizando evidencia total que incluyo rasgos morfológicos, ADN ribosomal nuclear (28S) y mitocondrial (COI) y un mayor número de ejemplares, sugieren que únicamente bajo criterios morfológicos existiría un único rasgo que agruparía a todos los miembros de los grupos sudamericanos y sustentaría a Hyriinae, relacionado con la escultura radial del umbo. En este estudio basado en la evidencia total proponen que la subfamilia se encontraría anidada en Hyridellinae, por lo que Hyridellinae sería parafilética respecto a Hyriinae.

Según los planteamientos sistemáticos de McMichael & Hiscock (1958), hay que destacar que la presencia de un diafragma perforado, sería el caracter que permitiría diagnosticar a lo miembros de Hyridellinae, sin embargo, la existencia de un diafragma imperforado descrito en *Hyridella menziesi*, ejemplares descritos para Nueva Zelanda no permite validar esta propuesta, determinando que este miembro de Hyridellinae se encuentre más relacionado con grupos sudamericanos que con los propios miembros de Hyridellinae.

La causa potencial de esta inconsistencia en la sistemática y las relaciones internas de Hyriidae, sería la falta de muchos taxones de América del Sur y Nueva Zelanda en la reconstrucción filogenética (Walter et al. 2001), a pesar que para muchos las relaciones filogenéticas planteadas parecen estar resueltas Graf (2013).

En el presente estudio, se evalúa la hipótesis de monofilia Hyriinae y las controversiales relaciones filogenéticas con los miembros australianos y neozelandeses, mediante la incorporación de nuevas secuencias de una especie endémica de América del Sur (i.e. *Diplodon chilensis*).

Materiales y métodos

Obtención y extracción de secuencias de ADN de Hyriidae

Para reconstruir la filogenia de la familia Hyriidae, se incluyó secuencias de aproximadamente 624 pb del gen Citocromo Oxidasa I (COI) de 20 especies disponibles en Genbank, más tres secuencias de la especie endémica a Sudamérica *Diplodon chilensis* de individuos de Chile y Argentina. El grupo interno estuvo conformado por 21 hyriidos, de los géneros *Lortiella*, *Alathyria Velesunio*, *Cucumerunio*, *Hyridella*, *Diplodon*, *Castalia*, *Triplodon* e *Echyriddella*. El grupo externo estuvo conformado por un representante de la familia Unionidae (*Gonidea angulata*) y otro de Margaritiferidae (*Margaritifera margaritifera*).

Detalles de los taxa incluidos, número de acceso a Genbank y referencias bibliográficas, son mostrados en la Tabla I. Las secuencias pertenecientes a *Diplodon chilensis* se obtuvieron de un individuo Chile (Región del BíoBío, Laguna chica de San Pedro: 73° 05' S; 73° 10' O) y dos de Argentina (Neuquén, Río Negro: 39° 07'S; 68° 35'O). Todos los ejemplares fueron conservados en alcohol al 95%. Las extracciones se realizaron utilizando tejido del manto, siguiendo las instrucciones del proveedor del Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega). Para la posterior amplificación se utilizaron los primers para Citocromo Oxidasa (COI), LCO1490 y HCO2198 de Folmer et al. (1994). El protocolo de amplificación se realizó con 35 ciclos. Cada ciclo con una fase de denaturación a 94°C por 2 min 30 s, annealing a 43 °C por 45 s, una fase elongación 72 °C por 45 s, y extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR amplificados, fueron separados en un gel de agarosa al 1% (TAE). Los amplificados fueron enviados para su posterior secuenciación a Macrogen (Korea). Las secuencias fueron editadas con CodonCode Aligner v 4.04 Demo.

Reconstrucción filogenética

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL X versión 2.0 (Larkin et al. 2007). Los valores de los parámetros de alineamiento usados fueron los especificados (gap opening penalty=15, gap extensión penalty=6.6 y delay divergent sequences=30). Los gaps en la secuencia fueron tratados como datos faltantes. Luego de la edición y alineamiento se evaluó la calidad de las secuencias para los análisis filogenéticos mediante el test de saturación desarrollado por Xia et al. (2003) e implementado en el programa DAMBE 4.2 (Xia & Xie 2001). Esta prueba estima un índice de saturación de las secuencias (Iss) y lo compara con un índice de saturación crítico (Iss.c) generado mediante un proceso de aleatorización con un 95% de confianza (Xia 2000; Xia & Lemey 2009; Xia & Xie 2001). Para estimar la probabilidad *a posteriori* de los árboles filogenéticos, se utilizaron Cadenas de Markov Monte Carlo con inferencia bayesiana (BMCMC). El método BMCMC asegura que los árboles sean muestreados de acuerdo a su probabilidad de ocurrencia utilizando un modelo de evolución de secuencias. Para considerar en el análisis la heterogeneidad en las tasas y patrones de evolución se utilizaron modelos mixtos según lo descrito por Pagel & Meade (2004), basados en el modelo General de Tiempo Reversible (GTR; Rodríguez et al. 1990). Los modelos mixtos permiten detectar diferentes patrones de evolución en las secuencias, sin el conocimiento *a priori* de esos patrones ni necesidad de particionar los datos. El procedimiento Reversible Jump Markov Chain Monte Carlo (RJMCMC) fue utilizado para encontrar el número de matrices GTR del modelo mixto que mejor se ajustó a los datos. Esta aproximación permite explorar diferentes modelos de evolución (en este caso número de matrices GTR) y sus respectivos parámetros, convergiendo en el modelo que mejor se ajusta a los datos en la muestra de árboles (Pagel & Meade 2008). Nueve cadenas independientes fueron utilizadas, generando aproximadamente 100.000.000 árboles filogenéticos mediante el método BMCMC, muestreando cada 10.000 árboles para asegurar la independencia de los muestreos. Se escogió una de las cadenas que convergieron en la misma zona (*i.e.* tuvieron la misma probabilidad *a posteriori*), quitando los primeros 1000 árboles que estaban fuera de la zona de convergencia de la cadena de Markov. Finalmente, se remuestreó cada 30 árboles para obtener una muestra final de 270 árboles filogenéticos que no mostraron autocorrelación

significativa ($p = 0.006$). Estos análisis se llevaron a cabo en el software Bayes Phylogenies v 1.0 (Pagel & Meade 2004) y las autocorrelaciones parciales en el software Statistica v 7 (Statsoft Inc. 2001). Las distintas topologías de los diferentes análisis, fueron visualizados en Bayes Trees v 1.0 (Meade & Pagel 2009) donde se estimó el valor de probabilidad a posteriori de los nodos (PP).

Resultados

El test Xia et al. (2003) mostró valores de saturación significativamente menores al Índice de saturación calculado ($I_{ss}=0.2134 < I_{ss.c}= 0.4970$, $p < 0.0004$), indicando de esta forma, un bajo grado de saturación en ellas lo que hace que estas sean optimas para su uso en reconstrucciones filogenéticas.

Los resultados obtenidos a partir del método RJMCMC muestran que el modelo que mejor se ajustó a la evolución de las secuencias y describe las relaciones filogenéticas es 5 GTR+G. El árbol de consenso bayesiano permitió recuperar un grupo monofilético para Hyriidae con un valor de Nodo: 1 PP= 99. Dentro de este grupo monofilético es posible reconocer tres clados principales: clado 1, representado por especies de Nueva Zelanda, Nodo: 2 con un valor PP=100; clado 2, representado por especies australianas, Nodo: 5 PP=9 y clado 3, con especies sudamericanas, PP=89. Se observa a nivel de subfamilia el sustento de Hyriinae con PP=89, sin embargo Hyridellinae es parafilética.

Discusión

Las relaciones filogenéticas obtenidas, no permiten recuperar la monofilia de las subfamilias como fueron propuestas originalmente por Iridale 1934; McMichael & Hiscock (1958), lo que puede ser atribuido a la falta de muestreo de algunos taxa australianos como a la claridad en la diagnosis taxonómica de los grupos de Nueva Zelanda. La topología del árbol, especialmente del clado de los grupos sudamericanos, es consistente con la propuesta de Haas (1969), quien propuso recuperar a Hyriinae para este grupo de Sudamérica. Respecto a los planteamientos de Bonetto et al. (1986), se refuerzan las relaciones preliminares basadas en la morfología larval, propuestas para los miembros de Hyriinae e

Hyridellinae. De acuerdo a los resultados Hyriinae esta relacionado a los miembros australianos.

A pesar de que nuestro estudio, sugiere la conformación de dos clados altamente sustentados para asignar a los grupos de Sudamérica, Australia y Nueva Zelanda, consistentes además con el patrón geográfico, Hyridellinae resultó ser parafilética en relación al clado de Hyriinae, lo cual fue previamente documentado en el trabajo de Graf & O' Foighil (2000b). Estos autores señalan, que la incorporación de un mayor muestreo con rigurosidad taxonómica permitiría resolver el status de Hyridellinae e incluso, sustentar la propuesta a nivel de subfamilia dentro de Hyriidae. No obstante, los grupos sudamericanos son monofiléticos, destacándose al interior de este clado dos subclados, que separa a dos grupos, de acuerdo a las subregiones geográficas propuestas por (Graf & Cummings 2006): *Castalia stevensi* y *Triplodon corrugatus* para la subregión Amazonas-Orinoco y *Diplodon chilensis* y *Diplodon deceptus*, para la subregión Patagónica.

Incompatibilidades, problemáticas genéricas la falta de estudios.

Esta situación de incompatibilidad genérica de miembros de la subfamilia Hyridellinae fue replanteada por Walker et al. (2013), estos autores afirman que el estudio genético realizado por Graf & O' Foighil (2000a), indica una clara separación dentro del género *Hyridella* entre dos subgéneros: *Echyridella* e *Hyridella*. Fenwick & Marshall (2006). De acuerdo a este antecedente, optan por promover a *Echyridella* como género, generalizando a todas las especies de Nueva Zelanda bajo esta asignación de esta forma *H. (E.) menziesi* se convirtió posteriormente en *E. menziesii*. Esto sugiere que los miembros de Hyridellinae de Nueva Zelanda, podrían corresponder a una subfamilia diferente al clado australiano y se podría redistribuir a este grupo dentro del género *Echyridella* y asignarlo tentativamente a la subfamilia “Echyridellinae”, que es lo que nuestros datos sustentan. Sin embargo, la fauna de moluscos dulceacuícolas en Nueva Zelanda, ha sido escasamente estudiada, desde el punto de vista taxonómico, por esta razón aún persisten las dudas principalmente a nivel genérico y algunas especies están presentes además, simultáneamente en Australia y Nueva Zelanda, además a esta situación se suma el efecto del muestreo taxonómico, influyendo resolución filogenético (Graf & O' Foighil 2000).

Cabe señalar, que McMichael (1957), en su trabajo de revisión de los grupos australianos, hace mención a la similitud morfológica existente entre ejemplares de Nueva Zelanda y Australia, además destaca la falta de exactitud para la asignación del género *Hyridella*, donde la similitud fenotípica puede ser atribuida en gran medida a las condiciones locales del ambiente (Walker et al. 2001). Al respecto, en un estudio filogeográfico realizado por Baker et al. (2004) con dos especies simpátricas australianas (i.e. *Alathyria jacksoni* y *Velesunio ambiguus*), demostraron que los ejemplares del género *Velesunio* no formaban un grupo monofilético y que *Alathyria jacksoni* representaba un clado anidado dentro de los velesunidos. Según Baker et al. (2004), ambas especies son incluso crípticas, sin embargo este autor reconoce que la información proporcionada de estas relaciones filogenéticas, no son concordantes con la morfología, por lo que deduce que los caracteres conquiológicos, que definen a ambas especies son ecológicamente plásticos y determinados por las condiciones del ambiente. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, esta afirmación es sustentada, los velesunidos forman un clado junto a *Alathyria* y *Lortiella*.

La inclusión de tres ejemplares de *Diplodon chilensis*, provenientes de Chile y Argentina a la filogenia de Hyriidae, permitió recuperar el clado de los Hyriinae como monofilético, agrupando a *Diplodon chilensis* dentro de un clado y separando en dos subclados a los grupos chilenos y argentinos. Si bien, actualmente estos clados de la subregión Patagónica se encuentran separados geográficamente por los Andes, existe evidencia que confirma que ambas poblaciones estuvieron conectadas en el pasado, desde el Jurásico (Martinez & Figueiras 1993).

Finalmente, se concluye que a pesar de que Hyriinae es un grupo monofilético con buen sustento estadístico, la asignación bajo el nivel de familia no es apoyada por nuestros resultados. Es necesario realizar estudios filogeográficos y taxonómicos que permitan evaluar grupos locales con distribución fragmentada y comprender los aspectos microevolutivos involucrados en la biodiversidad de hyriidos australasianos.

Bibliografía

BAKER AM, F SHELDON, J SOMERVILLE, K F WALKER & JM HUGHES (2004). Mitochondrial DNA phylogenetic structuring suggests similarity between two morphologically plástic genera of Austraian freshwater mussels (Unionida: Hyriidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:902-912.

BONETTO A, MP TASSARA & A RUMMI (1987). Australis n. subgen. of *Diplodon Spix* (Bivalvia, Unionacea) and its possible relationships with Australian Hyriidae. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* 57: 55-61.

BOGAN AE & WR HOEH (2000). On becoming cemented: evolutionary relationships among the genera in the freshwater bivalve family Etheriidae (Bivalvia: Unionoida). In: Harper EM, Taylor JD, Crame JA, eds. *The evolutionary biology of the bivalvia*. Geological Society of London Special Publication 177. London: Geological Society 159–168.

FENWICK M. C & BA MARSHALL (2006). A new species of *Echyridella* from New Zealand, and recognition of *Echyridella lucasi* (Suter, 1905) (Mollusca: Bivalvia: Hyriidae). *Molluscan Research* 26: 69–76.

FOLMER O, M BLACK, W HOEH, R LUTZ & R VRIJENHOEK (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-297.

FUENTEALBA C, J MORRONE & R FIGUEROA (2010). Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 289-298.

GRAF DL (2000). The Etherioidea revisited: A phylogenetic analysis of hyriid relationships (Mollusca: Bivalvia: Paleoheterodonta: Unionoida). *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan* 729: 1–21.

GRAF D L & D Ó FOIGHIL (2000a). The evolution of brooding characters among the freshwater pearly mussels (Bivalvia: Unioniodes) of North America. *Journal of Molluscan Studies* 66: 157–170.

GRAF DL & D Ó FOIGHIL (2000b). Molecular phylogenetic analysis of 28S rDNA supports a Gondwanan origin for Australasian Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionoida). *Vie Milieu* 50:245–254.

GRAF D L (2002). Molecular phylogenetic analysis of two problematic freshwater mussel genera (Unio and Gonidea) and a reevaluation of the classification of Nearctic Unionidae (Bivalvia: Palaeoheterodonta: Unionoida). *Journal of Molluscan Studies* 68: 65–71

GRAF DL & KS CUMMINGS (2006). Palaeoheterodont Diversity (Mollusca: Trigonioida + Unionoida): what we know and what we wish we knew about freshwater mussel evolution. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148: 343-394.

GRAF D (2013). Patterns of Freshwater Bivalve Global Diversity and the State of Phylogenetic Studies on the Unionoida, Sphaeriidae, and Cyrenidae. *American Malacological Bulletin* 31(1): 135–153.

HOEH WR, AE BOGAN, WH HEARD (2001). A phylogenetic perspective on the evolution of morphological and reproductive characteristics in the Unionoida. In: Bauer G, Wächtler K, eds. *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida*. *Ecological Studies* 145. Berlin: Springer-Verlag, 257–280.

HOEH WR, AE BOGAN, KS CUMMINGS & GUTTMAN (2002). Evolutionary relationships among the higher taxa of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida):

Inferences of phylogeny and character evolution from analyses of DNA sequence data. *Malacological Review* 31/32: 117–141.

HOEH WR, A E BOGAN, WH HEARD & EG CHAPMAN (2009). Palaeoheterodont phylogeny, character evolution and phylogenetic classification: A reflection on methods of analysis. *Malacologia* 51: 307–317.

LARKIN MA, G BLACKSHIELDS, NP BROWN, R CHENNA, PA MCGETTIGAN, F MCWILLIAM, H VALENTIN, IM WALLACE, A WILM, R LOPEZ, JD THOMPSON, TJ GIBSON & DG HIGGINS (2007). ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

MARTINEZ S & A FIGUEIRAS & JS DA SILVA (1993). A new unionoid (Mollusca, Bivalvia) from the Tacuarembó Formation (Upper Triassic±Upper Jurassic), Uruguay. *Journal of Paleontology* 67: 962-965.

MEADE A & M PAGEL (2009). Software Bayes trees V.1.3 <http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesTrees.html>

MCMICHAEL DF (1957). A review of the fossil freshwater mussels (Mollusca, Pelecypoda) of the Australian Region. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 81:222-244.

MCMICHAEL DF & ID HISCOCK (1958). A monograph of freshwater mussels (Mollusca: Pelecypoda) of the Australian region Australian. *Journal of Marine and Freshwater Research* 9:372–508.

MEADE A & M PAGEL (2009). Software Bayes trees V.1.3 <http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesTrees.html>

PARADA E & S PEREDO (2006). Estado del conocimiento de los bivalvos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70(1): 82-87

PARODIZ JJ & AA BONETTO (1963). Taxonomy and zoogeographic of the South American Naiades (Pelecypoda: of the South American Naiades (Pelecypoda:Unionacea and Mutelacea). *Malacologia* 1:179–214.

PAGEL M & A MEADE (2004). A Phylogenetic Mixture Model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data. *Systematic Biology* 53: 571–81.

PAGEL M & A MEADE (2008). Modelling heterotachy in phylogenetic inference by reversible jump Markov chain Monte Carlo. *Philosophical Transactions B Royal Society B* 363:3955-3964.

ROE KJ & WR HOEH (2003). Systematics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida). In: Lydeard C, Lindberg DR, eds. *Molecular systematics and phylogeography of mollusks*. Smithsonian Series in Comparative Evolutionary Biology. Washington: Smithsonian Books 91–122.

RODRIGUEZ F, JF OLIVER, A MARIN & R MEDINA (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485–501.

STATSOFT INC. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 7 www.statsoft.com.

WALKER K F H A JONES & M W KLUNZINGER (2013). Bivalves in a bottleneck: taxonomy, phylogeography and conservation of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) in Australasia *Hydrobiologia* (3): 1-19

WALKER KF, M BYRNE, CW HICKEY & DC ROPER (2001). Freshwater Mussels (Hyriidae) of Australasia In: Bauer G & K Watchler (eds). Ecology and Evolution Freshwater Mussels Unionoida: 4-31, Springer Verlag, Berlin.

WALKER J M, J.P CUROLE, DE WADE, E G CHAPMAN, AE BOGAN, G T WATTER & WR HOEH (2006). Taxonomic distribution and phylogenetic utility of gender-associated mitochondrial genomes in the Unionoida (Bivalvia). Malacologia 48: 265–282.

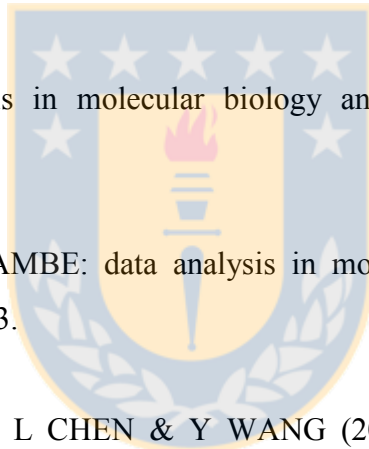
WHELAN NV, AJ GENEVA & D L GRAF (2011). Molecular phylogenetic analysis of tropical freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) resolves the position of Coelatura and supports a monophyletic Unionidae. Molecular Phylogenetics and Evolution 61: 504–514.

XIA X (2000). Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers, Boston.

XIA X & Z XIE (2001). DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. Journal of Heredity 92:371–373.

XIA X, Z XIE, M SALEMI, L CHEN & Y WANG (2003). An index of substitution saturation and its application Molecular Phylogenetics and Evolution 26: 1–7.

XIA X & P LEMEY (2009). A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing Second edition, Cambridge University Press.



Tablas y figuras

Tabla I: Detalles de los taxa incluidos para Hyriidae, número de acceso a Genbank y referencias bibliográficas y referencias bibliográficas de las publicaciones asociadas a las secuencias utilizadas en el siguiente estudio (*) Grupo externo.

FAMILIA HYRIIDAE	Nº Acceso Genbank CO I	Referencias
SUBFAMILIA HYRIINAE		
<i>Diplodon deceptus</i>	AF231744	Hoeh & Bogan (2000)
<i>Diplodon chilensis</i>	DQ191410	Graf & Cummings (2000)
<i>Diplodon chilensis</i>		Este estudio
<i>Diplodon chilensis</i>		Este estudio
<i>Diplodon chielnsis</i>		Este estudio
<i>Castalia stevensi</i>	AF231736	Hoeh & Bogan (2000)
<i>Triplodon corrugatus</i>	JN243890	Whelan et al. (2011)
SUBFAMILIA CUCUMERUNIONINAE		
<i>Cucumerunio novaehollandiae</i>	JN612835	Whelan et al. (2011)
Subfamilia Lortiellinae		
<i>Lortiella sp.</i>	AF231746	Graf & Cummings (2000)
SUBFAMILIA VELESUNIONINAE		
<i>Alathyria jacksoni</i>	AY386969	Baker et al.,(2004)
<i>Velesunio ambigua</i>	AF305371	Graf & O'Foighil (2000)
<i>Velesunio angasi</i>	AF231743	Hoeh & Bogan (2000)
SUBFAMILIA HYRIDELLINAE		
<i>Hyridella depressa</i>	AF305368	Graf & O'Foighil (2000)
<i>Hyridella australis</i>	AF305367	Graf & O'Foighil (2000)
<i>Hyridella menziesi</i>	AF305370	Hoeh & Bogan (2000)
<i>Hyridella drapeta</i>	JN612834	Whelan et al. (2011)
<i>Echyridella sp.</i>	HQ912966	Marshall et al. (2010)
<i>Echyridella onekaka</i>	HQ912969	Marshall et al. (2010)
FAMILIA UNIONIDAE (*)		
<i>Fusconaia flava</i>	AF231733	Graf & Cummings (2000)
<i>Margaritifera margaritifera</i>	U56847	Graf & Cummings (2006)

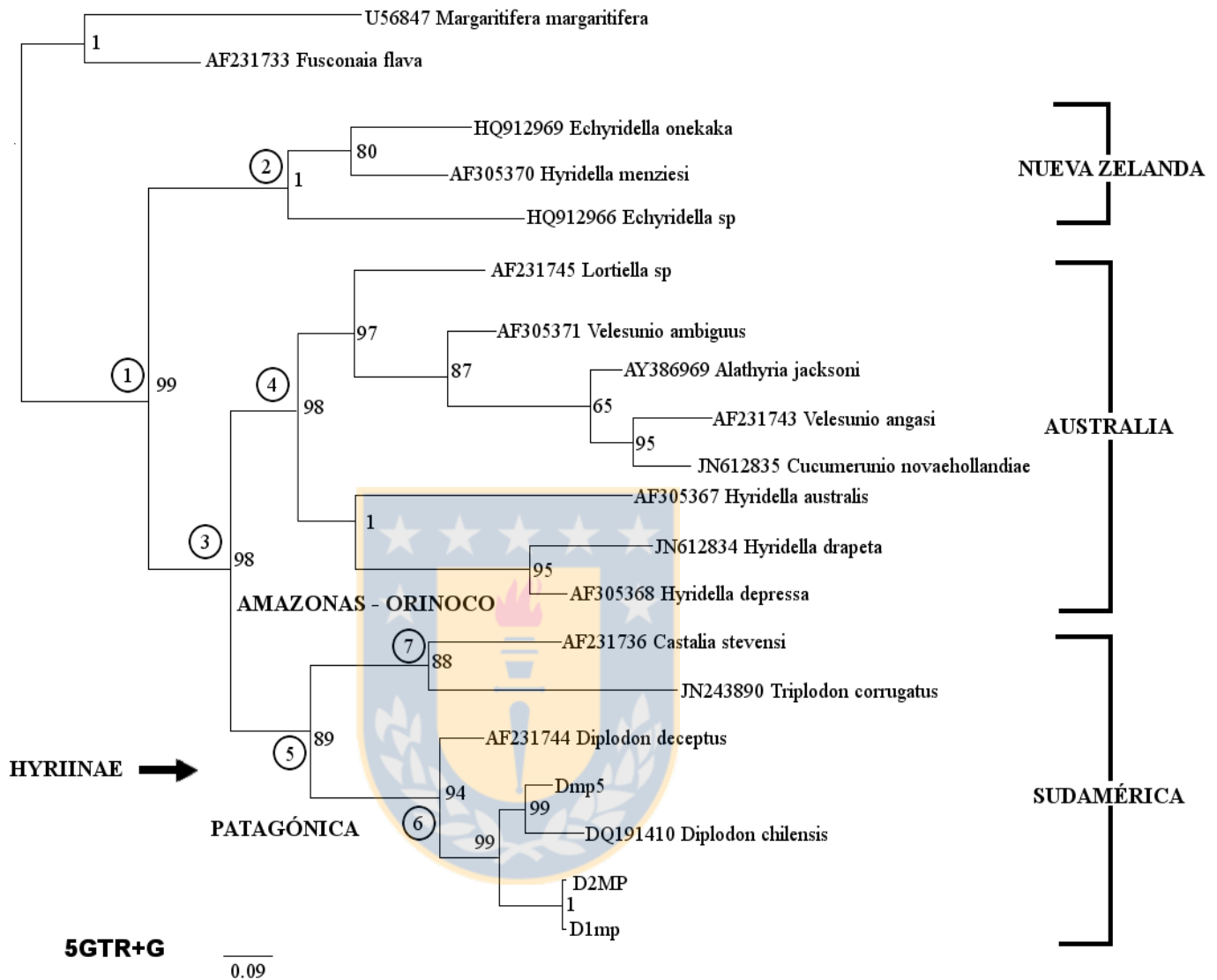


Figura 1: Árbol consenso bayesiano por regla de la mayoría de, sobre los nodos los valores de probabilidad a *posteriori*. Los círculos muestran los nodos de interés. Las flechas representan las subfamilias de Hyriidae.

Origen y dispersión de los Hyriidae sudamericanos

Resumen

Existen variadas hipótesis que intentan explicar el origen y dispersión histórica de los hyriidos Sudamericanos (origen Norteamericano con dispersión unidireccional norte-sur, Origen Australiano con dispersión vía Antártica o mediada por aves, origen Gondwánico con diversificación in situ). Sin embargo, a la fecha no se han contrastado estas hipótesis utilizando un marco probabilístico que permita sustentar una hipótesis particular. En el presente estudio evaluamos estas hipótesis utilizando aproximaciones bayesianas filogenéticas y del método comparativo filogenético, como metodologías complementarias para definir: La probabilidad de la topología del árbol filogenético, el área ancestral común más probable y la probabilidad de rutas históricas de dispersión de los Hyriidos del Sur de Sudamérica. Complementariamente, el tiempo de divergencia se estimó utilizando un reloj molecular calibrado con fósiles. La filogenia de Hyriidae, mostró dos clados: Nueva Zelanda y el complejo "Australia, América del Sur". Los resultados indicaron que el ancestro común de Hyriidae, habitó Nueva Zelanda, mientras que el ancestro común más reciente del complejo Sudamerica-Australia, habitó en Australia. De acuerdo, a la calibración del reloj molecular, los hyriidos sudamericanos se originaron hace unos 95.25 Ma. Esta nueva evidencia, sugiere que el mecanismo causal de los clados geográficos fue vicariante y consecuencia de la formación de una cuenca marina profunda llamada Rocas Verdes, un evento que desconectó, la península antártica hace aproximadamente 155-93 Ma, provocando el aislamiento definitivo de los hyriidos sudamericanos.

Palabras clave: Reconstrucción Ancestral, biogeografía, BMCMC, rutas de dispersión, Hyriidae, macroevolución, reloj molecular, Cuenca Rocas Verdes.

Introducción

Desde el punto de vista biogeográfico y histórico, los actuales patrones de distribución de organismos que habitan el Hemisferio Sur y presentan distribución disyunta, se han explicado fundamentalmente por eventos vicariantes (disyunciones continentales) (San Martín & Ronquist 2004). Según esta hipótesis los patrones de distribución que hoy observamos en los diferentes taxones son el reflejo de la división de áreas antiguas (biota ancestral) y no de eventos de dispersión (Brundin 1966; Raven & Axelrod 1974; Brown & Lomolino 1998). Tradicionalmente, la dispersión a grandes distancias a través de barreras oceánicas en el hemisferio sur ha sido desestimada y descartada como modelo explicativo en una primera instancia (San Martín & Ronquist 2004). De hecho la mayor parte de los integrantes de la biota considerada gondwánica, la cual se originó por fragmentación continental y posterior aislamiento (i.e. marsupiales, ratites), son reconocidos pobres dispersores incapaces de cruzar barreras (oceánicas) de tal magnitud (Croizat et al. 1974; Craw 1982). No obstante, la evidencia aportada en los últimos años ha permitido tener una visión conciliadora.

Reconstrucciones paleogeográficas recientes han demostrado que la biogeografía histórica del Hemisferio Sur no se reduce a una simple secuencia de eventos vicariantes (San Martín & Ronquist 2004). Por otra parte, reconstrucciones filogenéticas y estimaciones moleculares han demostrado que la mayoría de los grupos clásicos gondwánicos y aquellos considerados pobres dispersores, combinan un patrón ancestral vicariante con eventos recientes de dispersión (Waters et al. 2000 b; Cooper et al. 2001). Grupos como: galaxiidos, cicadas y baobabs originados después de un evento de fragmentación, han ampliado su distribución mediante la dispersión a grandes distancias, inclusive a través de barreras oceánicas (Baum et al. 1998; Waters et al. 2000a; Buckley et al. 2002).

Enigmáticas interpretaciones sobre el origen y dispersión de Hyriidae, basadas en el registro fósil y su distribución actual

La familia Hyriidae parece seguir este patrón, habita estrictamente ecosistemas dulceacuícolas y se distribuye en el Hemisferio Sur, con registros actuales en Australia, Nueva Guinea, Nueva Zelanda, Islas Solomon y América del Sur Baker et al. (2004); Walker et al. (2001); Fig. 1), presentando ciclo larval parásito obligado de peces (González 1998). Se encuentra compuesta de 93 especies, las cuales representan el 10.9% de la diversidad del orden Unionoida. (McMichael & Hiscock 1958, Walker et al. 2001; Graf & Cummings 2007). Basados en los patrones de distribución geográfica de Hyriidae y la similitud entre las subfamilias es posible encontrar dos grupos: Los australasianos que corresponderían a Hyridellinae, y los sudamericanos o los Hyriinae (Parodiz & Bonetto 1963; Graf & Ó Foighil 2000; Graf & Cummings 2006). Esta asignación aun es compleja, para Hyridellinae. La cual es parafilética (Graf 20013). Otro aspecto que ha surgido a partir de estudios filogenéticos es la interpretación respecto al origen y distribución de la familia Hyriidae en Sudamérica, el cual es complejo de abordar por los patrones de distribución fragmentado, tanto por la evidencia fósil y actual (Parada & Peredo 2002). Particularmente en Chile, sólo existiría una especie identificada como *Diplodon chilensis*, distribuida en la totalidad del territorio nacional (Fuentesalba et al. 2010), cuyas relaciones históricas con el resto de los Hyriinae es desconocida.

Las interrogantes que aun se mantienen al interior de los Hyriidae han sido abordadas parcialmente, probablemente por la limitada información molecular disponible lo que dificulta el análisis filogenético, a diferencia de lo que ocurre con las otras familias de Unionoida (Parada & Peredo 2002). Parodiz (1969), basado en el género *Diplodon*, señaló que para Hyriinae sólo existirían fósiles del Terciario en Sudamérica, en cambio los registros de Norteamérica serían del Triásico (Henderson 1935). Derivado de estas observaciones propone seis rutas de migración activa que habrían dado origen al poblamiento de esta fauna en Sudamérica entre el Cretácico Superior y el Terciario (Parodiz 1969; Fig. 1):- 1. Una vía de migración durante Cretácico Superior-Paleoceno (moluscos continentales y primeros mamíferos) Norteamérica, 2. Dos vías de migración en

el Mioceno Superior-Plioceno, 3-5 Dispersión secundaria (líneas finas), y 6. Dispersión secundaria en el Terciario medio; B)- Probable dispersión a través de la Antártica durante Terciario

Posteriormente, Parodiz (1977) plantea que: “Los hyriidos Sudamericanos tendrían un origen Norteamericano. Esta fauna habría migrado vía forosis hacia el sur a principios del Terciario, simultáneamente con los mamíferos norteamericanos que poblaron Sudamérica, la que tuvo una orientación única, dado que elementos del Sur nunca alcanzaron Norteamérica”. Esta migración a Sudamérica, habría sido facilitada por la formación del Istmo de America Central (3 Ma), en lo que antiguamente fue una península sudamericana (Kirby et al. 2008). Basado en la secuencia temporal de los registros conocidos para América, estos bivalvos habrían colonizado desde Norteamérica los ríos Sudamericanos y posteriormente expandido su rango al resto del continente (Parada et al. 1989). No obstante, la familia se encuentra extinta en Norteamérica, desconociéndose completamente la existencia de fósiles en América Central. Los últimos registros datan a *Diplodon* en Sudamérica a partir del Jurásico (Martinez & Figueiras 1991), muy anterior a la formación del Istmo de América, lo que no permite sustentar la hipótesis de colonización reciente en el Plio-Pleistoceno.

Alternativamente McMichel & Hiscock (1958) y Parodiz & Bonetto (1963), propusieron otro escenario basados en aspectos biogeográficos y caracteres morfológicos, donde la familia tendría un origen Asiático. Australia habría sido invadida desde Sudeste asiático por una forma ancestral y posteriormente desde aquí habrían comenzado a expandir su rango al resto de los continentes incluyendo Sudamérica. La invasión habría incluido Nueva Guinea, Islas Solomons y Nueva Caledonia que forman parte del Archipiélago de Dembros (Fig.1). De acuerdo a McMichael & Hiscock (1958), basados en estudios filogenéticos y el grado de complejidad del diafragma que divide las cámaras infra y suprabranquial, los hyriidos Australasianos miembros de Velesunioninae son primitivos, Lortiellinae e Hyridellinae habrían derivado de Velesunioninae, y finalmente Cucumerunioninae habría derivado de Hyridellinae. Estos planteamientos son apoyados por el registro fósil de un ejemplar de velesunido (*Prohyria eyrensis*) del Triásico en Australia (McMichel 1957). Mientras que

McMichel & Iredale (1959), propusieron una vía de dispersión alternativa para explicar la llegada de los hyriidos a Sudamérica a través un puente terrestre vía Antártica apoyándose en la teoría de la unión continental (Wegener 1929). De hecho, se han descrito fósiles de Hyriidae desde el Triásico-Jurásico en la Antártica (Camacho 1957; Morton 1984) y en Australia desde el Triásico (McMichel 1957; McMichel & Hiscock 1958).

Por otro lado, McMichel (1957), considerando el grado de similitud anatómica encontrada en la mayoría de los hyriidos tanto de Nueva Zelanda como Australia, sugirió que la fauna de Nueva Zelanda se habría originado en el Terciario hace aproximadamente 65 Ma, derivada de la transferencia de stocks australianos a través del mar de Tasmania. De esta forma, descartó la conexión continental a través de un puente terrestre entre Australia y Nueva Zelanda, proponiendo que esta dispersión fue mediada por aves, no obstante, no explica el origen y similitud encontrada con los ejemplares sudamericanos. En este sentido, evidencia respecto a las relaciones de los hyriidos australianos y sudamericanos fue sugerida posteriormente por Bonetto et al. (1986) basados en el grado de similitud observado en las larvas gloquideos. Recientemente, Graf & Foiguil (2000) usando reconstrucciones filogenéticas a nivel de familia utilizando el gen ADNr 28S, proponen un origen del tipo Gondwánico para Hyriidae, donde los hyriidos australianos estarían relacionados con los de Nueva Zelanda y éstos a su vez con los de Sudamérica. Sin embargo, en este modelo, los hyriidos de Nueva Zelanda no se habrían originado por eventos de colonización, si no que pertenecerían a relictos de una distribución continua con Australia.

La situación de Sphaeriidae en Sudamérica es distinta, en contraste a que los grupos norteamericanos han sido mayormente estudiados a nivel taxonómico y filogenético, la disponibilidad de secuencias de especies sudamericanas no supera 2 %, lo que impide cualquier tentativa de reconstruir una ruta migratoria al Sur de Sudamérica. Sin embargo, en términos muy generales se ha planteado que, en el pasado Sphaeriidae tenían una amplia distribución, conociéndose el fósil mas antiguo de *Sphaerium sp.* desde el Cretasico (Keen

& Dance 1969) en Eurasia. En este contexto, explicar el origen y evolución de los Sphaeriidae sudamericanos, es aún una problemática abierta.

El complejo de hipótesis planteadas para explicar el origen y distribución de los hyriidos actuales han sido propuestas sin una base probabilística explícita, por lo cual es complejo intentar diferenciar cual de ellas presenta mayor sustento. En este sentido, nuestro estudio evalúa estas hipótesis utilizando aproximaciones bayesianas filogenéticas (Huelsenbeck et al. 2001; Pagel & Meade 2004) y del método comparativo filogenético (Harvey & Pagel 1991; Pagel 1999; Ronquist 2004), como metodologías complementarias para definir: La probabilidad de la topología del árbol filogenético, el área ancestral común más probable y la probabilidad de rutas históricas de dispersión de los Hyriidos del Sur de Sudamérica.



Materiales y método

Secuencias de ADN y especies de Hyriidae

Para evaluar la hipótesis filogenética en relación al origen de la familia Hyriidae en Sudamérica, se incluyeron secuencias del gen Citocromo Oxidasa I (COI) de ejemplares de Sudamérica, Nueva Zelanda y Australia disponibles en Genbank. Un total de 20 especies fueron incluidas en este estudio, con un tamaño de secuencia de 624 pb. El grupo interno estuvo conformado por dieciocho hyriidos, ocho provenientes desde Australia, subfamilia Lortiellinae (*Lortiella* sp.), subfamilia Velesunioninae (*Velesunio angasi*, *V. ambigua* y *Alathyria Jacksoni*) y subfamilia Hyridellinae (*Hyridella australis*, *H. depressa* e *H. drapeta*) y Cucumeruunioninae (*Cucumerunio novaehollandiae*). Desde Nueva Zelanda se incluyeron tres especies de la subfamilia Hyridellinae (*H. menziesi*, *Echyridella "aucklandica"* y *Echyridella onekaka*), y de Sudamérica cuatro especies de Hyriinae (*Castalia stevensi*, *Diplodon deceptus*, *D. chilensis* y *Triplodon corrugatus*). Los grupos externos estuvieron conformado por un representante de la familia Unionidae (*Gonidea angulata*) y otro de Margaritiferidae (*Margaritifera margaritifera*) de Norteamérica y Europa, respectivamente. Detalles de los taxa incluidos, número de acceso a Genbank y referencias bibliográficas, son mostradas en la Tabla I. Las secuencias del único representante de la familia Hyriidae en Chile (*Diplodon chilensis*) se obtuvieron de tres individuos: uno de la Región BíoBío en Chile (San Pedro de la Paz, 73° 05' S; 73°10' O) y dos de Neuquén en su rango de distribución en Argentina (Río Negro, 39° 07'S; 68° 35'O). Los ejemplares de *D. chilensis* fueron conservados en alcohol al 70% y las extracciones se realizaron utilizando tejido del manto con un Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la posterior amplificación se utilizaron los primers para Citocromo Oxidasa (COI) LCO1490 y HCO2198 de Folmer et al. (1994). El protocolo de amplificación se realizó con 35 ciclos, con una fase de denaturación a 94°C por 2 min 30 s, annealing a 43 °C por 45 s, una fase elongación 72 °C por 45 s y de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR amplificados, fueron separados en un gel de agarosa al 1% (TAE). Los amplificados fueron

enviados para su posterior secuenciación a Macrogen (Korea), y las secuencias fueron editadas con CodonCode Aligner v 4.04 Demo (CodonCode, Dedham, USA).

Reconstrucción filogenética

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL X versión 2.0 (Larkin et al. 2007). Los valores de los parámetros de alineamiento usados fueron los especificados (gap opening penalty=15, gap extensión penalty=6.6 y delay divergent sequences=30). Los gaps en la secuencia fueron tratados como datos faltantes. Luego de la edición y alineamiento se evaluó la calidad de las secuencias para los análisis filogenéticos mediante el test de saturación desarrollado por Xia et al. (2003) e implementado en el programa DAMBE 4.2 (Xia & Xie 2001). Esta prueba estima un índice de saturación de las secuencias (Iss) y lo compara con un índice de saturación crítico (Iss.c) generado mediante un proceso de aleatorización con un 95% de confianza (Xia 2000; Xia & Lemey 2009; Xia & Xie 2001). Para estimar la probabilidad *a posteriori* de los árboles filogenéticos, se utilizaron Cadenas de Markov Monte Carlo con inferencia bayesiana (BMCMC). El método BMCMC asegura que los árboles sean muestreados de acuerdo a su probabilidad de ocurrencia utilizando un modelo de evolución de secuencias. Para considerar en el análisis la heterogeneidad en las tasas y patrones de evolución se utilizaron modelos mixtos según lo descrito por Pagel & Meade (2004), basados en el modelo General de Tiempo Reversible (GTR; Rodríguez et al. 1990). Los modelos mixtos permiten detectar diferentes patrones de evolución en las secuencias, sin el conocimiento *a priori* de esos patrones ni necesidad de particionar los datos. El procedimiento Reversible Jump Markov Chain Monte Carlo (RJMCMC) fue utilizado para encontrar el número de matrices GTR del modelo mixto que mejor se ajustó a los datos. Esta aproximación permite explorar diferentes modelos de evolución (en este caso número de matrices GTR) y sus respectivos parámetros, convergiendo en el modelo que mejor se ajusta a los datos en la muestra de árboles (Pagel & Meade 2008). Nueve cadenas independientes fueron utilizadas, generando aproximadamente 100.000.000 árboles filogenéticos mediante el método BMCMC, muestreando cada 10.000 árboles para asegurar la independencia de los muestreos. Se escogió una de las cadenas que convergieron en la misma zona (*i.e.* tuvieron la misma

probabilidad *a posteriori*), quitando los primeros 1000 árboles que estaban fuera de la zona de convergencia de la cadena de Markov. Finalmente, se remuestreó cada 30 árboles para obtener una muestra final de 270 árboles filogenéticos que no mostraron autocorrelación significativa ($p = 0.006$). Estos análisis se llevaron a cabo en el software Bayes Phylogenies v 1.0 (Pagel & Meade 2004) y las autocorrelaciones parciales en el software Statistica v 7 (Statsoft Inc. 2001). Las distintas topologías de los diferentes análisis, fueron visualizados en Bayes Trees v 1.0 (Meade & Pagel 2009) donde se estimó el valor de probabilidad *a posteriori* de los nodos (PP).

Áreas ancestrales y rutas de dispersión

La distribución geográfica del ancestro común de Hyriidae se estimó mediante inferencia Bayesiana. Para esto se categorizaron las actuales áreas de distribución en tres estados como potenciales áreas ancestrales: 1. Sudamérica, 2. Nueva Zelanda y 3. Australia. Se utilizó el modelo de Markov de Tiempo Continuo para caracteres discretos (Pagel 1994; Lewis, 2001), para obtener la probabilidad de las áreas ancestrales de la familia Hyriidae y la probabilidad de las tasas de transición entre las áreas de distribución a través de la historia. Este modelo permite que un rasgo cambie en cualquier momento de estado en pequeños intervalos de tiempo (Pagel 1994), permitiendo así reconstruir los estados ancestrales en cada nodo y estimar las tasas de transición general en el árbol como una medida de la probabilidad de dispersión histórica. Estos análisis se llevaron a cabo en el programa BayesTraits v 2.0 (Pagel & Meade 2013).

Reloj Molecular y estimación tiempos de divergencia

Los tiempos de divergencia se estimaron mediante metodologías bayesianas implementadas en BEAST v1.7.1 (Drummond & Rambaut 2007). Se asumió el modelo de evolución molecular GTR+ Γ basado en cuatro tipos de tasas y la siguiente información *a priori*: 1) El modelo de Yule con un árbol inicial considerando la topología obtenida con BayesPhylogenies v1.1; 2) el fósil para la calibración que estima un tiempo de origen de 226.9 Ma para el origen del grupo interno considerando el fósil más antiguo conocido

(McMichel, 1957), para las estimaciones de tiempo se asumió una distribución normal con una edad media de 220.9 ± 25 Ma (desviación estándar).. Los análisis fueron realizados bajo cuatro modelos de calibración del reloj molecular propuesto por Drummond et al. (2006), y Drummond & Suchard (2010): 1. Reloj estricto; 2. Reloj relajado con distribución exponencial; 3. Reloj relajado con distribución logarítmica normal; y 4. Reloj local aleatorio. El ajuste de estos modelos a los datos se evaluó con el Factor de Bayes incluido en el software Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond 2007).

Resultados

El test Xia et al. (2003) mostró valores de saturación significativamente menores al Índice de saturación calculado ($I_{ss}=0.2134 < I_{ss.c}= 0.4970$, $p < 0.0004$), indicando de esta forma, un bajo grado de saturación en ellas lo que hace que estas sean optimas para su uso en reconstrucciones filogenéticas.

Los resultados obtenidos a partir del método RJMCMC muestran que el modelo que mejor se ajustó a la evolución de las secuencias y describe las relaciones filogenéticas es 5 GTR+G El árbol de consenso bayesiano permitió recuperar un grupo monofilético para Hyriidae Nodo: 1 con un valor de PP= 99. Dentro de este grupo monofilético es posible reconocer tres clados monofiléticos principales: clado 1, representado por especies de Nueva Zelanda, Nodo: 2 con un valor PP=100; clado 2; Nodo: 4, representado por especies australianas, PP=98; y clado 3, con especies sudamericanas, Nodo: 5, PP=89. Se observa a nivel de subfamilia el sustento de Hyriinae con PP=89, sin embargo Hyridellinae es parafilética (Fig.2).

Áreas ancestrales y rutas de dispersión

Los análisis bayesianos muestran que el ancestro común más reciente (MRCA) de la familia Hyriidae presenta una alta probabilidad (PP=0.69231) de haber habitado Nueva Zelanda (Fig.3, Nodo: 2), mientras los hyriidos sudamericanos tendrían un MRCA dentro de Sudamérica (Nodo:4; PP= 0.8211), el cual se habría originado de un ancestro

australiano (Nodo: 3; PP= 0.75), al igual que los Hyriidos de Australia. Las tasas de transición más frecuentes dan sustento a estos valores de probabilidades, en donde los mayores valores revelan que la ruta mas factible es desde Nueva Zelanda a Australia ($q_{23}= 2$) y desde Australia a Sudamérica ($q_{31}= 0,48$), siendo poco frecuentes los cambios en otras direcciones (Fig. 4).



Discusión

Nuestros resultados, basados en los patrones distribucionales actuales de Hyriidae, el registro fósil, la evidencia filogenética, la distribución del más reciente común ancestro y las probabilidades de las rutas de dispersión históricas, sustentan que la hipótesis de origen gondwánico (i.e. origen por fragmentación del supercontinente), no permiten explicar totalmente el origen de Hyriidae al Sur de Sudamérica. En primer lugar los análisis filogenéticos y del método comparativo sugieren un evento de colonización a partir de un ancestro común australiano, que amplió su rango durante el Triásico-Jurásico, planteamiento sustentado de acuerdo a la evidencia fósil de Hyriidae conocida desde Australia, Sudamérica y Antártica (Camacho 1957; McMichel 1957; McMichel & Hiscock 1958; Morton 1984; Martínez & Figueiras 1991; Martínez et al. 1993).

De acuerdo a las tasas de transición $q(xy)$, obtenidas para cada una de las posibles rutas migratorias, se plantea además que los Hyriidos en Australia, se habrían expandido hacia Sudamérica antes de los clásicos eventos vicariantes de Gondwana, con una alta probabilidad como lo muestran los resultados de un ancestro común (MRCA), originado en Nueva Zelanda, que dispersó a Australia y posteriormente desde aquí a Sudamérica.

Respecto a la existencia de fósiles de Hyriidae en Norteamérica cuya datación corresponde al Triásico ~ 220 Ma, no permite asumir hipotéticamente un amplio rango distribucional, puesto que se desconocen registros fósiles en el resto de los continentes, pero tampoco es posible descartarla. Además, no existen ejemplares actuales, por lo que no tenemos evidencia suficiente para contrastar la hipótesis de un origen y diversificación de una posible ruta desde Norteamérica.

La colonización de los hyriidos habría sido facilitada por dos procesos: La conexión continental vía puente antártico (San Martín & Ronquist 2004) y la capacidad de dispersión propia de esta familia de bivalvos dulceacuícolas vía dispersores como peces durante la fase larval parasítica (Parada et al. 1989). En el caso de los hyriidos al sur de Sudamérica, existe preferencia por peces galáxidos (Viozzi & Brugni 2001), los cuales se caracterizan por desplazarse corriente arriba cubriendo grandes distancias (Ruiz 1993) y además presentar distribución gondwanica (Mcdowall 1970). Distribución que para los biogeógrafos vicariantes se daría gracias a la Antártica como un centro evolutivo, pero los

dispersalistas se habría dado mediada por la Antártica como un eslabón (stepping stone) entre Sudamérica, Antártica y Nueva Zelanda (Ashworth & Cantrill 2004). Este puente asociado a las condiciones subtropicales y templadas de entonces, habría favorecido el intercambio faunístico (Francis et al. 2008). Posteriormente el enfriamiento climático progresivo, el aumento de los casquetes polares asociado con la apertura del Paso de Drake y la corriente Circumpolar causaron la declinación de la biota que formaba parte de esta masa continental (Ashworth & Preece 2003; De Conto & Pollard 2003; Huber et al. 2004, Barker & Thomas 2004; Livermore et al. 2004; Hill 2009). Sin embargo, estos eventos asociados con la fragmentación gondwanica no permiten explicar el origen y aislamiento de los actuales hyriidos sudamericanos, ya que los eventos clásicos de fragmentación al sur del Gondwana que involucraron la desconexión de Sudamérica y Australia vía puente Antártico son posteriores al origen que estima el reloj molecular para este grupo (95.25 Ma) y comienzan a gestarse aproximadamente 52-50 Ma (Woodburne & Case 1996). Sin embargo, existe otro evento geológico que separó a Sudamérica y la Península Antártica (Dalziel et al. 1974; Suárez & Pettigrew 1976; Suárez 1977; Dalziel 1981), conocido como la cuenca marina de Rocas Verdes, esta comenzó su extensión en el Jurásico Superior-Cretácico Inferior aproximadamente 155 (Ma), cerrándose a los 93 (Ma) a lo largo de un centro de expansión tipo dorsal meso-oceánica (De Wit & Stern 1976, 1981; Stern et al. 1976).

Según Leppe (2009), la cuenca Rocas Verdes habría actuado como una importante barrera para dispersión, provocando que en cada masa continental los organismos evolucionaran de forma distinta, la evidencia paleobiogeográfica sugiere además que durante este periodo comienzan a gestarse especies endémicas en la Antártica y las islas Shetland del Sur, lo que explicaría el punto de partida de los hyriidos sudamericanos. Posteriormente ambas masas de tierra se vuelven a conectar, en base a los antecedentes que se conocen de la flora, las especies de uno y otro lado entran en contacto causando una mezcla de elementos florísticos. Esta reconexión, de acuerdo al autor da origen a los primeros robles en la Antártica y grupos faunísticos como los marsupiales que migran desde Sudamérica y colonizan Australia, así como ñandúes, avestruces, moas gigantes y kiwis (aves no voladoras), las cuales habrían evolucionado desde Antártica, poblando Sudáfrica, Oceanía y Sudamérica. Por otra parte, basados en las tasas de transición estimadas (Fig. 4) se descarta

un origen común desde Australia para los Hyriidae y una colonización *a posteriori* para Nueva Zelanda, como fue sugerido por Graf & Foiguil (2000), ya que estas son las transiciones menos probables en la historia de los hiridos. De esta forma Nueva Zelanda como área ancestral habría acumulado un alto grado de endemismo a través del tiempo.

Finalmente, nuestros resultados permiten sostener la hipótesis de que el origen y diversificación de los Hyriidos a Sudamérica dependió en gran medida de la relación ecológica-histórica del grupo con los ambientes de los respectivos continentes que colonizaron y las consecuencias de un evento vicariante, conciliando de este modo visiones dispersalistas y vicariantes. En este sentido destacamos la utilidad de las aproximaciones bayesianas filogenéticas y del método comparativo filogenético para abordar hipótesis evolutivas complejas que permiten aclarar mecanismos causales relacionados con la ancestría, migración y diversificación de los hyriidos en Sudamérica.



Bibliografía

ASHWORTH A C & RC PREECE (2003). The first freshwater molluscs from Antarctica. *Journal of Molluscan Studies* 69: 89–92 .

ASHWORTH AC & DJ CANTRILL (2004). Neogene vegetation of the Meyer Desert Formation (Sirius Group) Transantarctic Mountains Antarctica. *Palaeogeography, Palaeoclimatology Palaeoecology* 213: 65– 82.

BAKER AM, F SHELDON, J SOMERVILLE J, KF WALKER & JM HUGHES (2004). Mitochondrial DNA phylogenetic structuring suggests similarity between two morphologically plastic genera of Australian freshwater mussels (Unionoida: Hyriidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 902–912.

BARKER PF & THOMAS E (2004). Origin, signature and palaeoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth—Science Reviews* 66:143—162.

BAUM DA, RL SMALL & JF WENDEL (1998) Biogeography and floral evolution of baobabs (*Adansonia*, Bombaceae) as inferred from multiple data sets. *Systematic Biology* 47:181–207.

BONETTO A, MP TASSARA & A RUMMI (1986). Australis n. subgen. of *Diplodon Spix* (Bivalvia, Unionacea) and its possible relationships with Australian Hyriidae. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* 57: 55-61.

BROWN JH & MV LAMOLINO (1998). *Biogeography*, 2 nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachussets.

BRUNDIN L (1966). Transantarctic relationships and their significance, as evidenced by chironomid midges with a monograph of the subfamilias Podonominae and Aphroteniinae

and the austral Heptagynae. *Kungliga Svenska Vetenskaps Akademien Handlingar*, 11, 1–472.

BUCKLEY TR, P ARENSBURGER, C SIMON & GK CHAMBERS (2002). Combined data, Bayesian phylogenetics and the origin of the New Zealand cicada genera. *Systematic Biology* 51:4–18.

CAMACHO HH (1957). Observaciones geológicas y petrográficas en Bahía Esperanza Puerto Paraíso e Islas Shetland del Sur y Melchior 2: Observaciones en Bahía Esperanza. *Publicación Instituto Antártico Argentino* 4: 25-30.

COOPER A, C LALUEZA-FOX, S ANDERSON, A RAMBAUT, J AUSTIN & R WARD (2001). Complete mitochondrial genome sequences of two extinct moas clarify ratite evolution. *Nature* 409: 704–707.

CRAW R (1982). Phylogenetics, areas, geology and the biogeography of Croizat: A radical view. *Systematic Zoology* 31: 304–316.

CROIZAT L, LG NELSON & DE ROSEN (1974). Centres of origin and related concepts. *Systematic Zoology* 23: 265–287.

DALZIEL IWD, MJ WIT & KF PALMER(1974). Fossil marginal basin in the southern Andes. *Nature* Vol. 264, No 5587 615-619.

DALZIEL IWD (1981). Back-arc extension in the southern Andes: A review and critical reappraisal. *Royal Society of London Philosophical Transactions, series A* 300, 319-335.

DECONTO RM & D POLLARD (2003). Rapid Cenozoic glaciation of Antarctica induced by declining atmospheric CO₂. *Nature* 421: 245—249.

de WIT MJ & CR STERN (1976). A model for ocean floor metamorphism, seismic layering and magnetism. *Nature* 264: 615-619.

de WIT MJ & CR STERN(1981). Variation in the degree of crustal extension during formation of a back-arc basin. *Tectonophysics* 72: 229-260.

DRUMMOND AJ & A RAMBAUT.(2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7:214.

FRANCIS JE, A ASHWORTH, DJ CANTRILL, JA CRAME, J HOWE, R STEPHENS,AM TOSOLINI & V THORN (2008). 100 million years of Antarctic climate evolution: evidence from fossil plants. 19_28 in: *Antarctica, A Keystone in a Changing World. Proceedings of the 10th International Symposium on Antarctic Earth Sciences.* Washington, DC. The National Academies Press.

FOLMER O, BLACK M, HOEH W, LUTZ R & R VRIJENHOEK (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:294-297.

GONZÁLEZ MR (1998). Larvas de *Diplodon chilensis chilensis* (Gray, 1828): ¿De vida libre o parásitas de peces? Seminario para optar al Título de Biólogo Marino. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.

GRAF DL & D Ó FOIGHIL (2000). Molecular phylogenetic analysis of 28S rDNA supports a Gondwanan origin for Australasian Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionoida). *Vie Milieu* 50:245–254.

GRAF DL & K CUMMINGS (2006). Palaeoheterodont diversity (Mollusca:Trigonioida + Unionoida): what we know and what we wish we knew about freshwater mussel evolution. *Zoological Journal of the Linnean Society* 148:343–394.

GRAF DL & K CUMMINGS (2007). Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Molluscan Studies* 73:291–314.

HARVEY PH & MD PAGEL (1991). *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford Univ. Press, USA.

HENDERSON J (1935). Fossil non-marine Mollusca of North America. *Geological Society of America Special Paper* 3-313 pp.

HILL DE (2009). Salticidae of the Antarctic land bridge. *Peckhamia* 1-14.

HINE PM (1978). Distribution of some parasites of freshwater eels in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 12: 179-187.

HINOJOSA L & C VILLAGRÁN (1997). Historias de los bosques del sur de Sudamérica, I: Antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 225-239.

HUBER M, H BRINKHUIS, CE STICKLEY, K DÖÖS, A SLUIJS, J WARNAAR, SA SCHELLENBERG & GL WILLIAMS (2004). Eocene circulation of the Southern Ocean: Was Antarctica kept warm by subtropical waters?. *Paleoceanography* 19: 1—12.

HUELSENBECK JP, F RONQUIST, R NIELSEN & JP BOLLBACK (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310-2314.

KEEN M & P DANCE (1969). Family Pisidiidae. In: Moore RC, ed. *Treatise on invertebrate paleontology*. Part N, Vol. 2, Mollusca 6, Bivalvia. Lawrence, KA: Geological Society of America and University of Kansas Press, N669–N670.

KIRBY MX, SJ DOUGLAS & JM BRUCE (2008). Lower Miocene Stratigraphy along the Panama Canal and Its Bearing on the Central American Peninsula. PLoS ONE 3(7): e2791. doi:10.1371/journal.pone.0002791.

LARKIN MA, G BLACKSHIELDS, NP BROWN, R CHENNA, PA MCGETTIGAN, F MCWILLIAM, H VALENTIN, IM WALLACE, A WILM, R LOPEZ , JD THOMPSON, TJ GIBSON & DG HIGGINS (2007). ClustalW and ClustalX version 2.0. Bioinformatics 23: 2947-2948.

LEPPE M (2009). Tras las pistas de un evento vicariante de mas de 100 millones de años. Boletín Antártico Chileno 28 (2): 23-25.

LIVERMORE R, G EAGLES, P MORRIS & A MALDONADO (2004). Shackleton Fracture Zone: No barrier to early circumpolar ocean circulation. Geology 32 (9): 797—800.

MARTINEZ S & A FIGUEIRAS (1991). Two new species of Mesozoic Diplodon (Bivalvia: Hyriidae: Hyriinae) from Uruguay. Walkerana 5:217-223.

MARTINEZ S & A FIGUEIRAS & JS DA SILVA (1993). A new unionoid (Mollusca, Bivalvia) from the Tacuarembó Formation (Upper Triassic±Upper Jurassic), Uruguay. Journal of Paleontology 67: 962-965.

MCDOWALL R (1970). The galaxiid of South America. Zoological Journal of the Linnean Society, 50:33-73.

MCMICHAEL DF (1957). A review of the fossil freshwater mussels (Mollusca, Pelecypoda) of the Australian Region. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales, 81:222-244.

MCMICHAEL DF & ID HISCOCK (1958). A monograph of freshwater mussels (Mollusca: Pelecypoda) of the Australian region Australian. Journal of Marine and Freshwater Research 9:372–508.

MCMICHAEL DF & T IREDALE (1959). The land and freshwater Mollusca of Australia In: Keast A., Crocker RL & CS Christian (eds) Biogeography and Ecology in Australia. Dr, W. Junk. The Hague 224-245 pp.

MORTON LS (1984). *Diplodon baqueroensis* nov. sp. (Unionidae-Pelecypoda) de la formación Baquero (Cretácico Medio) de Santa Cruz, Argentina. Facena 5: 89-96.

PAGEL M (1994). Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. Proceedings of the Royal Society London B 255: 37-45.

PAGEL M & A MEADE (2004). A Phylogenetic Mixture Model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data. Systematic Biology 53:571–581.

PAGEL M & A MEADE (2008). Modelling heterotachy in phylogenetic inference by reversible jump Markov chain Monte Carlo. Philosophical Transactions B Royal Society B 363: 3955-3964.

PAGEL M & A MEADE (2013). BayesTraits, version 2.0. Website <http://www.evolution.rdg.ac.uk>

PARADA E, S PEREDO, G LARA & F ANTONIN (1989). Contribución al conocimiento de los hyriidae chilenos. Boletín de la Sociedad de Biología Concepción 60:173-182.

PARADA E & S PEREDO (2002). Estado actual de la taxonomía de bivalvos dulceacuícolas chilenos: progresos y conflictos. Revista Chilena de Historia Natural 75: 691-701.

PARODIZ JJ & AA BONETTO (1963). Taxonomy and zoogeographic relationships of the South American Naiades (Pelecypoda: Unionacea and Mutelacea). *Malacologia* 1:179-214.

PARODIZ J (1969). The Tertiary Non-Marine of South America. *Annals Carnegie Museum* 40: 5-76.

PARODIZ J (1977). Mollusca: In *Biota Acuática de Sudamérica Austral* San Diego State University, San Diego, Ca.S.H. Hulbert, ed. 320.

RAVEN PH & DI AXELROD (1972). Plate tectonics and Australasian paleobiogeography. *Science* 176: 1379–1386.

RODRIGUEZ F, J F OLIVER , A MARIN & R MEDINA (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485–501.

RONQUIST F (2004). Bayesian inference of character evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 475-481.

RUIZ V (1993) Ictiofauna del río Andalien (Concepción, Chile). *Gayana*, 57(2):109-278.

SAN MARTIN I & F RONQUIST (2004). Southern Hemisphere Biogeography Inferred by Event-Based Models: Plant versus Animal Patterns. *Systematic Biology*, 53(2): 216–243.

STATSOFT INC. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 7 www.statsoft.com.

STERN CR, MJ DE-WIT & LR LAWRENCE (1976). Igneous and metamorphic processes associated with the formation of Chilean ophiolites and their implications for ocean floor metamorphism, seismic layering, and magnetism. *Journal of Geophysical Research* 81, (23): 4370-4380.

SUÁREZ, M.& PETTIGREW TH (1976) An Upper Mesozoic island-arc-back-arc system in the southern Andes and South Georgia. *Geological Magazine*, 113, 305-328.

SUÁREZ M (1977). Aspectos geoquímicos del Complejo Ofiolítico Tortuga en la Cordillera Patagónica del sur de Chile. *Revista Geológica de Chile* 4:15-53.

VIOZZI G & N BRUGNI (2001). Relación parasitaria y nuevos registros de gloquideos de *Diplodon chilensis* (Unionacea: Hyriidae) en peces de la Patagonia argentina. *Neotrópica* 47: 3-12.

WALKER KF, BYRNE M, HICKEY CW & DC ROPER (2001). Freshwater Mussels (Hyriidae) of Australasia In: Bauer G & K Watchler (eds). *Ecology and Evolution Freshwater Mussels Unionoida*: 4-31, Springer Verlag, Berlin.

WATERS JM, LH DIJKSTRA & GP WALLIS (2000a). Biogeography of a southern hemisphere freshwater fish: How important is marine dispersal?. *Molecular Ecology* 9: 1815–1821.

WATERS JM, JA LOPEZ & GP WALLIS (2000 b). Molecular phylogenetics and biogeography of galaxiid fishes (Osteichthyes:Galaxiidae): Dispersal, vicariance, and the position of *Lepidogalaxias salamandroides*. *Systematic Biology* 49: 777–795.

WEGENER A (1929). *The origin of continents and oceans*. Dover Publications. EEUU, Nueva York.

XIA X (2000). *Data analysis in molecular biology and evolution*. Kluwer Academic Publishers, Boston.

XIA X & XIE Z (2001). DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92, 371–373.

XIA X, XIE Z , SALEMI M, CHEN L & Y WANG (2003). An index of substitution saturation and its application *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 1–7

XIA X & P LEMEY (2009). *A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* Second edition, Cambridge University Press.



Tablas y figuras

Tabla I: Detalles de los taxa incluidos para Hyriidae, número de acceso a Genbank y referencias bibliográficas de las secuencias (*) Grupo externo.

FAMILIA HYRIIDAE	N° Acceso Genbank CO I	Referencias
SUBFAMILIA HYRIINAE		
<i>Diplodon deceptus</i>	AF231744	Hoeh & Bogan (2000)
<i>Diplodon chilensis</i>	DQ191410	Graf & Cummings (2000)
<i>Diplodon chilensis</i>	-	Este estudio
<i>Diplodon chilensis</i>	-	Este estudio
<i>Diplodon chielnsis</i>	-	Este estudio
<i>Castalia stevensi</i>	AF231736	Hoeh & Bogan (2000)
<i>Triplodon corrugatus</i>	JN243890	Whelan et al. (2011)
SUBFAMILIA CUCUMERUNIONINAE		
<i>Cucumerunio novaehollandiae</i>	JN612835	Whelan et al. (2011)
Subfamilia Lortiellinae		
<i>Lortiella sp.</i>	AF231746	Graf & Cummings (2000)
SUBFAMILIA VELESUNIONINAE		
<i>Alathyria jacksoni</i>	AY386969	Baker et al., (2004)
<i>Velesunio ambigua</i>	AF305371	Graf & O'Foighil (2000)
<i>Velesunio angasi</i>	AF231743	Hoeh & Bogan (2000)
SUBFAMILIA HYRIDELLINAE		
<i>Hyridella depressa</i>	AF305368	Graf & O'Foighil (2000)
<i>Hyridella australis</i>	AF305367	Graf & O'Foighil (2000)
<i>Hyridella menziesi</i>	AF305370	Hoeh & Bogan (2000)
<i>Hyridella_drapeta</i>	JN612834	Whelan et al. (2011)
<i>Echyridella sp.</i>	HQ912966	Marshall et al. (2010)
<i>Echyridella onekaka</i>	HQ912969	Marshall et al. (2010)
FAMILIA UNIONIDAE (*)		
<i>Fusconaia flava</i>	AF231733	Graf & Cummings (2000)
<i>Margaritifera margaritifera</i>	U56847	Graf & Cummings (2006)

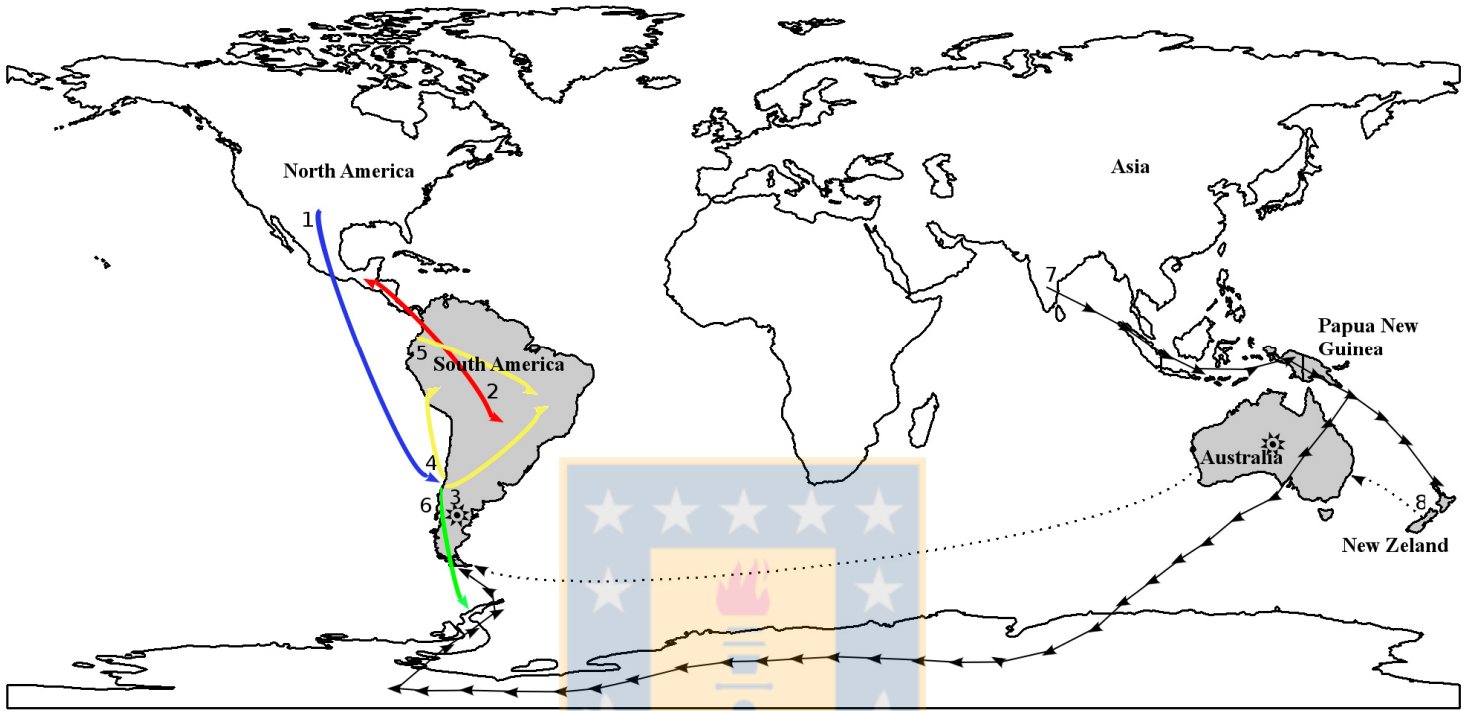


Figura 1: Patrón actual de la distribución de la familia Hyriidae (gris), y rutas históricas de migración propuestas: A) principales vías de migración hipótesis de Parodiz (1969) en Flechas continuas (1-6) con 1 (flecha azul) una vía de migración durante Cretácico Superior-Paleoceno (moluscos y primeros mamíferos), 2. (flecha roja) dos vías de migración en el Mioceno Superior-Plioceno, 3-5 (flechas amarillas), dispersión secundaria, y 6.(flecha verde) dispersión secundaria en el Terciario medio; B)- Probable dispersión a través de la Antártica durante Terciario según hipótesis de McMichel (1957) (Flechas cortadas 7.); C) ruta de colonización y diversificación basada en las tasas de transición obtenidas en este estudio (Flechas punteadas 8.).

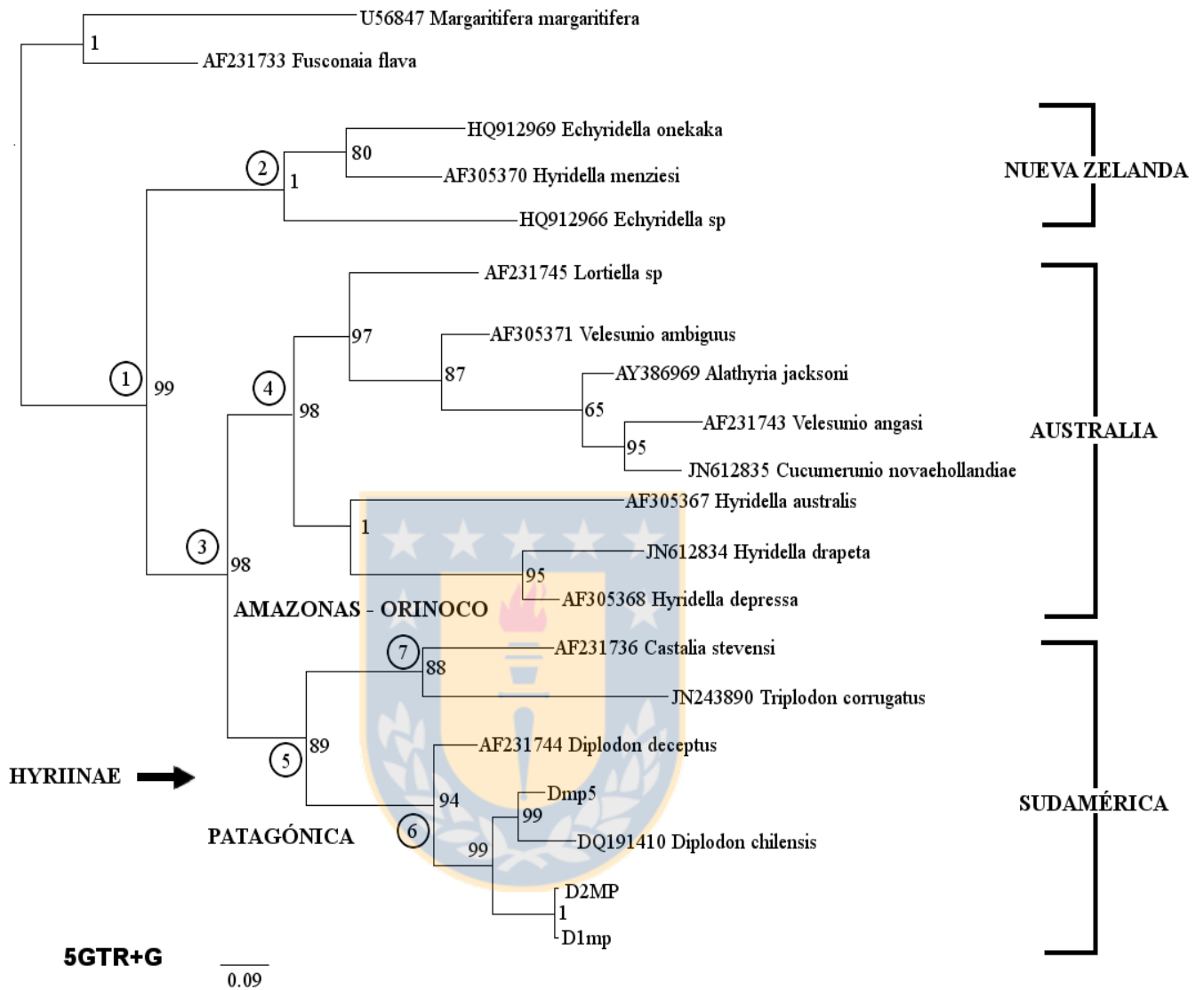


Figura 2: Árbol consenso por la regla de la mayoría de la muestra bayesiana. Se muestran los valores de probabilidad *a posteriori* de cada nodo. Los numeros muestran los nodos de interés. La flecha las subfamilias de Hyriidae.

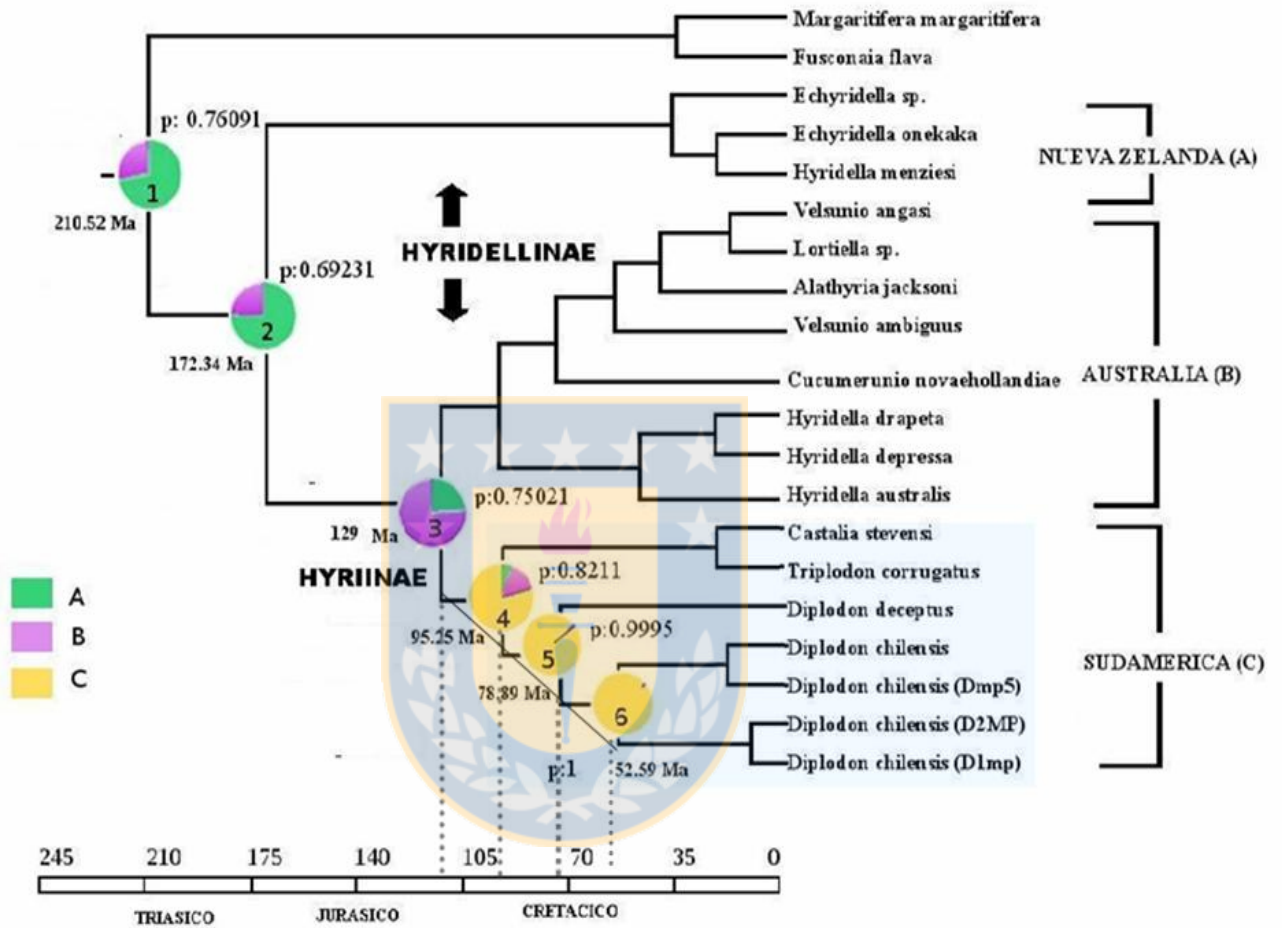


Figura 3: Árbol consenso por la regla de la mayoría de la muestra bayesiana. En los nodos el estado ancestral más probable. La proporción en los círculos numerados, representa la probabilidad de los estados ancestrales (pp). Bajo los nodos los tiempos de divergencia. A: Nueva Zelanda, B: Australia y C: Sudamérica.

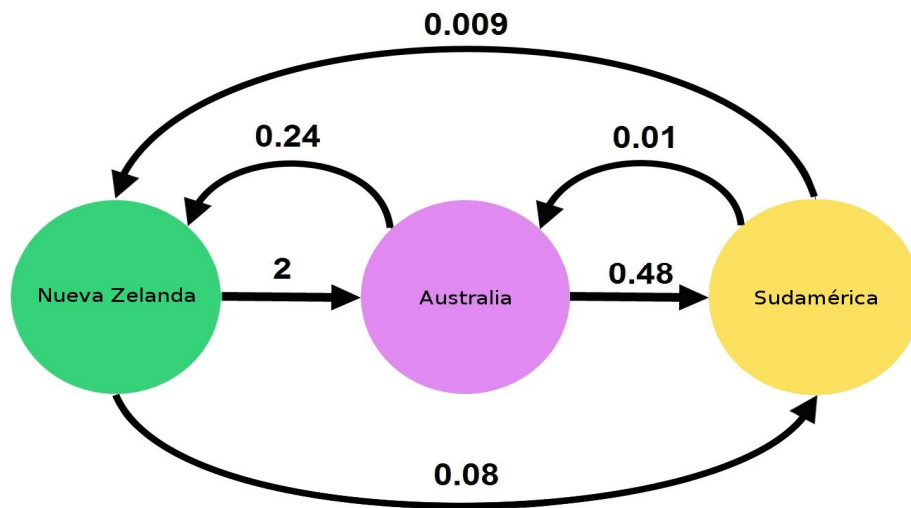
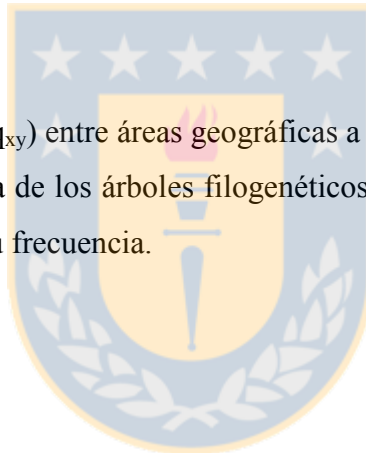


Figura 4: Tasas de transición (q_{xy}) entre áreas geográficas a través de la filogenia, basado en las topologías y largos de rama de los árboles filogenéticos. El grosor de las flechas indica las transiciones de acuerdo a su frecuencia.



CAPITULO IV: EVOLUCIÓN DE LAS ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS EN BIVALBOS DULCEACUÍCOLAS (UNIONOIDA Y SPHAERIIDAE).

Evolución de las estrategias reproductivas en Unionoida: Gloquidium versus Lasidium

Resumen

El orden Unionoida, compuesto por bivalvos estrictamente dulceacuícolas presenta dos tipos de larvas perfectamente diferenciables las Gloquidium y Lasidium. Diversas hipótesis se han planteado respecto, al ancestro común de estas estrategias de historia de vida. Mientras algunos autores sostienen que el ancestro de ambas es una larva Gloquidium, otros sostienen que los dos diferentes tipos de larvas no pueden ser considerados derivados uno del otro o de cualquier ancestro hipotético directo y serian un carácter polifilético. En el presente estudio, se evaluaron estas hipótesis mediante estadística bayesiana, primero estimando las relaciones filogenéticas del orden y luego estimando la señal filogenética del carácter y la probabilidad del ancestro común. Además, para estimar las probabilidades de cambio, se estimó la tasa de Ganancia (q_{01}) y Pérdida (q_{10}) del tipo de larva. Los resultados, revelan que el tipo de larva tiene señal filogenética, el ancestro corresponde a una larva Gloquidium, el modo de evolución sugiere tendencia hacia la gloquidiosis. La amplia distribución de este rasgo a nivel mundial, es discutida en relación a la condición generalista y especialista de ambos rasgos, sugiriendo como mecanismo explicativo la “amplitud de nicho parasitoide” para las larvas Gloquidium.

Palabras claves: Gloquidium, Lasidium, Unionoida, estado ancestral, evolución larval

Introducción

Los unionidos grupo al que pertenece Hyriidae, es un orden de bivalvos de agua dulce que se caracteriza por presentar larvas parasitas e incubación de embriones (Parada & Peredo 2002). Dentro del orden Unionoida, representado por bivalvos estrictamente dulceacuícolas, existen dos tipos de larvas perfectamente diferenciables: Gloquidium y Lasidium (Wachtler et al. 2001; Barnhart et al. 2008).

Parodiz & Bonetto (1963), basado en caracteres larvales reconocieron preliminarmente a las familias Mycetopodidae, Iridinidae y Etheriidae como un clado, caracterizado por presentar larva Lasidium. Posteriormente este grupo fue sustentado por diversas reconstrucciones filogenéticas (Bogan & Hoeh 2001, Graf 2000a; Hoeh et al. 2001, 2002; Roe & Hoeh 2003). Bajo una perspectiva filogenética, este clado ha sido designado en la literatura con diversos nombres “Mutelinae” (Ortmann 1921), “Mutelacea” (Parodiz & Bonetto 1963) y “Etherioidea” (Kabat 1997). Estudios posteriores realizados por Graf & Cummings (2006), basados en evidencia total, recuperan al clado de las familias con larvas Lasidium designadas como “Mutelacea”, no obstante incluyen como clado hermano a Hyriidae, el cual presenta larvas del tipo Gloquidium y en conjunto designan a éste clado como Etherioidea. Las otras familias que presentan larvas Gloquidium tales como, Unionidae y Margaritiferidae son designadas como la superfamilia Unionoidea (Parodiz & Bonetto, 1963; Graf & O Foiguil 2000).

Caracterización de los estados larvales de Unionoida

Las larvas Gloquidium, son típicamente calcáreas, bivalvas, con una sola huella de músculo abductor y su tamaño comprende entre los 70-350 μm . Las larvas del tipo Lasidium no son calcáreas, son univalvas, el cuerpo es típicamente trilobado y no existe huella de músculo abductor. Respecto, al número de gloquideos producidos por hembra grávida, varía desde los ocho mil hasta los tres o cuatro millones (Wachtler et al. 2001), dependiendo del tamaño de la hembra y del tamaño de los mismos. Los grupos con larva Lasidium varían desde cientos a tres millones (Herrman 1995; Bonetto & Ezcurra 1962,1965). Ambos tipos de larva son parásitos obligados de peces, condición clave para concretar el desarrollo y alcanzar el estadio juvenil (Barnhart et al. 2008).

Particularmente, el desarrollo larval parásito en peces, habría tenido un rol fundamental en la dispersión del grupo en los ecosistemas dulceacuícolas, puesto que en esta fase es capaz de colonizar grandes distancias antes de ser bentónicos (Bogan & Roe 2008). Respecto, a la modalidad en que los parásitos infectan a los peces, la literatura señala la formación de un cisto, el cual se forma una vez que la larva se adhiere sobre el tejido parasitado mediante un filamento o un diente. El cisto es formado por las células del epitelio del mismo hospedador (Falk et al. 1996).

Excepcionalmente *Mutela bourguignati* (Bourguignat 1885), con larva típicamente Lasidium no forma este cisto y ha modificado el filamento (lasidio) a una estructura conocida como “haustorium”. Esta estructura consiste en un apéndice tubular que atraviesa el tejido del hospedador (Wächtler et al. 2001), manteniendo a la larva adherida y desarrollando una segunda fase larval. Algunas especies excepcionalmente, han suprimido el estado parásito por el desarrollo directo, sin embargo este fenómeno, sólo se ha reportado en especies Norteamericanas como *Anodonta inbecilis*, *Stropithus undulatus*, *Obliquaria reflexa* (Mackie 1984; Heard 1998), además de *Lasmigona subviridis* (Barfield & Watters 1999) en África (Kondo 1990). Sin embargo, Lefevre & Curtis (1911, 1912) señalan que podría ser facultativo para *Stropithus undulatus* y *Obliquaria reflexa*, aunque existen dudas respecto a la permanencia de ambos caracteres.

Diversos estudios han puesto atención al comportamiento generalista y especialista de las larvas Gloquidium y Lasidium hacia el hospedador, así como la variación en la modalidad de infección (Roe et al. 1997, Wachtler et al. 2001; Barnhart et al. 2008). Las larvas Lasidium mediante la formación de cistos y haustorios complejos, muestran especificidad hacia el hospedador, que se manifiesta con la respuesta inmune causando mayor mortalidad larval, en tanto que las Gloquidium solo forman cistos que duran muy poco siendo mas resistentes, a este tipo de respuestas (<48 hrs.) en el hospedador (Wachtler et al. 2001).

Haag (2012), es el primero en dar una definición de los conceptos generalista y especialista, aplicado a esta modalidad de parasitismo en bivalvos de agua dulce. Los generalistas, tienen una amplia compatibilidad inmunológica con el hospedador finalizando su metamorfosis, en una amplia variedad taxonómica de peces hospederos, inclusive llegando a familias. Los especialistas sin embargo, lo hacen en pocos hospedadores, usualmente dentro de una única familia, inclusive una única especie. Bajo esta definición, las larvas

Lasidium son consideradas especialistas a pesar de que los estudios en este grupo aún son bastante limitados. Trabajos de asentamiento larval realizados en Lasidium por Bonetto & Ezcurra (1963), lograron demostrar que de un total 11 especies de peces utilizados solo en dos se logró la infestación y metamorfosis completa. Las Gloquidium, por el contrario, han sido extensamente estudiadas, incluso llegando a sugerir que algunos miembros de Margaritiferidae eran menos generalistas, pero que sin embargo bajo condiciones de escasez de hospederos, podían potencialmente infectar a salmonoideos (Weiss & Layzer 1995; Keller & Ruessler 1997; Cummings & Watters 2010; Nedeau et al. 2000).

Interpretación evolutiva sobre los estados larvales de Unionoida

El parasitismo es una estrategia única en bivalvos de agua dulce dentro de los Unionoida a diferencia del desarrollo directo que es frecuente en bivalvos dulceacuícolas del orden Veneroida Graf (2013), por lo que a pesar de las múltiples hipótesis preliminares surgidas para explicar la evolución y origen de esta particular estrategia reproductiva, todas las explicaciones convergen, en que el parasitismo ha sido clave para este orden de moluscos. Fundamentalmente, en procesos de adaptación y colonización hacia los inestables ecosistemas de agua dulce, por lo que su evolución ha sido guiada en respuesta a factores ambientales (Graf 2013; Graf & Cummings 2006).

A pesar, de que en la literatura se han abordado aspectos descriptivos y fisiológicos de estas larvas (Silva-Souza & Eiras 2002; Souza et al. 2011), no existe un mecanismo que permita explicar el origen de las larvas Lasidium, su particularidad morfológica, la modalidad de infección y el tamaño del rango geográfico. Respecto al rango geográfico (Fig.1), cabe destacar que las especies con larva Gloquidium, a nivel mundial presentan una distribución cosmopolita sin embargo, las Lasidium presentan una distribución restringida, confinadas a Sudamérica, África y Madagascar (Graf & Cummings 2007).

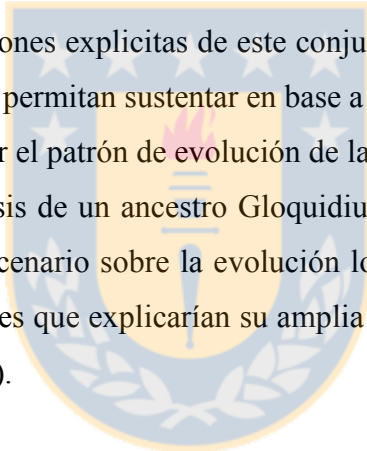
Bajo una perspectiva evolutiva, dos hipótesis han surgido de manera más bien intuitiva para explicar la evolución del estadio larval de los unionoidos: Primero, Parodiz & Bonetto (1963: 185) afirman al respecto que "Los dos diferentes tipos de larvas Gloquidium o Lasidium no pueden ser considerados derivados uno del otro o de cualquier hipotético ancestro directo y por lo tanto, tendrían un origen polifilético"; Segundo, diversos autores sostienen la monofilia de los dos tipos de larva, planteamiento

que se basa en la polaridad de la transición evolutiva del tipo de larva, propuesto para filogenias basadas en morfología (Atkins 1937; Taylor et al.1969, 1973; Tevesz 1975; Popham 1979; Tevesz & Carter 1980 ; Smith 1986 ; Healy 1989; Waller 1990, 1998; Graf 2000).

Preliminarmente, estudios sistemáticos moleculares, mediante la secuencias del gen COI analizados en conjunto con el mapeo del tipo de larva, usando técnicas de parsimonia, permitieron proponer que las Gloquidium corresponderían al estado ancestral y las Lasidium serían derivadas (Hoeh et al. 1998 ab, Hoeh et al. 2001). Actualmente la explicación más parsimoniosa según Graf & Cummings (2006), pareciera coincidir con este planteamiento. Estos autores utilizando evidencia total sugieren, al igual que Hoeh et al. (2001) que la condición ancestral de Unionoida fue un Gloquidium y a partir de esta condición evolucionaron las Lasidium.

A la fecha, no existen evaluaciones explícitas de este conjunto de hipótesis analizadas bajo un contexto probabilístico, que permitan sustentar en base a la evidencia alguna de ellas.

Nuestros objetivos son analizar el patrón de evolución de las larvas parasitas de Unionoida sometiendo a prueba la hipótesis de un ancestro Gloquidium para las larvas Lasidium. En segundo lugar, proponer un escenario sobre la evolución los tipos de larva, sugiriendo los potenciales mecanismos causales que explicarían su amplia distribución (amplitud de nicho parasito o factores ambientales).



Materiales y método

1-Secuencias de ADN y análisis filogenético

Se obtuvieron secuencias del gen Citocromo Oxidasa I (COI) desde Genbank para un total de 42 taxa del orden Unionoidea, cada una con 645 bp. El número de taxa, código de acceso a Genebank, incluyendo referencias bibliográficas, son mostradas en la Tabla I. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL X versión 2.0 (Larkin et al. 2007), con los valores de los parámetros de alineamiento especificados (gap opening penalty=15, gap extensión penalty=6.6 y delay divergent sequences=30). Los gaps en la secuencia fueron tratados como datos faltantes. Luego de la edición y alineamiento se evaluó la calidad de las secuencias para los análisis filogenéticos mediante el test de saturación desarrollado por Xia et al. (2003) e implementado en el programa DAMBE 4.2 (Xia & Xie 2001, Xia 2000; Xia & Lemey 2009; Xia & Xie 2001).

Para estimar las relaciones filogenéticas y probabilidad *a posteriori* de los nodos, se utilizaron Cadenas de Markov Monte Carlo con inferencia bayesiana (BMCMC). El método BMCMC asegura que los árboles sean muestreados de acuerdo a su probabilidad de ocurrencia utilizando un modelo de evolución de secuencias. Para considerar en el análisis la heterogeneidad en las tasas y patrones de evolución se utilizaron modelos mixtos según lo descrito por Pagel & Meade (2004), basados en el modelo General de tiempo reversible (GTR; Rodríguez et al. 1990). Los modelos mixtos permiten detectar diferentes patrones de evolución en las secuencias, sin el conocimiento *a priori* de esos patrones, ni necesidad de particionar los datos. El procedimiento Reversible Jump Markov Chain Monte Carlo (RJMCMC), fue utilizado para encontrar el número de matrices GTR del modelo mixto (numero de matrices GTR + G), que mejor se ajustó a los datos. Esta aproximación permite explorar diferentes modelos de evolución (en este caso número de matrices GTR) y sus respectivos parámetros, convergiendo en el modelo que mejor se ajuste, a los datos en la muestra de árboles (Pagel & Meade 2008).

Nueve cadenas independientes fueron analizadas, generando aproximadamente 50.000.000 árboles filogenéticos mediante el método RJBMCMC, muestreando cada 10.000 árboles para asegurar la independencia de los muestreos. Se escogió una de las cadenas que

convergió en la misma zona (*i.e.* tuvieron la misma probabilidad *a posteriori*), quitando los primeros 5000 árboles que estaban fuera de la zona de convergencia de la cadena de Markov. Finalmente, se remuestro cada 30 árboles obteniendo una muestra final de 150 árboles no autocorrelacionados ($p < 0.0001$). Estos análisis se llevaron a cabo en el software Bayes Phylogenies v 1.0 (Pagel & Meade 2004) y las autocorrelaciones parciales en el software Statistica v 7 (Statsoft Inc. 2001). La topología del árbol consenso y los valores de probabilidad *a posteriori* (PP) fueron calculados y visualizados en el programa Bayes Trees 1.0 (Meade & Pagel 2009).

2-Reconstrucción de estados ancestrales del tipo de larva y sus tasas de ganancia vs pérdida en la filogenia y rutas de transición

Primero, se evaluó si existía asociación entre los rasgos de interés y su distribución en la filogenia (señal filogenética) mediante el Índice de Asociación (IA) según lo propuesto por Parker et al. (2008) en el software BaTS 1.0. El IA fue utilizado en un marco bayesiano en la muestra de árboles obtenida del análisis filogenético. Este índice mide la autocorrelación filogenética en caracteres discretos o multiestado, es decir, evidencia estadísticamente si especies cercanas filogenéticamente (mismos clados) tienden a parecerse entre sí más que lo esperado por puro azar (Blomberg et al. 2003). En este análisis la hipótesis nula es que los estados de un rasgo (*i.e.* tipo de larva) están aleatoriamente distribuidos en la filogenia, o la falta de asociación entre la historia de ancestro-descendencia de los linajes (estructura de clados monofiléticos) y la variable analizada (Hernández et al. 2013). Se evaluó la significancia estadística de la distribución de valores IA observados en la muestra de árboles comparándola con la distribución de probabilidades nula de valores de IA obtenida de un total de 20.000 aleatorizaciones. Este índice se seleccionó por ser de mejor resolución, poder estadístico y menor error tipo I, en relación a otros estadísticos propuestos (Parker et al. 2008).

Para evaluar la evolución del tipo de larva, utilizamos el modelo de Markov de Tiempo Continuo (Pagel 1994), implementado en el software BayesTraits v 2.0 (Pagel & Meade 2013). Este modelo, permite que un carácter cambie en cualquier momento desde el estado en que está a otro en pequeños intervalos de tiempo, lo cual considera el largo de ramas del

árbol filogenético. De este modo, se estimó el más reciente común ancestro (MRCA) en cada nodo (se codificó la larva Gloquidium como estado "0" y Lasidium como estado "1") de los árboles filogenéticos de la muestra. Para estas estimaciones se utilizó una distribución "exponential hyperprior (0, 100)".

Resultados

1-Reconstrucción filogenética

El test Xia et al. (2003) para determinar el grado de saturación de las secuencias usadas del gen COI, mostró valores de saturación significativamente menores al Índice de saturación calculado ($I_{ss}=0.3456 < I_{ss.c}=0.6345$, $p < 0.002$), por lo tanto las secuencias son útiles para los análisis filogenéticos. Los resultados obtenidos a partir del método RJMCMC muestran que el modelo que mejor se ajustó a la evolución de las secuencias y describe las relaciones filogenéticas es 5 GTR+G. La reconstrucción filogenética de Unionoidea, permitió recuperar un grupo monofilético para Mutelacea PP=1 y la monofilia de las familias Hyriidae PP= 97, e Iridinidae PP=1. Sin embargo, Unionidae y Etheriidae son parafiléticos (Fig. 2)

2-Señal filogenética, estados ancestrales y tasas de ganancia o pérdida en la filogenia.

El estadístico IA, muestra que para el rasgo tipo larval se obtuvo un valor significativo ($IA = 1.7$, $p < 0.005$), por lo que se rechaza la hipótesis nula de un rasgo aleatoriamente distribuido en la filogenia, existiendo fuerte evidencia de asociación entre el rasgo y la historia filogenética.

La reconstrucción del tipo de larva ancestral muestra que existe una mayor probabilidad que el MRCA de Mutelacea (Nodo2, PP= 0.8765) sea una larva Gloquidium y que el estado Lasidium, apareció posteriormente en el grupo de los Mutelacea (Nodo 3; PP= 0.9998) (Fig. 3 y 4). En cuanto a las tasas de transición los resultados muestran que existe una tendencia hacia la gloquidización $q_{01}=5.35$ y $q_{10}=12.43$ (Fig.5).

Discusión

En base de los resultados obtenidos de la filogenia de Unionoida, las familias que presentan larvas Lasidium son un grupo monofilético sustentando a la Superfamilia Mutelacea. Estas surgen como una especialización de un único evento filogenético, corroborando aquellas hipótesis planteadas preliminarmente por algunos autores (Atkins 1937; Taylor et al. 1969, 1973; Tevesz 1975; Popham 1979; Tevesz & Carter 1980; Smith 1986; Healy 1989, Waller 1990, 1998; Graf 2000). Por otra parte nuestros resultados difieren con estas propuestas, en que Unionacea parafilética.

La presencia de señal filogenética del rasgo parasitismo, como parte importante de nuestros resultados revelan que éste caracter se asocia fuertemente a la historia filogenética de Unionoida (Blomberg & Garland 2002; Blomberg et al. 2003), lo cual implica que su origen es debido a procesos macroevolutivos y a los escenarios históricos en los que habitaron los ancestros de las especies actuales. El modo de evolución de este rasgo y la distribución a lo largo de la filogenia, indican que no es un proceso aleatorio, por lo que las especies que forman un clado y que comparten este rasgo por ancestría, se parecen más que lo esperado por azar. En este sentido, la tasa de evolución es similar a la de los eventos de especiación, menor distancia evolutiva entre los grupos, mayor similitud biológica y de los rasgos que exhiben. De esta manera, el estado ancestral de este rasgo restringe el estado de las especies descendientes, modelando la variación actual del parasitismo en Unionoida (Rheindt et al.2004; Kamilar & Cooper 2013).

En base a este antecedente, el MRCA de las larvas Lasidium, corresponde a una larva Gloquidium del tipo generalista (Healy 1989, Waller 1990, 1998; Graf 2000; Graf & Cummings 2006; Graf 2013) y las Lasidium se habrían originado posteriormente. Por otra parte, las tasas de transición evolutiva, muestran que existe una importante tendencia hacia la ganancia del rasgo Gloquidium (q_{10}), esto sugiere que las Lasidium (especialistas), tendrían un menor éxito en términos de su permanencia en el tiempo evolutivo, y por lo tanto, este estado representaría una especialización ecológicamente exitosa en peces restringidos a ambientes tropicales.

Amplitud de nicho: Generalistas versus especialistas una hipótesis explicativa del actual patrón de distribución larval en *Gloquidium*.

Se ha propuesto que las larvas generalistas, como las *Gloquidium*, al parasitar una mayor variedad de peces, su rango de distribución tiende a ser mayor (Bogan & Hoeh 2000). Esta modalidad de infección puede potencialmente explicar la amplitud del rango geográfico de las especies que presentan larvas *Gloquidium*, porque ligada al parasitismo se encuentra la respuesta del huésped hacia el sistema inmune del hospedador y a la variación en la modalidad de infección, lo que le asegura el éxito al entrar en contacto con una mayor variedad de peces, a diferencia de las *Lasidium* (Wachtler et al. 2001; Haag 2012).

Por otra parte, las larvas *Lasidium* pueden ser consideradas especialistas dado que ocupan hospedadores específicos, existiendo evidencia de experimentos que han demostrado que al cambiar el hospedador los organismos con larva *Lasidium* no completan su ciclo de vida (Parodiz & Bonetto 1963; Silva-Souza & Eiras 2002; Souza et al. 2011). De este modo se caracterizarían, al igual que otros parásitos especialistas, por habitar ambientes estables (tipo respuesta inmune) y restringidos a la distribución de los hospedadores específicos (Bogan & Hoeh 2000; Graf 2000; Graf & Cummings 2006; Graf 2013). Estos ambientes estables se encuentran en peces que habitan en zonas tropicales, los cuales en términos de recursos, se caracterizan por presentar bajas fluctuaciones en relación a la disponibilidad lo que favorece la presencia de las especies especialistas con larvas *Lasidium*. Esto, a diferencia de las estrategias generalistas con larva *Gloquidium* que son exitosas en ambientes inestables y fluctuantes, ya que no dependen de un rango restringido de recursos, por lo que el nicho para estas larvas es amplio (Currie 1991; Habermannova et al. 2013).

A esto se suma el hecho que las larvas *Gloquidium* presentan una variedad de estrategias de infección (conglutinados, quistes, ganchos de fijación etc.) y parasitan hospedadores con amplia distribución, lo cual permitiría la distribución de las *Gloquidium* a nivel global (Bogan & Hoeh 2000; Haag 2012). En resumen, las *Gloquidium* corresponderían a aquellas larvas que pueden parasitar un amplio espectro de peces hospederos sin restricción inmunitaria por lo que presentan un mayor rango geográfico, a diferencia de las *Lasidium* que presentan mayor especificidad hospedera y rangos restringidos. Lo cual apoya la “hipótesis de amplitud de nicho” propuesta para parásitos en general (Brown 1984, Krasnov et al. 2005), que sugiere que el tamaño del rango geográfico de un parásito es

dependiente del número de hospedadores que puede ocupar, es decir, si es específico su rango es limitado y si es generalista su rango es amplio (Lymbery 1989; Bush 1995; Pradervand et al. 2013).

A escala macroevolutiva los parásitos generalistas tienen menores tasas de extinción que los especialistas (Combes 1995; Junling & Levin 2006; Devictor et al. 2008; Fortin et al. 2008; Colles et al. 2009; Poulin et al. 2011), lo que en nuestro caso podría explicar la gran diversidad actual de los taxa con larva *Gloquidium*. Por otra parte, en el tiempo evolutivo la baja diversidad de los taxa con larvas *Lasidium*, sólo habitando ambientes tropicales, se explicaría por su estrecho rango de hospedadores, restringidas estrategias de infección y alta tasa de extinción.



Bibliografía

ATKINS D (1937). On the ciliary mechanisms and interrelationships of lamellibranchs . Part II: Sorting devices on the gills. Qj Microsc Sci 79:339-373.

BARNHART M C, WENDELL R H & WIN ROSTON (2008). Adaptations to host infection and larval parasitism in Unionoida Journal The North American Benthological Society 27(2):370–394.

BLOMBERG SP & T GARLAND (2002) Tempo and mode in evolution: phylogenetic inertia, adaptation and comparative methods. J. Evol. Biol., 15: 899–910.

BLOMBERG S, T GARLAND & A IVES (2003) Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. Evolution 57 (4): 717-745.

BOGAN A E & W R HOEH (2000). On becoming cemented:evolutionary relationships among the genera in the freshwater bivalve family Etheriidae (Bivalvia:Unionoida). Pages 159–168 in E. M. Harper, J. D. Taylor, and J. A.Crame (editors). The evolutionary biology of the Bivalvia. Geological Society Special Publication 177.Geological Society, London, UK.

BOGAN AE & KJ ROE (2008). Freshwater bivalve (Unioniformes) diversity, systematics, and evolution: status and future directions. Journal of The North American Benthological Society 27 (2): 349—369.

BOGAN AE & JR KEVIN (2008). Freshwater bivalve (Unioniformes) diversity, systematics, and evolution: status and future directions Journal The North American Benthological Society 27(2):349–369.

BONETTO AA & ID EZCURRA. (1963). El desarrollo de lasidium de *Anodontites trapesialis forbesianus* (Lea) (Moll. Lamell.). Physis 23: 195–203.

BONETTO AA & ID EZCURRA. (1965). Notas malacológicas. III (5) la escultura del periostraco en el genero *Anodontites*. (6) el Lasidium de *Anodontites trapezeus* (Spix). (7) el lasidium *Mycetopoda siliquosa* (Spix). *Physis* 25: 197–204.

BROWN JH (1984). On the relationship between abundance and distribution of species. *Am. Nat.* 124, 255–279.

BUSH A & CR KENNEDY (1994) Host fragmentation and helminth parasites: Hedging your bets against extinction . *International Journal for Parasitology* 24:1333-1343.

CLAES M (1987). Untersuchungen zur Entwicklungsbiologie der Teichmuschel *Anodonta cygnea* Diplomarbeit, Institut für Zoologie, Tierärztliche Hochschule Hannover.

COLLES A , LIOW LH & A PRINZING (2009). Are specialists at risk under environmental change? Neocological, paleoecological and phylogenetic Approaches. *Ecology Letters* 12: 849–863.

COMBES C (1995). *Interactions durables : Ecologie et evolution du parasitisme*. Masson, Paris.

CURRIEDJ (1991) Energy and largescale patterns of animaland plantspecies richness. *The American Naturalist* 137:27–49.

DEVICTOR V, JULLIARD R & F JIGUET (2008). Distribution of specialist and generalist species along spatial gradients of habitat disturbance and fragmentation. *Oikos* 117: 507-514.

FORTIN D, MORRIS DW & PD MCLOUGHLINC (2008) Habitat selection and the evolution of specialists in heterogeneous environments 54:311–328

GRAF DL (2000). The Etherioidea revisited: a phylogenetic analysis of hyriid relationships (Mollusca: Bivalvia: Paleoheterodonta: Unionoida). Occasional Papers of the University of Michigan Museum of Zoology 729: 1–21.

GRAF DL & D Ó FOIGHIL (2000). Molecular phylogenetic analysis of 28S rDNA supports a Gondwanan origin for Australasian Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionoida). Vie Milieu 50:245–254.

GRAF D L & K S CUMMINGS (2006). Freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) of Angola, with description of a new species, *Mutela wistarmorrisi*. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 155: 163-194.

GRAF D L & K S CUMMINGS (2007). Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). Journal of Molluscan Studies 73: 291–314.

GRAF D (2013). Patterns of Freshwater Bivalve Global Diversity and the State of Phylogenetic Studies on the Unionoida, Sphaeriidae, and Cyrenidae. American Malacological Bulletin 31(1): 135–153.

FALK L, HERMANN F & K WÄCHTLER (1996). *Mutela bourguignati* : Eine afrikanische Süßwassermuschel mit abweichender Entwicklung. Verh DtschZool Ges u9: 1-326.

HAAG W R (2012) North American Freshwater Mussels: Natural History, Ecology, and Conservation, Cambridge University Press, New York. 493 pp.

HEARD WH (1998). Brooding patterns in freshwaters mussels. Malacol Rev.Suppl. 1, 7:105-121.

HABERMANNOVA´ J, BOGUSCH P, STRAKA J (2013) Flexible Host Choice and Common Host Switches in the Evolution of Generalist and Specialist Cuckoo Bees (Anthophila: Sphecodes). PLoS ONE 8(5): e64537.

HERNÁNDEZ CE, E RODRÍGUEZ-SERRANO, J AVARIA-LLAUTUREO, O INOSTROZA-MICHAEL, B MORALES-PALLERO, D BORIC-BARGETTO, CB CANALES-AGUIRRE, PA MARQUET & A MEADE (2013) Using phylogenetic information and the comparative method to evaluate hypotheses in macroecology. *Method in Ecology and Evolution*, 4: 401–415.

HERRMAN F (1995). Untersuchungen zum Lebenszyklus der afrikanischen Süßwassermuschel *Mutela bourguignat* 1885. Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover.

HEALY JM (1989). Spermiogenesis and spermatozoa in the relict genus *Neotritonia*. Relevance trigonioid relationships, particularly Unionoidea. *Mar. Biol.* 103:75-85.

HOEH WR, BOGAN AE, CUMMINGS KS SI GUTTMAN (1998). Evolutionary relationships among the higher taxa of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea): inferences on phylogeny and character evolution from analyses of DNA sequence data. *Malacol. Rev.* 31:121-140.

HOEH WR, BOGAN AE, & WH HEARD (2001). A phylogenetic perspective on the evolution of morphological and reproductive characteristics in the Unionoidea. In: Bauer G, Wächtler K, eds. *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoidea*. *Ecological Studies* 145. Berlin:Springer-Verlag, 257–280.

HOEH W R, DT STEWART & SI GUTTMAN (2002). High idelity of mitochondrial genome transmZssion under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia:Unionoidea). *Evolution* 56:2252–2261.

HUELSENBECK JP & KA CRANDALL (1997). Phylogeny estimation and hypothesis testing using maximum likelihood. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 437-466.

KAMILAR JM & N COOPER (2013). Phylogenetic signal in primate behaviour ecology and life history. *Philosophical Transactions of Royal Society B*

KABAT AR (1997). Correct family names for the freshwater “muteloid” bivalves (Unionoida: Etherioidea). *Occasional Papers on Mollusks* 5: 379-392.

KARNA DW & RE MILLEMANN (1978). Glochidiosis of salmonid fishes. III. Comparative susceptibility to natural infection with *Margaritifera margaritifera* (L.) (Pelecypoda: Margaritanidae) and associated histopathology. *J. Parasitol.* 64: 528–537

KASS RE & AE RAFTERI (1995). Bayes Factor. *American Statistical Association.* 90: 430.

KONDO (1990). Reproductive biology of small bivalve *Grandidiera burtoni* in Lake Tanganyika. *Venus Jpn J. Malacol.* 49:120-125.

KRASNOV BR, POULIN R, SHENBROT GI, MOUILLOT, D & KHOKHLOVA IS (2005). Host specificity and geographic range in haematophagous ectoparasites. *Oikos* 108: 449-456.

JUNLING MA & SA LEVIN (2006) The Evolution of Resource Adaptation: How Generalist and Specialist Consumers Evolve *Bulletin of Mathematical Biology* 68: 1111-1123.

LYMBERY AJ (1989) Host specificity, host range and host preference. *Parasitology Today* 5-298

LEFEVRE G & CURTIS WC (1911). Metamorphosis without parasitism in the Unionidae. *Science* 33:863-865.

LEFEVRE G & CURTIS WC (1912). Studies on the reproduction and artificial propagation of freshwater mussels Bull Bur Fish 30:105-201.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R , MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM, F VALENTIN H, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R , THOMPSON JD, GIBSON T J & DG HIGGINS (2007). ClustalW and ClustalX version 2.0. Bioinformatics 23:2947-2948.

LYMBERY AJ (1989). Host specificity, host range and host preference. Parasitology Today 5-298.

MACKIE GL (1984). Bivalves In: Wilbuer KM (Editor in Chief). The Mollusca, vol. 7. Reproduction . Academic Press , London . 351-418 pp.

MACARTHUR RH (1955) Fluctuations of animal populations and a measure of community stability. Ecology 36: 533–536.

MEADE A & M PAGEL (2009). Software Bayes trees V.1.3 <http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesTrees.html>.

NEDEAU E.J., M.A. MCCOLLOUGH & BI. SWARTZ. (2000). The freshwater mussels of Maine. Maine Department of Inland Fisheries and Wildlife, Augusta, Maine.

ORTMANN, A. E. 1921. The anatomy of certain mussels from the upper Tennessee. Nautilus 34:81–91.

PAGEL M (1994). Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. Proceedings of the Royal Society London B 255: 37-45.

PAGEL M & A MEADE (2004). A Phylogenetic Mixture Model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data. Systematic Biology, 53 : 571–581.

PAGEL M & A MEADE (2006). Bayesian analysis of correlated evolution of discrete characters by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *American Naturalist*, 167, 808-825.

PAGEL MD & A MEADE (2013). BayesTraits version 2.0 computer package. Software and manual. [on line] < <http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesTraits.html>> .

PARKER J, RAMBAUT AR & OG PYBUS (2008). Correlating viral phenotypes with phylogeny: accounting for phylogenetic uncertainty. *MEEGID* 8(3):239-246.

PARODIZ JJ & AA BONETTO (1963). Taxonomy and zoogeographic of the South American Naiades (Pelecypoda: of the South American Naiades (Pelecypoda:Unionacea and Mutelacea). *Malacologia* 1: 179–214.

POPHAM JD (1979). Comparative spermatozoon morphology and bivalve phylogeny. *Malacol. Rev.* 12:1-20.

POULIN R, BR KRASNOV, D MOUILLOT & DW THIELTGES (2011).. The comparative ecology and biogeography of parasites *Phil. Trans. R. Soc. B* 366 :2379–2390.

PRADERVAND JN, LOIC P; LITSIOS G & A GUISAN (2013). Potential host number in cuckoo bees (*Psithyrus* subgen.) increases toward higher elevations. *Frontiers of Biogeography* 5(2): 122-129.

PRICE PW (1990). Host populations as resource defining parasite community organization. *Á/ In: Esch, G., Bush, A. and Aho, J. (eds), Parasite communities: patterns and processes.* Chapman and Hall, pp. 21 /40.

RAMBAUT A.& AJ DRUMMOND (2009). Tracer v1.5 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.

RHEINDT FE GRAFE TU & E ABOUHEIF (2004). Rapidly evolving traits and the comparative method: how important is testing for phylogenetic signal? *Evolutionary Ecology Research* 6: 377–396

ROE KJ, A. M. SIMONS & P. D. HARTFIELD (1997). Identification of a fish host of the inflated heelsplitter *Potamilus inflatus* (Bivalvia: Unionidae) with a description of its glochidium. *American Midland Naturalist* 138:48–54

ROE KJ & W R HOEH (2003). Systematics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida). Pages 91–122 in C. Lydeard and D. R. Lindberg (editors). *Molecular systematics and phylogeography of mollusks*. Smithsonian Books, Washington, DC.

RODRIGUEZ F, J F OLIVER, A MARIN & R MEDINA (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142: 485–501.

SILVA-SOUZA AT & JC EIRAS (2002). The histopathology of the infection of *Tilapia rendalli* and *Hypostomus regani* (Osteichthyes) by lasidium larvae of *Anodontites trapesialis* (Mollusca, Bivalvia). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97(3): 431-433

SILVA-SOUZA AT, P GUARDIA-FELIPI & NR ARREBOLA (2011). Embryonic development of *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mycetopodidae). *Brazilian Journal of Biology* 71: 139-144.

SMITH DG (1986). The stomach anatomy of some eastern North American Margaritiferidae (Unionoida: Unionacea) *Am. Malacol. Bull.* 4: 13-19.

STATSOFT INC. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 7 www.statsoft.com.

TAYLOR ID., WJ KENNEDY & A HALL. (1969). The shell structure and mineralogy of the Bivalvia. Introduction . *Nuculacea -Trigonacea*. *Bull Br Mus (Nat Hist) Zool Suppl* 3:1-125.

TAYLOR ID, WJ KENNEDY & A HALL (1973). The shell structure and mineralogy of the Bivalvia II . Lucinacea-Clavagellacea. Conclusions. Bull Br Mus (Nat Hist) Zool Suppl 22:256-294.

TEVESZ MJS (1975). Structure and habits of the living fossil pelecypod Neotrigonia. Lethaia 8: 321-327.

TEVESZ MJS & JC CARTER (1980). Environmental relationships of shell form and structure of unionacean bivalves In: Rhoads DC, Lutz RA eds. Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida. Ecological Studies 145. Berlin:Springer-Verlag, 257–280.

WÄCHTLER K, DREHER-MANSUR MC & T RICHTER (2001). Larval types and early postlarval biology in Naiads (Unionoida). In: Bauer G, Wächtler K, eds. Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida. Ecological Studies 145. Berlin: Springer-Verlag, 93–125.

WALLER D & LG MITCHELL (1989). Gill tissue reactions in walleye *Stizostedion vitreum vitreum* and common carp *Cyprinus carpio* to glochidia of the freshwater mussel *Lampsilis radiata siliquoidea*. Dis. Aquat. Org. 6: 81–87.

WALLER TR (1990). The evolution of ligament systems in the Bivalvia. In : Morton B (ed) The Bivalvia-Proceedings of a memorial symposium inn honour of Sir Charles Maurice Yonge Edinburgh . Hong-Kong University Press , Hong Kong , npp49-71.

WALLER TR (1998). Origin of the molluscan class Bivalvia and a phylogeny of major groups. In: Johnson PA, Haggart JW (eds) Bivalves: an eon of evolution . University Calgary press, Calgary, pp 1-45.

WEISS JL.& JB. LAYZER (1995). Infestations of glochidia on fishes in the Barren River, Kentucky. American Malacological Bulletin 11:153–159.

XIA X (2000). Data analysis in molecular biology and evolution. Kluwer Academic Publishers, Boston.

XIA X & XIE Z (2001). DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. J. Hered. 92, 371–373.

XIA X, XIE Z, SALEMI M, CHEN L & Y WANG (2003). An index of substitution saturation and its application Molecular Phylogenetics and Evolution 26: 1–7

XIA X & P LEMEY (2009). A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing Second edition, Cambridge University Press.

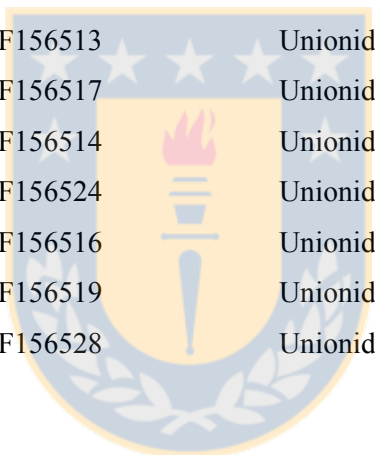


Tablas y figuras

Tabla I: Detalles de los taxa incluidos para Hyriidae, número de acceso a Genbank y estados larvales (*) Grupo externo. Littlewood (1994)¹, Hoeh et al. (1998)², Bogan & Hoeh (2000)³, Graf & Ó Foighil (2000a, b)⁴, Park & Ó Foighil 2000⁵, Roe et al. (2001)⁶, Graf (2002a)⁸.

Especie	Nº Acceso Genbank COI (1,2,3,4,5,6,7,8)	Familia	Tipo de larva (2,3,4)
Orden Veneroidea			
<i>Corbicula fluminea</i>	AF120666		Veliger
Orden Trigonioidea			
<i>Neotrigonia margaritacea</i>	U56850		Veliger
Orden Unionoidea			
<i>Etheria elliptica</i>	AF231742	Etheriidae	Lasidium/Especialista
<i>Acostaea rivoli</i>	AF231739	Etheriidae	Lasidium/Especialista
<i>Pseudomulleria dalyi</i>	AF231750	Etheriidae	Lasidium/ Especialista
<i>Mutela rostrata</i>	U56849	Iridinidae	Lasidium/ Especialista
<i>Mutela dubia</i>	AF231737	Iridinidae	Lasidium/ Especialista
<i>Anodontites trigonus</i>	AF231738	Mycetopodidae	Lasidium/ Especialista
<i>Anodontites guanarensis</i>	AF231741	Mycetopodidae	Lasidium/ Especialista
<i>Monocondylaea minuana</i>	AF231745	Mycetopodidae	Lasidium/ Especialista
<i>Hyridella depressa</i>	AF156496	Hyriidae	Gloquidium/Generalista
<i>Hyridella australis</i>	AF305367	Hyriidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Hyridella menziesi</i>	AF30537	Hyriidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Vesunio angasi</i>	AF23174	Hyriidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Vesunio ambiguus</i>	AF305371	Hyriidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Lortiella sp</i>	AF231746	Hyriidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Diplodon chilensis</i>	DQ191410	Hyriidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Diplodon deceptus</i>	AF231744	Hyriidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Castalia stevensi</i>	AF231736	Hyriidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Margaritifera margaritifera</i>	U56847	Margaritiferae	Gloquidium/ Generalista
<i>Coelatura aegyptiaca</i>	AF231735	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Conradens conradens</i>	DQ191411	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Gonidea angulata</i>	DQ191412	Unionidae	Gloquidium/ Generalista

<i>Unio pictorum</i>	AF156499	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Unio caffer</i>	AF156501	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Lasmigona compressa</i>	AF156503	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Strophitus undulatus</i>	AF156505	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Pyganodon grandis</i>	AF156504	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Alasmidonta marginata</i>	AF156502	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Amblesma plicata</i>	AF156512	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Tritogonia verrucosa</i>	DQ191413	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Quadrula quadrula</i>	AF156511	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Elliptio dilatata</i>	AF156507	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Pleurobema coccineum</i>	AF156509	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Fusconaia flava</i>	AF231733	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Obliquaria reflexa</i>	AF385114	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Obliquaria reflexa</i>	AF156513	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Actinonaias carinata</i>	AF156517	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Ptychobranthus fasciolaris</i>	AF156514	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Villosa iris</i>	AF156524	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Ligumia recta</i>	AF156516	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Lampsilis cardium</i>	AF156519	Unionidae	Gloquidium/ Generalista
<i>Epioblasma triquetra</i>	AF156528	Unionidae	Gloquidium/ Generalista



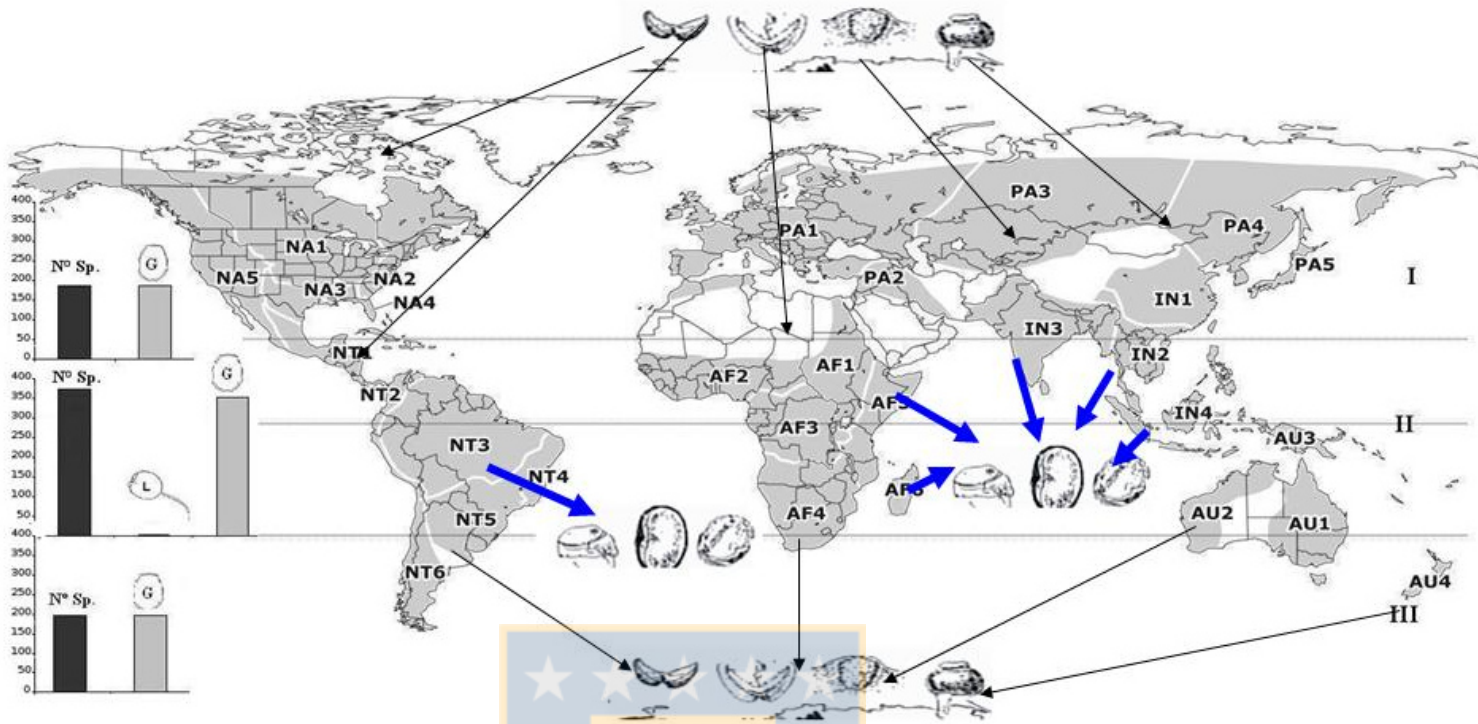


Figura 1: Distribución larvas *Gloquidium* y *Lasidium*. Las flechas negras distribución de *Gloquidium* y las azules distribución de *Lasidium*. A la derecha las gráficas de barra muestran riqueza de especies barra negra y grises muestran el número de especies con un determinado tipo de larva en las principales provincias zoogeográficas. NT: Netrópico, AF: Afrotrópico, IN: Indotrópico, PA: Paleártico y AU: Australia. Modificado de Graf & Cummings (2007).

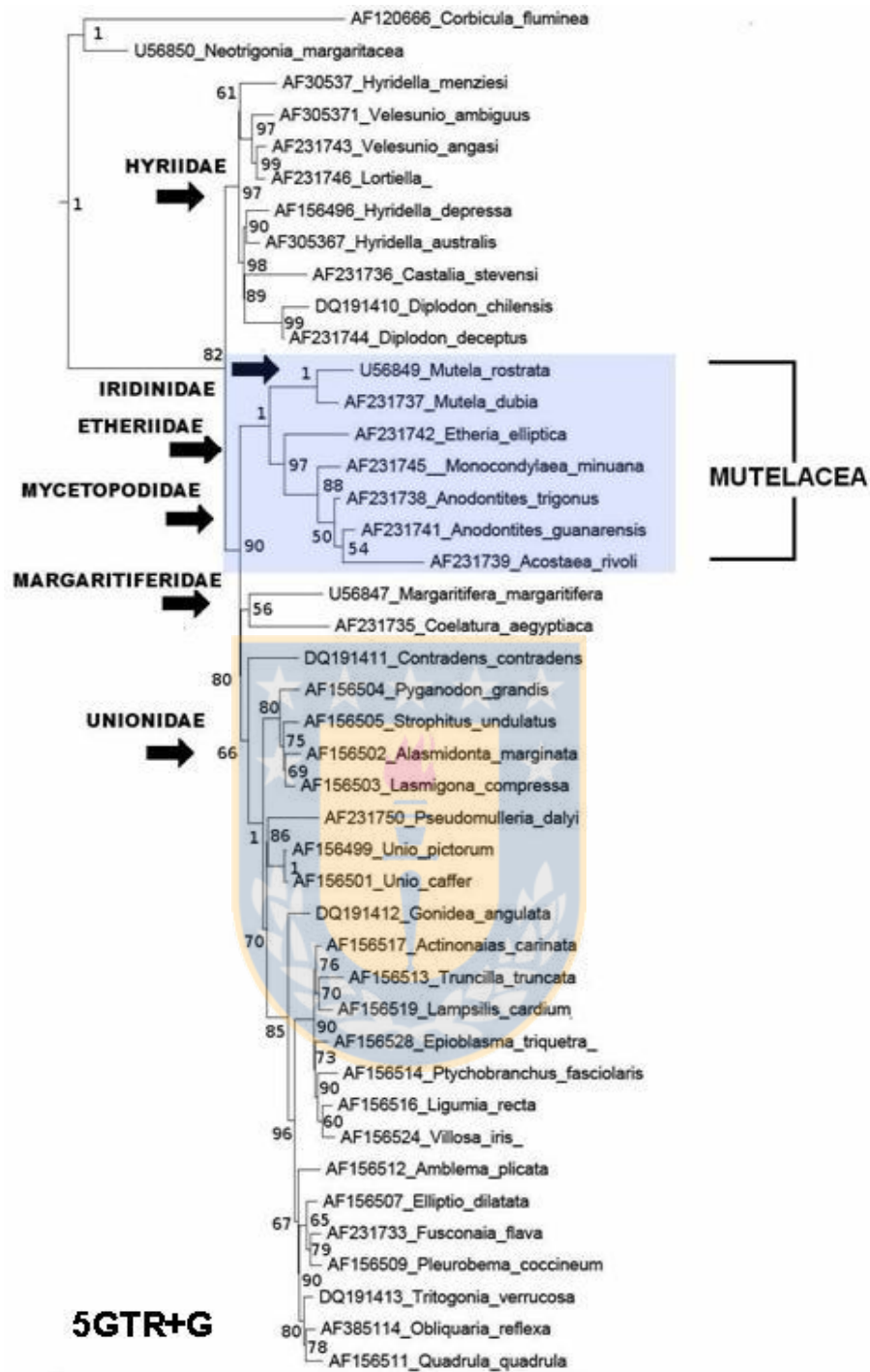


Figura 3: Árbol consenso bayesiano por regla de la mayoría de Unionoida en los nodos se muestran los valores de probabilidad a *posteriori*. Las flechas indican las familias de Unionoida.

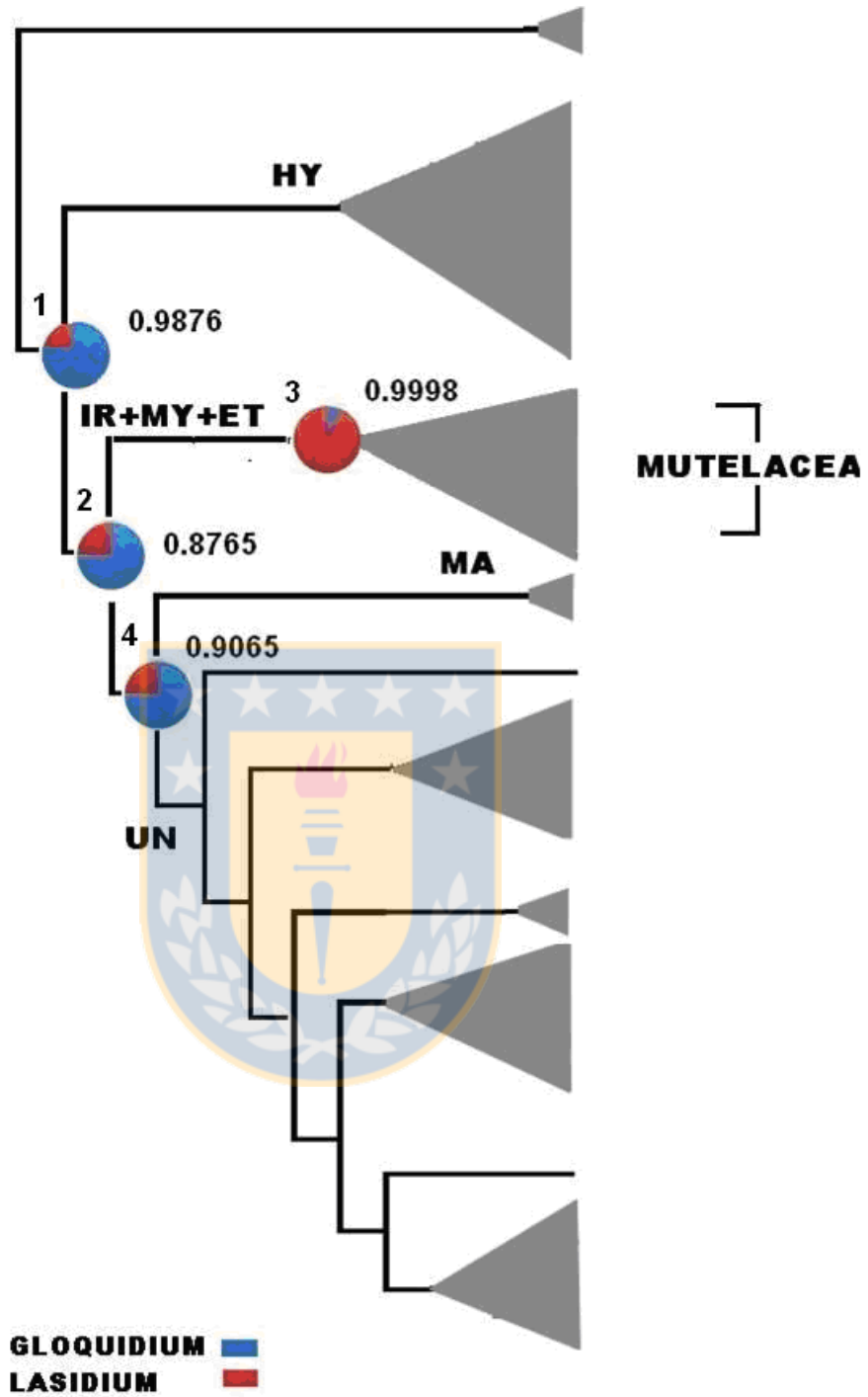


Figura 4: Árbol colapsado de Unionoida. Las gráficas de torta sobre los nodos numerados, muestran los valores de probabilidad de la reconstrucción de los ancestros.

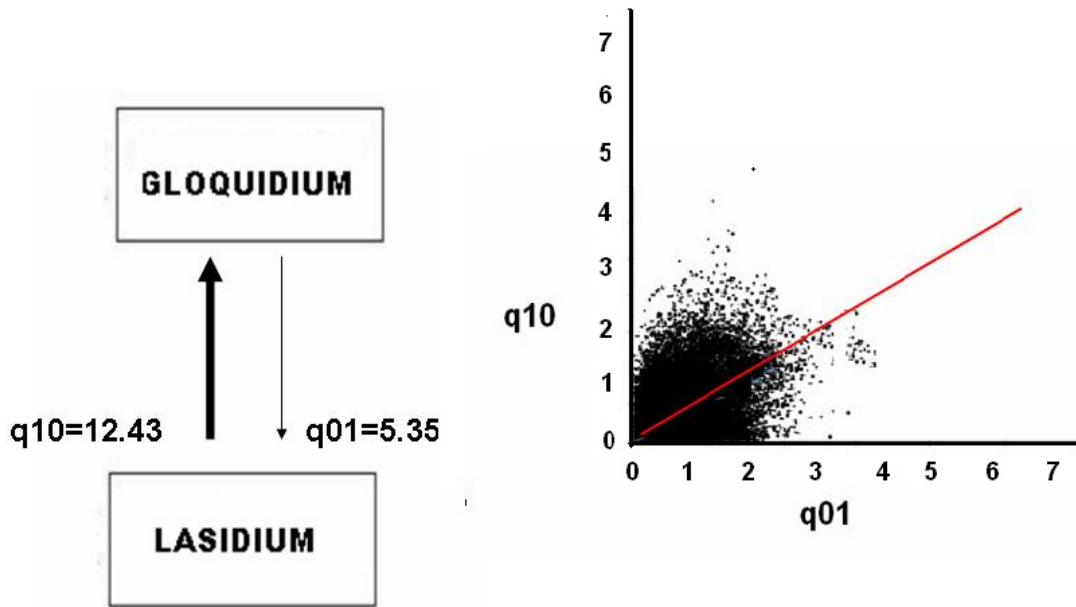


Figura 5. Tasas de transición (q_{xy}) de ganacia y pérdida de los rasgos, basado en las topologías y largos de rama de los árboles filogenéticos. El grosor de las flechas indica las transiciones de acuerdo a su frecuencia, izquierda gráfica de las tasas de ganacia q_{01} y perdida q_{10} del estado Gloquidium/Lasidium.

Evolución de las estrategias reproductivas en sphaeriidae: una tendencia al desarrollo directo

Resumen

Los sphaeriidos son organismos cosmopolitas, predominantes en ambientes bentónicos dulceacuícolas y desarrollo directo. Esta familia presenta el patrón más complejo de cuidado parental dentro de los Veneroidea, los que destacan en los Sphaeriinae: nutrición extraogonial, desarrollo directo, incubación de juveniles, eclosión del tipo sincrónico/asincrónico, dentro de sacos incubatorios o en la lamella ctenidial y embriones con velum o de tipo vestigial. En las últimas décadas, se han planteado numerosas hipótesis en relación a las tendencias evolutivas de estos caracteres de historia de vida, relacionándolos al desarrollo directo. Sin embargo, dos hipótesis predominan para explicar la evolución de estos rasgos en este grupo: La hipótesis larva primero (HLP) e hipótesis de intercalación (HI) y posteriormente la tendencia de estos rasgos explicada bajo la reversibilidad del carácter, conocida como la Ley de Dollo. Para evaluar estas hipótesis, se reconstruyó la filogenia molecular de los miembros de Sphaeriinae (Sphaeriidae), incluyendo una especie endémica nacional *Pisidium chilense*. Para someter a prueba las relaciones a nivel genéricas y evaluar el patrón evolutivo de todos los rasgos involucrados en el cuidado parental, se utilizó el método comparativo filogenético, en un marco bayesiano. Los resultados revelaron que la incubación sincrónica, ausencia de sacos incubatorios, velum y la condición ovovivípara son los estados ancestrales más probables de Sphaeriinae. Existe una tendencia, hacia la asincronía, presencia de sacos incubatorios, velum vestigial y condición euvivípara, rasgos actualmente presentes en *Pisidium* y *Musculium*. Las tasas de transición y las correlaciones evolutivas encontradas en todos rasgos, revelan una tendencia hacia el desarrollo directo y la hipótesis de que en los Sphaeriinae (Sphaeriidae), existió una larva primero (HLP) y sin reversibilidad, lo que apoya a la Ley de Dollo.

Palabras claves: Sphaeriinae, estrategias reproductivas, velum, Ley de Dollo.

Introducción

La familia Sphaeriidae, ha sido caracterizada por las complejas estrategias que presenta en su ciclo reproductivo, las cuales han sido bastantes estudiadas y han tenido un gran valor en sistemática (Burch 1975; Kuiper 1983; Heard 1977; Ituarte 1988, 1989). Entre estas destaca la modalidad de incubación dentro de la demibranchia, con liberación de ejemplares juveniles bénticos y la nutrición embrional (Odhner 1921; Heard 1965; Ituarte 1988; Korniushev 1991, 1996; Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000). Estos caracteres han permitido agrupar a 2 subfamilias dentro de Sphaeriidae: Euperiinae y Sphaeriinae. Euperiinae se caracteriza por un gran tamaño gonadal, tener huevos con gran contenido nutritivo, mientras que Sphaeriinae presenta pequeñas gónadas, y evidencia de transferencia de nutrición extraoogonial entre embrión y lamella ctenidial (Okada 1935; Mackie et al. 1974; Mackie 1978; McMahon 1991; Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000; Hetzel 1994). Esta nutrición del progenitor a la descendencia, tendría relación con la ausencia o bajo contenido nutritivo de los huevos, sugiriendo que los nutrientes son proporcionados al interior de los sacos por corrientes de hemolinfa, que bañan a los embriones mientras estos son incubados (Okada 1935; Heard 1977; Schwartz & Dimock 1998). Inclusive, las larvas incubadas en ambos grupos son diferenciables: Euperiinae presenta un gran desarrollo del velum y en el caso de Sphaeriinae este es reducido y su desarrollo ha sido interpretado como un carácter ancestral que precede una tendencia evolutiva al desarrollo directo en el grupo (Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000). En invertebrados marinos, la evolución del desarrollo directo desde un hipotético estado ancestral de larva planctotrófica, suele estar relacionado con modificaciones de estructuras involucradas en la nutrición y nado de la larva (Strathmann 1978; Hadfield & Iaea 1989; Emler 1994; Byrne 1995; Byrne & Cerra, 1996; Wray 1996; Hadfield et al. 1997). De este modo, la pérdida de complejidad larval, las modificaciones o pérdida de alimentación de las larvas o estructuras natatorias, son a menudo tan extremas, que una vez perdidas es imposible volver adquirirlas (Strathmann 1978).

Aunque el origen del desarrollo directo como estrategia de historia de vida requiere el conocimiento del estado ancestral, dos hipótesis dominan la opinión actual sobre el ciclo de vida ancestral de los bilaterales: la hipótesis de "larva-primeramente" (HLP) y la hipótesis de

"intercalación" (HI) (Nielsen 2009; Page 2009). Hasta hace poco la HLP era predominante, como ocurre en Sphaeriidae, sin embargo la HI puede ser un mejor modelo para interpretar el desarrollo de moluscos y otros lofotrocozoos (Page 2009), que evolucionan suprimiendo este rasgo. Esta hipótesis propone que los estadios larvales (planctotrófico o lecitotrófico) han evolucionado como especializaciones del ciclo de vida ancestral directo (Nielsen 2009). Por consiguiente, la HI sugiere que las estrategias de vida compleja de Sphaeriidae se derivan de una condición ancestral simple, que daría origen a las larvas planctónicas que nadan libremente. Si la HI es sustentada, en la evolución de las historias de vida en Sphaeriidae se produciría el aumento de la complejidad de los ciclos de vida de una manera irreversible, dado que la re-evolución de rasgos complejos se ha considerado poco probable (i.e. Ley de Dollo, Gould 1970). En general la primera propuesta respecto a los procesos re-evolución de pérdida de complejidad, como la pérdida de la complejidad larval, surgen de Simpson (1953). Esta es interpretada como irreversible, planteando que, una vez que esta complejidad ha sido perdida es imposible de recuperar, principio conocido como la Ley de Dollo *sensu stricto*. Según la propuesta el desarrollo directo, esta complejidad esta dada por el estado ancestral larvario planctotrofico, el cual requiere de múltiples estructuras y adaptaciones para sobrevivir independientemente de las otras etapas del ciclo de vida (Wray 1995; Smith 2001). La ley de Dollo, sugiere que la perdida del carácter complejo lleva consigo a una perdida de la arquitectura genética original y los mecanismos de desarrollo que subyacen al caracter, por lo que recuperar el caracter es irreversible si estos mecanismos no son conservados en el tiempo (Gould 1970; Goldberg & Iqic 2008). Sin embargo, existen ejemplos en literatura en que la ley de Dollo ha sido refutada en gasterópodos, en la re-evolución de caracteres considerados complejos como la espiralidad (e.g. Coolin & Cipriani 2003).

Otro aspecto interesante del modo de reproducción de Sphaeriidae, es la variación en la posición, grado de complejidad de las estructuras involucradas en la incubación y los tiempos de maduración del embrión (Cooley & Ó. Foighil 2000). En este sentido, la condición más simple respecto a la incubación y liberación de juveniles es encontrada en Euperiinae, donde la incubación es del tipo sincrónica. Aquí existe un sólo evento de eclosión y los embriones se encuentran libres en la lamella ctenidial, en el mismo estadio de desarrollo (Heard 1965; Mackie & Huggins 1976; Ituarte 1988). De acuerdo, a los estudios

de Dreher- Mansur & Meier-Brook (2000) y Korniuschin & Glaubrecht (2002), en Euperiinae no existen sacos incubatorios, por lo que la incubación ocurre en los tubos ctenidiales de la branquia. Sin embargo, especies de Sphaeriinae, representantes del género *Pisidium* también comparten incubación del tipo sincrónica, y que a diferencia de Euperiinae, los embriones son secuestrados en estructuras suprabranquiales (saco embrionario) conocidas como marsupio, que es una modificación de un sector de la lamella ctenidial (Heard 1965, 1977; Korniuschin 1991, 1996; McMahon 1991; Hetzel 1994). Otros géneros de Sphaeriinae, como *Sphaerium* y *Musculium* son asincrónicos, presentan incubación secuencial y liberación de juveniles mediante múltiples eventos de eclosión. De este modo coexisten adheridos a la branquia en distinto grado de desarrollo y encapsulados en sacos independientes (Heard 1965, 1977; Mackie et al. 1974; Morton 1985; Korniuschin 1991, 1996; Hetzel 1994).

Evaluar la evolución y las correlaciones de estos rasgos podrían potencialmente, aportar evidencia para someter a prueba hipótesis sobre las tendencias evolutivas del cuidado parental de Sphaeriidae, en su evolución a los ecosistemas dulceacuícolas. Al respecto, las primeras especulaciones sobre tendencias evolutivas en Sphaeriidae fueron planteadas por Meier-Brook (1970), quien basado en la morfología planteó que la tendencia de los Sphaeriidae, ha sido la reducción de algunos órganos y estructuras (i.e. dentición en la charnela, ligamento de las valvas, branquial, fusión de sifones, estómago y gónada), acompañado de una disminución en tamaño. En contraste, otros órganos según su planteamiento, ganarían relevancia (complejidad estructural-funcional), adquiriendo nuevas funciones u optimizando otras. Como por ejemplo el progresivo desarrollo del nefridio asociado a una intensificación en la osmorregulación, y en el caso de huevos sin tejido nutritivo la presencia de estructuras especiales para la nutrición extraoogonial y el surgimiento de múltiples sacos incubatorios. Estos planteamientos, fueron posteriormente sugeridos en los estudios filogenéticos de Korniuschin & Glaubrecht (2002), los cuales se basaron en la morfología.

Las complejas estrategias, que presenta Sphaeriidae en su ciclo reproductivo, ha sido el sustrato de estudio para interpretar la evolución del patrón de incubación y su relevancia en la adaptación a los ambientes dulceacuícolas (Korniuschin 1991; Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000; Cooley & Ó Foighil 2000; Lee & Ó Foighil 2003; Korniuschin &

Glaubrecht 2000; Korniushev & Glaubrecht 2006). Korniushev (1991, 1998), interpretó la incubación asincrónica como derivada, sin embargo, más tarde concluye que es ancestral, ambos estudios filogenéticos basados en caracteres anatómicos. De acuerdo a los análisis cladísticos de Dreher-Mansur & Meier-Brook (1992, 2000), la incubación asincrónica es la ancestral condición de Sphaeriinae y la del tipo sincrónica es adquirida secundariamente por los linajes de *Pisidium*.

Reconstrucciones filogenéticas posteriores, utilizando 16S rDNA abordaron directamente hipótesis relacionadas con la progresión evolutiva del cuidado parental en Sphaeriidae (Cooley & Ó Foighil 2000). Estos estudios, basados en métodos de parsimonia revelaron una tendencia hacia la complejidad desde la condición más simple descrita en Euperiinae, hacia el origen de la incubación en sacos embrionarios y la nutrición extroogonial, derivando hasta la última condición de la incubación secuencial, la que es típica en *Sphaerium/Musculium*. Posteriormente, Lee & Ó Foighil (2003) reconstruyen la filogenia de Sphaeriinae utilizando secuencias de los genes ITS-1 y 16 S, basados en Parsimonia y Máxima Verosimilitud, concluyendo respecto a la evolución temporal del modo de incubación, sosteniendo que la condición asincrónica sería derivada en relación a la sincrónica. Otro aspecto, que los autores concluyen es que la tendencia evolutiva de Sphaeriinae respecto a Euperiinae es la miniaturización y el gran tamaño de Euperiinae, representa la condición ancestral.

Una de las últimas interpretaciones evolutivas respecto a Sphaeriidae fue planteada desde los trabajos de Korniushev & Glaubrecht (2006). Estos autores, a partir de análisis morfológicos de *Pisidium (Parapisidium) reticulatum*, descubren que contrario a la regla que rige a los ejemplares del género *Pisidium*, en esta especie destaca la presencia de un músculo retractor rudimentario en el sifón inhalante. Esta especie, además presenta características que comparte con Euperiinae como: grandes huevos, gran contenido nutritivo, incubación en la lamela interna de la branquia. Sin embargo, con Sphaeriinae, comparte la presencia de sacos incubatorios y difiere respecto a la nutrición, la cual proviene de células de la pared del saco incubatorio. La filogenia, reconstruida por ambos autores plantea, que el modo reproductivo de esta especie es el eslabón entre la ovoviviparidad y euviviparidad, y que la ovoviviparidad es la condición ancestral en Sphaeriidae, existiendo una tendencia a la complejidad en las estructuras reproductivas. Sin

embargo, cabe destacar que el balance de ganar y perder estructura, la complejidad reproductiva como tal esta dada por supresión de estados larvales.

En la actualidad el sustento de las hipótesis planteadas respecto a la adopción y evolución de las estrategias reproductivas de Sphaeriidae esta basado sólo en el mapeo de caracteres sobre la filogenia en base a métodos sustentados en parsimonia. Esta aproximación que no considera potenciales procesos complejos de evolución que podría estar ocurriendo en este grupo, dado que sólo trabaja sobre la idea del menor número de cambios a través de la historia y no permiten contrastar hipótesis alternativas. Por lo cual, para evaluar el conjunto de hipótesis planteadas en las ultimas décadas en Sphaeriinae, es imprescindible el uso de métodos probabilísticos, que permitan someter a prueba y validar estadísticamente las hipótesis evolutivas planteadas para resolver e interpretar, los patrones reproductivos

En el presente estudio se evalúan estas hipótesis de la evolución de las estrategias reproductivas de Sphaeriidae, a través de la estimación de los ancestros comunes más recientes (MRCA) y la correlación evolutiva entre estos caracteres en un marco filogenético. Para ello, se construyó una filogenia molecular de los Sphaeriidae y se utilizó métodos comparativos filogenéticos en un marco Bayesiano para reconstruir los estados ancestrales, las tasas de transición en el tiempo y su correlación en la historia evolutiva del grupo. Adicionalmente, para el estudio de estos procesos se incorporan nuevos ejemplares sudamericanos de *Pisidium chilense* (d Orbigny 1846).

Basados en estos antecedentes de la historia de vida de Sphaeriidae, mediante los rasgos: velum vestigial, asincronía, presencia de sacos y euviviparidad, sometemos a prueba la hipótesis larva primero (HLP), con una tendencia al desarrollo directo. En segundo lugar, probaremos la reversibilidad de esta tendencia apoyando o rechazando la ley de Dollo, en el proceso evolutivo de Sphaeriidae con énfasis en los Sphariinae.

Materiales y método

1- Analisis de la anatomia ctenidial de *Pisidium chilense*

Para la observación y definición de las estructuras anatómicas de un nuevo ejemplar sudamericano de Sphaeriidae, *Pisidium chilense*, se fijaron en alcohol 70% con pastillas de mentol. Se utilizó lupa y microscopia óptica en algunos casos dependiendo de la resolución. La disección consistió en romper la concha presionándola suavemente entre las dos hojas de una pinza para extraer las partes blandas (Collado et al. 2011). Los tejidos se cortaron cuidadosamente con bisturí manual.

2-Extracción y obtención de secuencias de ADN

Respecto a Sphaeriidae se obtuvieron secuencias del gen ribosomal nuclear del primer espaciador interno (ITS-1) desde Genbank de 44 especies. El grupo interno estuvo conformado por 42 especies representativas de los géneros *Musculium*, *Pisidium* y *Sphaerium* (Sphaeriinae) y el grupo externo por *Eupera cubensis* y *Eupera platensis* (Euperiinae) con un tamaño de secuencias de 645 bp. (Tabla I). La secuencia incorporada de un ejemplar de *Pisidium chilense*, fue obtenida de un ejemplar colectado desde Chile, Región del Bío-bío, Laguna chica de San Pedro (73° 05' S; 73°10' O), y conservado en alcohol al 95%. Las extracciones de *Pisidium* se realizaron, con el ejemplar completo incluyendo la concha, mediante el protocolo CHELEX. Este consiste en 2 ul de Proteinasa K de concentración 10 microgramos/microlitros en agua miliQ y 150 ul de Chelex.

Para la posterior amplificación se utilizaron los primers del gen ITS-1 descritos por White et al. (1996). La amplificación de Sphaeriidae se realizó con un protocolo “touchdown”, siguiendo las siguientes condiciones: una temperatura inicial de 65 °C la que disminuye cada 2°C por ciclo hasta alcanzar una temperatura 50-55°C durante 35 ciclos. Los productos de PCR amplificados, fueron separados en un gel de agarosa a 1% en buffer (TAE). Los amplificados se enviaron para su posterior secuenciación a Macrogen (Korea) y posteriormente fueron editadas con CodonCode Aligner v 4.04 Demo

3-Reconstrucción filogenética

Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL X versión 2.0 (Larkin et al. 2007). Los valores de los parámetros de alineamiento usados fueron los especificados (gap opening penalty=15, gap extensión penalty=6.6 y delay divergent sequences=30). Los gaps en la secuencia fueron tratados como datos faltantes. Luego de la edición y alineamiento se evaluó la calidad de las secuencias para los análisis filogenéticos mediante el test de saturación desarrollado por Xia et al. (2003) e implementado en el programa DAMBE 4.2 (Xia & Xie 2001). Esta prueba estima un índice de saturación de las secuencias (Iss) y lo compara con un índice de saturación crítico (Iss.c) generado mediante un proceso de aleatorización con un 95% de confianza (Xia 2000; Xia & Lemey 2009; Xia & Xie 2001).

Para estimar la probabilidad *a posteriori* de los árboles filogenéticos, se utilizaron Cadenas de Markov Monte Carlo con inferencia bayesiana (BMCMC). El método BMCMC, asegura que los árboles sean muestreados de acuerdo a su probabilidad de ocurrencia, utilizando un modelo de evolución de secuencias. Para considerar en el análisis la heterogeneidad en las tasas y patrones de evolución se utilizaron modelos mixtos según lo descrito por Pagel & Meade (2004), basados en el modelo General de tiempo reversible (GTR; Rodríguez et al. 1990). Los modelos mixtos, permiten detectar diferentes patrones de evolución en las secuencias, sin el conocimiento *a priori* de esos patrones ni necesidad de particionar los datos. El procedimiento Reversible Jump Markov Chain Monte Carlo (RJMCMC) fue utilizado para encontrar el número de matrices GTR + G del modelo mixto que mejor se ajustó a los datos. Esta aproximación permite explorar diferentes modelos de evolución (en este caso número de matrices GTR + G) y sus respectivos parámetros, convergiendo en el modelo que mejor se ajusta a los datos en la muestra de árboles (Pagel & Meade, 2008). Nueve cadenas independientes fueron corridas, generando aproximadamente 100.000.000 árboles filogenéticos mediante el método RJBMCMC, muestreando cada 10.000 árboles para asegurar la independencia de los muestreos. Se escogió una de las cadenas que convergieron en la misma zona (*i.e.* tuvieron la misma probabilidad *a posteriori*), quitando

los primeros 1000 árboles que estaban fuera de la zona de convergencia de la cadena de Markov. Finalmente, se remuestro cada 29 árboles obteniendo una muestra de 269 árboles no autocorrelacionados ($p < 0.0001$). Estos análisis se llevaron a cabo en el software Bayes Phylogenies v 1.0 (Pagel & Meade 2004) y las autocorrelaciones parciales en el software Statistica v 7 (Statsoft Inc. 2001). La topología de consenso y los valores de probabilidad a *posteriori* (PP) fueron calculados y visualizados en el programa Bayes Trees 1.0 (Meade & Pagel 2009).

4-Evolución de las estrategias reproductivas

Para testear las hipótesis respecto de las tendencias evolutivas del desarrollo directo (HLP vs. HI) y un aumento en complejidad estructural y funcional en el ciclo reproductivo en la metamorfosis de Sphaeriidae, primero se determinó la asociación entre los rasgos de interés y su distribución en la filogenia o señal filogenética. Para esto se estimó el Índice de Asociación (IA) según lo propuesto por Parker et al. (2008) en el software BaTS 1.0. El IA fue utilizado en un marco bayesiano en la muestra de árboles obtenida del análisis filogenético. Este índice mide la autocorrelación filogenética en caracteres discretos o multiestado, es decir, evidencia estadísticamente si especies cercanas filogenéticamente (mismos clados), tienden a parecerse entre sí más que lo esperado por puro azar (Blomberg et al. 2003). En este análisis la hipótesis nula es que los estados de un rasgo (e.g. modo de desarrollo) están aleatoriamente distribuidos en la filogenia, o la falta de asociación entre la historia de ancestro-descendencia de los linajes (estructura de clados monofiléticos) y la variable analizada (Hernández et al. 2013). Nosotros evaluamos la significancia estadística de la distribución de valores IA observados en la muestra de árboles comparándola con la distribución de probabilidades nula de valores de IA obtenida de un total de 20.000 aleatorizaciones. Este índice se seleccionó por ser de mejor resolución, poder estadístico y menor error tipo I, en relación a otros estadísticos propuestos (Parker et al. 2008). Una vez evaluada la señal filogenética de los rasgos de historia de vida se estimó los estados ancestrales a través del cálculo del más reciente común ancestro (MRCA) en cada nodo. Para determinar, como variaban estos rasgos a lo largo de la filogenia se calcularon las tasas de transición (tasas restringidas - tasas calculadas), y de ganancia v/s pérdida (q_{0-1} y q_{1-0}) de un

estado a otro. Para estas estimaciones se utilizó una distribución “exponential hyperprior (0,100)”. Se utilizó el Factor de Bayes (FB) para comparar las tasas de transición mencionadas anteriormente. Este factor permite comparar las distribuciones de probabilidad *a posteriori* de los modelos *i* o *j*. Este factor es obtenido desde el software Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond 2009).

$$BF_{ij} = P(\text{DFM } i) / P(\text{DFM } j)$$

Los autores Kass & Rafteri (1995), sugieren que valores de 3-20 son tomados como evidencia positiva a favor del modelo (M_i), valores de 20-150 son considerados como fuerte evidencia a favor del modelo (M_i) y valores mayores a 150 como evidencia muy fuerte. Respecto a valores < 3 , entregan evidencia a favor del modelo (M_j). Para ambos análisis se usó el software BayesTraits V 1.0 Pagel & Meade (2009), el cual permite realizar análisis de la evolución de rasgos entre grupos de especies a partir de una muestra de filogenias. BayesTraits utiliza Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) para obtener distribuciones *a posteriori*, estimar los parámetros del modelo estadístico y los valores correspondientes a los estados de carácter en los nodos ancestrales de las filogenias basado en el modelo de Markov de tiempo continuo, el cual permite reconstruir la forma que adoptan los rasgos, con un número finito de estados discretos, evolucionando en los árboles filogenéticos (Pagel et al. 2004). Los rasgos discretos fueron codificados como caracteres binarios 0 y 1, (i.e. sincronía = 0 y asincronía = 1, ovoviviparia = 0 y euviviparia = 1, y velum funcional = 0 y velum vestigial = 1). Los estados de carácter ausencia de sacos, un saco y múltiples sacos fueron codificados como 0, 1 y 2 respectivamente.

5-Evolución correlacionada entre rasgos reproductivos

El análisis de evolución correlacionada, compara el ajuste de dos modelos de evolución uno en el que los dos rasgos evolucionan independientemente en el árbol (Discrete: Independent model), y el otro en el que evolucionan de manera correlacionada (Discrete: Dependent model) escogiendo el módulo Bayes Discrete en el software BayesTraits V 2.0 de Pagel & Meade (2013). Este módulo tiene implementado entre sus metodologías el procedimiento

Reversible Jump Markov Chain Monte Carlo (RJ MCMC), que permite explorar un amplio número de variaciones de modelos tanto Dependientes como Independientes (Pagel & Meade 2006).

Para analizar la evolución correlacionada entre pares de rasgos binarios discretos (0 y 1.), se comparo el ajuste de los modelos de evolución dependiente e independientes, utilizando estadística bayesiana en el programa BayesTraits v 1.0 (Pagel & Meade 2013).. Se corrieron tres cadenas independientes con 50.000.000 iteraciones. Repitiendo este análisis seis veces considerando que las medias armónicas son inestables. Las medias armónicas obtenidas de cada modelo, se compararon posteriormente mediante el Factor de Bayes (BF), en el software Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond 2009). Para establecer estas correlaciones pareadas, entre rasgos binarios se modifico la correlación realizada entre sincronía y presencia de sacos (tres estados), por sacos (0) y múltiples sacos (1).

Resultados

1-Observación y analisis de la anatomía interna de *Pisidium chilense*

Se observaron muestras de tejido ctenial completo de las branquias con forma laminar, de *Pisidium chilense* en el cual destacan algunos sacos embrionarios. En su interior e observan larvas encubadas algunas al limite de la eclosión. Estas presentan diversos tamaños, las que están contenidas en diversos sacos. Embriones no son observados.

2-Análisis filogenético

El test de saturación mostró que las secuencias son óptimas para la reconstrucción filogenética (Iss=0.5678 < Iss.c=0.7896, p = 0.002).

Los resultados obtenidos a partir del método RJMCMC muestran que el modelo que mejor se ajustó a la evolución de las secuencias y describe las relaciones filogenéticas es 3 GTR+G. La reconstrucción filogenética mostró valores de probabilidad *a posteriori* sobre 80 % para los principales clados estudiados y permite recuperar un clado monofilético para Sphaeriinae Nodo: 1 PP= 98. Dentro de este clado es posible reconocer dos grupos monofiléticos para *Pisidium* Nodo: 2; PP= 99 y *Musculium*, Nodo 5; PP=.98 *Sphaerium* es

parafilético respecto a *Musculium*, el cual se encuentra anidado dentro de *Sphaerium* (Fig.1). El estadístico IA, muestra valores significativos ($p < 0.005$) para los rasgos viviparia, velum, tipo de reproducción y sacos incubatorios (IA = 1.2, 2.8, 1.05 y 3.04, respectivamente), por lo que se rechaza la hipótesis nula de un rasgo aleatoriamente distribuido en la filogenia, existiendo fuerte evidencia de asociación entre el rasgo y la historia filogenética.



3-Reconstrucción estados ancestrales de los rasgos reproductivos evaluados.

Las reconstrucciones de los estados ancestrales para los rasgos asociados a las estrategias reproductivas revelan que el MRCA de Sphaeriinae según sus valores de probabilidad *posteriori* (pp) corresponden a: un ancestro con velum funcional (Fig.2; Nodo 2; PP= 0.5883), reproducción del tipo sincrónica (Fig. 3; Nodo 2; PP= 0.8333), ovoviviparidad (Fig.5; Nodo 6; PP= 0.7983) y 1 saco embrionario (Fig.6; Nodo 2; PP= 0.591).

Estos rasgos a lo largo de la filogenia, revelan que existe una progresión evolutiva hacia la reducción del velum (Fig.4; Nodo 8; PP= 0.99748), reproducción del tipo asincrónica (Fig. 4; Nodo 8; pp: 0.9898); euviviparidad (Fig.5; Nodo8; PP= 0.89701) y múltiples sacos (Fig.6; Nodo 8; PP= 1), rasgos que se manifiestan y emergen, en su totalidad en el clado de los miembros de *Musculium*.

En todos los rasgos evaluados, existen diferencias significativas respecto a las tasas de transición (tasas restringidas y calculadas), valor obtenido de $FB > 3$. Las tasas calculadas $q_{01} \neq q_{10}$, revelan que existe una tendencia a la ganancia de los rasgos evaluados $q_{01} > q_{10}$. De acuerdo a las tasas de ganancia de cada rasgo, existiría una tendencia hacia un velum vestigial $q_{01} = 5.56$; (FB): 8.04, euviviparidad, $q_{01} = 23.87$; (FB): 3.92, sincronía $q_{01} = 12.65$; (FB): 5.65 y múltiples sacos de incubación $q_{01} = 6.34$; (FB): 4.25.

4-Evolución correlacionada entre rasgos reproductivos y las vías de transición

Respecto a la determinación de correlación evolutivas entre los pares de rasgos binarios (0,1), basada en la comparación de las medias armónicas del Modelo Independiente (Mhj) y Modelo Dependiente (Mhj), mediante el Factor de Bayes (FB), se sustenta al Modelo Dependiente ($FB > 3$), es decir, la correlación de todas estas estrategias involucradas en la evolución a favor del desarrollo directo han cambiado correlacionadamente a través de la historia filogenética del grupo reforzando la hipótesis planteada (Tabla II). Las correlaciones entre los rasgos reproductivos sugieren la asociación evolutiva entre el cambio de estos rasgos y un sentido en la dirección del cambio. Estos cambios son sustentados por los valores de sus tasas de transición más probables, hacia la ganancia de

ellos y asociado con valores de probabilidad mas bajos hacia la perdida de ellos. La tasa de transición mas probable entre ausencia de sacos y velum funcional es $q_{13}= 56.78$, es decir un cambio del rasgo hacia la presencia de sacos, determino un cambio hacia un velum vestigial $q_{34}= 40.32$.

La misma ruta de transición es sugerida para la correlación evolutiva entre los rasgos ausencia de sacos y ovoviviparidad, cuyo cambio procedió hacia la presencia de sacos dando origen a la euviviparidad $q_{34}= 40.65$. Respecto a la ausencia de sacos (sacos reducidos igualmente codificados) y la sincronía, se obtuvieron valores mas altos desde la transición ausencia de sacos y sincronía, $q_{13}=56.87$, en donde un cambio en el numero de sacos, conlleva a un cambio a la condición asincrónica $q_{34}= 35.78$. Sin embargo en esta vía evolutiva, es posible distinguir algunas tasas de transición alternativas $q_{12}=34.56$, definida entre la ausencia de sacos y asincrónico, hacia ausencia de sacos y sincrónico.

Respecto al velum funcional y ovoviviparidad, la ruta de transición mas probable es $q_{12}= 34.76$ hacia velum funcional y euviviparidad, en donde un cambio a la euviviparidad produce el cambio a un velum vestigial $q_{24}= 45.4$. De estas correlaciones, podemos distinguir que existen valores para apoyar la ruta de transición ($q_{34}= 30.24$ y $q_{43}= 35.67$), en el cambio hacia un velum vestigial, pero asociado a la ovoviviparidad.

En relación al velum funcional y el tipo de reproducción sincrónica la ruta de transición mas probable es $q_{12}= 38.07$, hacia un velum funcional pero asincrónico y posteriormente es sustentada la tasa de transición $q_{24}= 45.09$ es decir, un cambio en el tipo de reproducción determino un cambio hacia la adquisición de un velum vestigial. Aunque también, se sugiere la tasa de transición alternativa $q_{43}= 30.56$, como una vía probable que seria un velum vestigial pero sincrónico, desde un velum vestigial asincrónico.

Finalmente, entre la condición ovoviviparidad y tipo reproducción las rutas de transición propuesta son $q_{12}= 57,85$ y $q_{24}= 50.12$, es decir un cambio a la asincronía, llevo asociado un cambio la euviviparidad (Fig. 6, 7 y 8).

Discusión

Nuestros resultados basados en la reconstrucción MRCA sugieren que el antepasado de los Sphaeriinae carecía de sacos de incubación, tipo de reproducción sincrónica, ovovivíparos y una larva de vida libre (Pediveliger), lo que es evidenciado por la presencia de un velum, cuyas funciones en algunos grupos ha variado, hasta transformarse en una estructura extremadamente rudimentaria (clado *Musculium*).

Estos antepasados fueron progresivamente perdiendo esta fase de la metamorfosis durante su desarrollo para adquirir el desarrollo directo e incubación, como una estrategia de colonización, diversificación y adaptación a ambientes extremos como lo son los dulceacuícolas (Schwartz & Dimock 2001). Actualmente algunos grupos dentro del orden (Corbiculidae) retienen la larva y el desarrollo directo, evaluado mediante evidencia filogenética, por lo que son sugeridos como posibles ancestros de los Sphaeriidae (Korniushin & Glaubrecht 2003; Hallan et al. 2013). Estos antecedentes y los resultados obtenidos de las estimaciones ancestrales de todos los rasgos estudiados, nos llevan a sustentar la hipótesis HLP propuesta para los Sphaeriinae.

Hipótesis larva primero, estados ancestrales, tasas de transición de las estrategias reproductivas individuales y las múltiples interpretaciones adaptativas hacia el desarrollo directo.

Para algunos autores el evento clave hacia el desarrollo directo, es la adquisición de sacos para la incubación ctenidial (Okada 1935; Mackie et al. 1974; Mackie 1978; McMahon 1991; Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000; Hetzel 1994), a partir de este evento se habrían desencadenado una serie de modificaciones funcionales y estructurales para la retención larval.

Con respecto a la presencia y ausencia de sacos incubatorios, rasgo que agrupa en clados a Sphaeriinae y Euperiinae, la presencia de sacos se habría originado a partir de un ancestro, sin sacos incubatorios según el MRCA del grupo. De acuerdo a lo que muestran los datos, existiría una tendencia a la presencia de múltiples sacos incubatorios con embriones independientes y con sacos conteniendo diferentes estados de desove. Este clado, estaría

representado actualmente por los miembros de *Musculium* y *Sphaerium*. La adquisición de este rasgo, tiene como ventaja que los organismos tengan la facultad de presentar varios eventos reproductivos, durante el año (Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000, Cooley & Ó Foighil 2000 y Lee & Ó Foighil (2003).

Para el rasgo viviparidad (rasgo que implica el tipo de nutrición embrional), dos clados emergen, al observar la evolución de estos rasgos sobre la filogenia es posible agrupar a todos los Euperiinae dentro de los individuos ovovivíparos y a los Sphaeriinae como euvivíparos. Se observa además, que la euviviparidad es una tendencia, cuyo MRCA basado en los valores de probabilidad, es un organismo ovovivíparo. Estos resultados obtenidos son contrastantes, con las reconstrucciones filogenéticas de Cooley & Ó. Foighil (2000), quienes sugieren que el estado ancestral del tipo de nutrición de Sphaeriinae es la extraoogonial. Según algunos autores, bajo una perspectiva adaptativa, la falta de contenido nutritivo en los embriones es típica en grupos que desarrollan larva lo cual, es evidencia a favor del desarrollo directo. Otro aspecto de interés es que los euvivíparos a diferencia de los ovovivíparos, presentan pequeñas gónadas, evidencia de transferencia de nutrición extraoogonial entre embrión y lamella ctenidial del progenitor (Okada 1935; Mackie et al. 1974; Mackie 1978; McMahon 1991; Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000; Hetzel 1994). Esta nutrición del progenitor a la descendencia (matrotrofia), tendría relación con la ausencia o bajo contenido nutritivo de los huevos (yema o vitelo), sugiriendo que los nutrientes son proporcionados al interior de los sacos a través de la pared del marsupio, por corrientes de hemolinfa que llevan albúmina y que bañan a los embriones, mientras estos son incubados (Okada 1935; Heard 1977; Schwartz & Dimock 1998). Hetzel (1993), proporciono evidencia a través de cortes histológicos y microscopía electrónica para el transporte nutritivo desde el tejido materno a los embriones o larvas, demostrando la existencia de estructuras marsupiales que incluso eran bastantes especializadas que permitan este intercambio, a diferencia de las que tienen desarrollo larval de vida libre que carecen de estas estructuras (korniushin & Glaubrecht 2003).

Respecto a la presencia de velum, que es un rasgo ligado al estado larval, en algunos grupos marinos con desarrollo directo, este rasgo ancestral es readquirido funcionalmente (Collin et al 2007). Nuestros resultados, sustentan una tendencia a la reducción del velum, permitiendo agrupar a Euperinae dentro del clado de los que presentan un velum mas

desarrollado (respecto a la banda ciliar), pero con limitada funcionalidad y a Sphaeriinae que tiene el carácter de rasgo vestigial no funcional. Nuestros resultados, son concordantes con la propuesta de Dreher-Mansur & Meier-Brook (2000) y Korniuschin & Glaubrecht (2003), evidenciando que de este rasgo permanece solo un relicto vestigial de la condición larval. ancestral En invertebrados marinos, la evolución del desarrollo directo desde un hipotético estado ancestral de larva planktotrofica, suele estar relacionado con modificaciones de estructuras involucradas en la nutrición y nado, representada por esta banda ciliar (Strathmann 1978; Hadfield & Iaea 1989; Emler 1994; Byrne 1995; Byrne & Cerra, 1996; Wray 1996; Hadfield et al. 1997). Por ejemplo, en los equinodermos, en donde los estudios han sido numerosos, se ha establecido que en aquellos grupos que presentan larvas consumidoras, la banda ciliar del velum se encuentra dispuesta en loops, distribuida transversalmente y en las no consumidoras, adoptan una posición de un cuerpo cilíndrico (Emler 1994). Se plantea que esta disposición, es para maximizar la eficiencia alimenticia en las larvas planktotroficas y en las no consumidoras maximizar la capacidad natatoria (Emler 1994). Sin embargo, en los Sphaeriidae carentes de veliger planctónica, es posible observar bandas ciliadas pequeñas alrededor de la boca en algunos estadios de la larva incubada, cuya función estaría limitada a la nutrición parcial y no al nado (Ziegler 1885; Okada 1937; Meier-Brook 1970; Heard 1977; Dreher Mansur & Meier-Brook 2000). Estos datos aportan a evidenciar la progresiva pérdida de la condición larval en Sphaeriidae.

Finalmente respecto al tipo de incubación los resultados muestran que este carácter permite agrupar solo dentro de Sphaeriinae incubadores sincrónicos y asincrónicos. Nuestros análisis permiten reconocer como MRCA a los incubadores sincrónicos, incluyendo a los miembros de *Pisidium*, ancestro a partir de los cuales se habrían originado los incubadores asincrónicos, representados por *Sphaerium* y *Musculium*. Este patrón concuerda con las hipótesis de varios autores (Dreher-Mansur & Meier-Brook 1992, 2000, Cooley & Ó Foighil 2000 y Lee & Ó Foighil (2003). Estos autores, al igual que nuestro aporte concluyen que existe una progresión evolutiva desde la condición más simple que es la sincronía (MRCA), hacia los incubadores asincrónicos, con tendencia a la complejización y adquisición de múltiples sacos incubatorios, conocidos como incubadores secuenciales. También, se ha relacionado, adicionalmente este carácter, con la reducción de tamaño o

miniaturización correlacionándola con la reducción de algunas estructuras, como lo observado en miembros de *Pisidium* (Meier-Brook 1970, 1977; Korniuschin 1998 ab; Dreher-Mansur & Meier- Brook 2000; Korniuschin & Glaubrecht 2002). La asincronía y relación del tamaño corporal, según Lee & Ó Foighil (2003) sugieren que los Sphaeriinae representan un clado, cuyos rasgos como la asincronía, múltiples sacos y tendencia a un mayor tamaño corporal embrional serían caracteres derivados. El tamaño de los huevos es evidencia a favor del desarrollo directo (Smith et al. 2007). Respecto a la asincronía y relación del tamaño corporal, Lee & Ó Foighil (2003), sugiere que los Sphaeriinae representan un clado, cuyos rasgos como la asincronía, múltiples sacos y tendencia a un mayor tamaño corporal serían caracteres derivados.

Otros autores como Cooley & Ó Foighil (2000), señalan que el cuidado parental y las estructuras reproductivas involucradas (numero de sacos, tamaño del huevo, matrotrofia y vitelo), podrían reflejar la adaptación a un ciclo de oogenesis acelerada y un desarrollo embrionario mas corto. Wray (1996), menciona al respecto, que todos los rasgos involucrados en procesos de metamorfosis acelerada, obedecen a un proceso de selección pasiva de aquellos rasgos relacionados con la alimentación. Según Smith et al. (2007), esto se relaciona con un acortamiento en el proceso de metamorfosis siendo una adaptación que obedece a presiones selectivas, relacionadas a la nutrición y la disponibilidad de alimento.

Los organismos, que viven en cuerpos de agua dulce efimeros, suelen tener acelerados ciclos reproductivos y del desarrollo (Denver 1997), para estos grupos la adquisición de tales adaptaciones, son una respuesta a las presiones selectivas, asociadas a la colonización de estos hábitats. Sin embargo, este planteamiento, no explica el amplio rango de ambientes habitados por este grupo de bivalvos (Cooley & Ó Foighil 2000).

Los resultados obtenidos de las probabilidades de las tasas de transición (q_{01} vs q_{10}), sugieren una tendencia a la ganancia de los rasgos a lo largo de la evolución de Sphaeriinae de: múltiples sacos, velum vestigial, euviviparidad y tipo reproducción asincrónica.

Evolución correlacionada, rutas de transición, reversibilidad del carácter y Ley de Dollo

Respecto a las rutas de transición evolutiva de los rasgos considerados, los valores de probabilidad muestran valores mayores hacia las tasas de ganancia (q_{01}) y sus correlaciones evolutivas basados en las tasas de transición, revelan que existe una tendencia hacia la adquisición de nuevos rasgos. Esto sugiere, que todos estos rasgos están asociados, es decir que el cambio de un rasgo a través de la historia evolutiva, influye sobre el cambio del otro, por lo que son claves en la evolución hacia una tendencia general, en apoyo del desarrollo directo de Sphaeriinae. En relación a la direccionalidad del cambio, la presencia de sacos determinó el cambio hacia el desarrollo de un velum vestigial, la euviviparidad y el tipo de incubación asincrónica. A su vez, el cambio de un velum vestigial condicionó la aparición de la euviviparidad y la asincronía. Finalmente, el cambio de la ovoviviparidad hacia la euviviparidad condicionó un cambio hacia la asincronía.

Cabe destacar que son muy poco probables las rutas de transición alternativas altamente sustentadas, por lo que el sentido del cambio hacia las tasas de pérdida del rasgo son las menos probables. Esto nos conduce, a apoyar la Ley de Dollo en el proceso de evolución de Sphaeriinae, aceptando que la tendencia es la pérdida de la complejidad en el proceso de desarrollo del ciclo de vida de manera irreversible, durante la metamorfosis.

Finalmente, se plantea la hipótesis (Fig. 9), que: durante la colonización de nuevos ambientes como los dulceacuícolas el ancestro de esta familia presento larva (pediveliger), la que fue perdida progresivamente cuando estos bivalvos comienzan a utilizar sus ctenidios para incubar. Asociado a este evento, se producen una serie de cambios que fueron claves y generaron drásticos cambios morfológicos y de las estrategias reproductivas (velum rudimentario, sacos incubatorios, euviviparidad y asincronía reproductiva), los que se encuentran vinculados mediante las correlaciones evolutivas planteadas, favoreciendo de esta forma el desarrollo directo como estrategia de sobrevivencia en este grupo de bivalvos.

Bibliografía

BLOMBERG, S. P., T. GARLAND, JR & A. R. IVES. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* 57:717-745.

BYRNE M (1995). Changes in larval morphology in the evolution of benthic development by *Patiriella exigua* (Asteroidea: Asterinidae), a comparison with the larvae of *Patiriella* species with planktonic development. *Biol. Bull.* 188: 293–305.

BURCH JB (1975). Freshwater sphaeriacean clams (Mollusca: Peleypoda) of North America. Malacological Publications, Hamburg, Michigan, U.S.A.

BYRNE M & A CERRA (1996). Evolution of intragonadal development in the diminutive asterinid sea stars *Patiriella vivipara* and *P. parvivipara* with an overview of development in the Asterinidae. *Biol. Bull.* 191: 17–26.

COLLADO GA, M A. MÉNDEZ & L SERGIO (2011). Morfología peniana y taxonomía de especies chilenas del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda: Cochliopidae) junto a una revisión de los ejemplares tipo del Museo Nacional de Historia Natural de Chile *Amici Molluscarum*, Número especial: 49-58

COLLIN R & R CIPRIANI (2003). Dollo's law and the re-evolution of shell coiling *Proc. R. Soc. Lond. B* 270, 2551–2555.

COOLEY LR & D O FOIGHIL (2000). Phylogenetic analysis of the Sphaeriidae (Mollusca: Bivalvia) based on partial mitochondrial 16S rDNA gene sequences. *Invert. Biol.* 119: 299–308.

DENVER RJ (1997). Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis *Amer. Zool.* 37:172-184.

DREHER-MANSUR MC & C MEIER-BROOK (1992). Morphology of *Eupera* Bourguignat, 1854 and *Byssanodonta* Orbigny, 1843 and the phylogenetic affinities within the family Sphaeriidae (Bivalvia, Veneroida). In: Abstracts of the 11th International Malacological Congress. Giusti F & Manganelli G, eds., pp. 335-336, *Unitas Malacologica*, Siena.

DREHER-MANSUR MC & C MEIER-BROOK (2000). Morphology of *Eupera* Bourguignat, 1854 and *Byssanodonta* Orbigny, 1846 with contributions to the phylogenetic systematics of Sphaeriidae and Corbiculidae (Bivalvia, Veneroida). *Arch. Molluskenkunde* 128:1-59.

DUDGEON D (1989). Ecological strategies of Hong Kong Thiaridae (Gastropoda: Prosobranchia). *Malacological Review* 22: 39–53.

EMLET RB (1994). Body form and patterns of ciliation in non-feeding larvae of echinoderms—functional solutions to swimming in the plank-ton. *Am. Zool.* 34: 570–585.

GLAUBRECHT M (1996). *Evolutionsökologie und Systematik am Beispiel von Süß- und Brackwasserschnecken (Mollusca: Caenogastropoda: Cerithioidea): Ontogenese-Strategien, Paläontologische Befunde und Historische Zoogeographie.* Leiden: Backhuys.

GLAUBRECHT M (1999). Systematics and the evolution of viviparity in tropical freshwater gastropods (Cerithioidea: Thiaridae sensu lato) — an overview. *Courier Forschungs-Institut Senckenberg*, 215, 91– 96.

GOLDBERG, E. E. & B. IGIC', 2008. On phylogenetic tests of irreversible evolution. *Evolution* 62: 2727–2741.

GOULD, S. J., 1970. Dollo on Dollo's Law: irreversibility and the status of evolutionary laws. *Journal of the History Biology* 3: 189–212.

GRAF D (2013). Patterns of Freshwater Bivalve Global Diversity and the State of Phylogenetic Studies on the Unionoida, Sphaeriidae, and Cyrenidae. *American Malacological Bulletin* 31(1): 135–153.

GRAHAME J & G M BRANCH (1985). Reproductive patterns of marine invertebrates. *Oceanogr. mar Biol. A. Rev.* 23: 373-398

KUIPER J G 1983. The Sphaeriidae of Australia. *Basteria, Leiden* 47: 3-52.

HADFIELD MG & DK IAEA (1989). Velum of encapsulated veligers of *Petalconchus* (Gastropoda), and the problem of re-evolution of planktotrophic larvae. *Bull. Mar. Sci.* 45: 377–386.

HALLAN A, COLGAN DJ, ANDERSON LC, GARCIA ADRIANA & AR CHIVAS (2013) . A single origin for the limnetic-euryhaline taxa in the Corbiculidae (Bivalvia) *Zoologica Scripta* 42 (3): 278-287.

HEARD WH 1965. Recent Eupera (Pelycepoða: Sphaeriidae) in the United States. *Amer. Mid. Nat.* 74: 309-317.

HEARD W H (1977). Reproduction of fingernail clams (Sphaeriidae: *Sphaerium* and *Musculium*). *Malacologia* 16: 421-455.

HERNÁNDEZ CE, E RODRÍGUEZ-SERRANO, J AVARIA-LLAUTUREO, O INOSTROZA-MICHAEL, B MORALES-PALLERO, D BORIC-BARGETTO, CB

CANALES-AGUIRRE, PA MARQUET & A MEADE (2013) Using phylogenetic information and the comparative method to evaluate hypotheses in macroecology. *Method in Ecology and Evolution*, 4: 401–415.

HETZEL U (1993). Reproduktionsbiologie. Aspekte der Viviparie bei Sphaeriidae mit dem Untersuchungsschwerpunkt *Musculium lacustre* (O. F. Müller, 1774) (Bivalvia, Eulamellibranchia). PhD Thesis, University of Hanover.

HETZEL U (1994). Reproduktionsbiologie- Aspekte der Viviparie bei Sphaeriidae mit dem Untersuchungsschwerpunkt *Musculium lacustre* (O. F. Müller 1774) (Bivalvia; Eulamellibranchiata). Doctoral dissertation, University of Hanover. 273 pp.

ITUARTE CF (1988). Características de la incubación branquial en *Eupera platensis* Doello-Jurado, 1921 y *Byssanodonta paranensis* d'Orbigny, 1846 (Pelecypoda: Sphaeriidae). *Iheringia* 68: 41-47.

ITUARTE CF (1989). Los géneros *Byssanodonta* d'Orbigny, 1846 y *Eupera* Bourguignat, 1854 (Bivalvia: Sphaeriidae) en el área Paranoplatense. Descripción de *Eupera iguazuensis* n. sp. Del Río Iguazú, Misiones, Argentina. *Neotropica* 35: 53-63.

KASS R. E. & A. E. RAFTERY. (1995). Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association* 90:773–795.

KORNIUSHIN AV (1991). Anatomical aspects of the taxonomy and phylogeny of Pisidioidea (Bivalvia). In: *Proceedings of the Tenth International Malacological Congress* (Tubingen 1989). *Unitas Malacologica*, Tubingen, pp. 601–605.

KORNIUSHIN AV (1996). Growth and development of the outer demibranch in freshwater clams (Mollusca, Bivalvia): a comparative study. *Annales Zoologici*, 46:11–124.

KORNIUSHIN AV (1998 B). A comparative investigation of nephridia in fingernail and pill clams. *Malacological Review*, Supp. 7:53-63.

KORNIUSHIN AV (1998a). Review of the studies on freshwater bivalve mollusc systematics carried out by the Russian taxonomic school. *Malacological Review Supplement*. 7: 65-82.

KORNIUSHIN AV & M GLAUBRECHT (2002). Phylogenetic analysis based on the morphology of viviparous freshwater clams of the family Sphaeriidae (Mollusca, Bivalvia, Veneroidea) *Zoologica Scripta*, 31: (5) 415– 459.

KORNIUSHIN AV & M GLAUBRECHT (2003). Anatomy and reproduction of viviparous *Pisidium* (Parapisidium) *reticulatum* Kuiper, 1966: Implications for the phylogeny of Sphaeriidae (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta). *Organisms, Diversity & Evolution* 6: 85–195.

KORNIUSHIN A & M GLAUBRECHT (2006). Anatomy and reproduction of viviparous *Pisidium* (Parapisidium) *reticulatum* Kuiper, 1966: implications for the phylogeny of Sphaeriidae (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta). *Org. Divers. Evol.* 6:185–195.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G., BROWN NP, CHENNA R , MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM F, VALENTIN H, WALLACE I M, WILM A, LOPEZ R , THOMPSON JD, GIBSON TJ & DG HIGGINS (2007). ClustalW and ClustalX version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.

LEE T & D Ó FOIGHIL (2003). Phylogenetic structure of the Sphaeriinae, a global clade of freshwater bivalve molluscs, inferred from nuclear (ITS-1) and mitochondrial (16S) ribosomal gene sequences *Zoological Journal of the Linnean Society*, 137:245–260.

MCMAHON RF (1991). Mollusca: Bivalvia In: Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. Thorp JH & Covich AP, eds., pp. 315-399. Academic Press, New York.

MACKIE GL, QUADRI SU & AH CLARKE (1974). Development of brood sacs in *Musculium securis* Bivalvia: Sphaeriidae. *Nautilus*, 88 (4): 109-111.

MACKIE GL & DG HUGGINS (1976). Biological notes on *Eupera cubensis* (Bivalvia: Sphaeriidae) from Kansas. *J. Fish. Res. Board. Can.* 33: 1652-1656.

MACKIE GL (1978). Are sphaeriid clams ovoviviparous or viviparous? *Nautilus* 92: 145-147.

MEADE A & M PAGEL (2009). Software Bayes trees V.1.3
<http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesTrees.html>

MEIER-BROOK C (1970). Untersuchungen zur biologie einiger *Pisidium*-Arten (Mollusca; Eulamellibranchiata; Sphaeriidae). *Archiv für Hydrobiologie Supplement* 38: 73-150.

MORTON B (1985). The population dynamics, reproductive strategy and life history tactics of *Musculium lacustre* (Bivalvia: Pisidiidae) in Hong Kong. *J. Zool. Lond.* 207:581-603.

NIELSEN C (2009). How Did Indirect Development With Planktotrophic Larvae Evolve?. *Biological Bulletin* 216: 203-215.

ODHNER N H (1921). On some species of *Pisidium* in the Swedish State Museum. *J. Conch.* 16: 218-223.

OKADA K (1935). Some notes on *Musculium heterodon* (Pilsbry), a freshwater bivalve. II. The gills, the breeding habits, and the marsupial sac. Sci. Rpts. Tohoku Imp. Univ., ser. 4, Biol. 9: 315-328.

OKADA K (1937). Some notes on *Sphaerium japonicum* biwaense Mori, a freshwater bivalve. IV. Gastrula and fetal larva. Scientific Reports of the Tohoku Imperial University, 4th Series, Biology, 11: 49–68.

PAGE LR (2009) Molluscan Larvae: Pelagic Juveniles or Slowly Metamorphosing Larvae?. Biological Bulletin 216: 216–225.

PARKER J, RAMBAUT AR & OG PYBUS (2008). Correlating viral phenotypes with phylogeny: accounting for phylogenetic uncertainty. *MEEGID* 8(3):239-246.

PAGEL M (1994). Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings of the Royal Society London B* 255: 37-45.

PAGEL M & A MEADE (2004) A Phylogenetic Mixture Model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data. *Systematic Biology*, 53 : 571–581.

PAGEL M & A MEADE A (2006). Bayesian analysis of correlated evolution of discrete characters by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *American Naturalist*, 167, 808-825.

PAGEL M & A MEADE (2008). Modelling heterotachy in phylogenetic inference by reversible jump Markov chain Monte Carlo. *Philosophical Transactions B Royal Society B* 363:3955-3964.

PAGEL MD & A MEADE (2013). BayesTraits version 2.0 computer package. Software and manual. [on line] < <http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesTraits.html>> .

RAMBAUT A.& AJ DRUMMOND (2009). Tracer v1.5 <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.

SCHWARTZ ML & RV DIMOCK (1998). Structural and functional relationships between brooding demibranchs and glochidia larvae in unionid mussels. *Am. Zool.* 38: 100A. [Abstr.].

SIMPSON GG (1953). *The major features of evolution*. Columbia Univ. Press, New York.

STRATHMANN R R (1978). The evolution and loss of feeding larval stages of marine invertebrates. *Evolution* 32: 894–906.

STRATHMANN R R (1986). What controls the type of larval development? Summary statement for the evolution session. *Bull. mar. Sci.* 39: 616-

WHITE LR, MCPHERON BA & JR STAUFFER (1996). Molecular genetic identification tools for the unionids of French Creek, Pennsylvania. *Malacologia* 38: 181–202.

WRAY G (1996). Parallel evolution of nonfeeding larvae in echinoids. *Syst. Biol.* 45: 308 – 322.

XIA X (2000). *Data analysis in molecular biology and evolution*. Kluwer Academic Publishers, Boston.

XIA X & XIE Z (2001). DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J. Hered.* 92, 371–373.

XIA X, XIE Z, SALEMI M, CHEN L & Y WANG (2003). An index of substitution saturation and its application *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 1–7

XIA X & P LEMEY (2009). *A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing* Second edition, Cambridge University Press.

ZIEGLER HE (1885). Die Entwicklung von *Cyclas cornea* LAM. Z. wissensch. Zoologie, 41: 525-569. Leipzig.



Tablas y figuras

Tabla I: Detalles de los taxa incluidos para Sphaeriidae, número de acceso a Genbank (*) Grupo externo y codificación de los caracteres reproductivos (Lee & O'Foighil 2003¹; Steiner 2003²).

FAMILIA SPHAERIIDAE	(1,2) N° Acceso Genbank ITS-1	(1) Velum (F)	(1) Viviparidad	(1) Sincronismo	(1) N° sacos
SUBFAMILIA EUPERIINAE					
<i>Eupera cubensis</i> (*)	AY093501	Velum (F)	Ovovivíparos	Sincrónico	Ausencia
<i>Eupera platensis</i> (*)	AY093502	Velum (F)	Ovovivíparos	Sincrónico	Ausencia
SUBFAMILIA SPHAERIINAE					
<i>Musculium argentinum</i>	AY093503	Velum (V)	Euivivíparos	Asincrónicos	Múltiples
<i>Musculium japonicum</i>	AY093504	Velum (V)	Euivivíparos	Asincrónicos	Múltiples
<i>Musculium lacustre</i>	AY093505	Velum (V)	Euivivíparos	Asincrónicos	Múltiples
<i>Musculium miyadaii</i>	AY09507	Velum (V)	Euivivíparos	Asincrónicos	Múltiples
<i>Musculium partumeium</i>	AY093508	Velum (V)	Euivivíparos	Asincrónicos	Múltiples
<i>Musculium securis</i>	AY093509	Velum (V)	Euivivíparos	Asincrónicos	Múltiples
<i>Musculium transversum</i>	AY093510	Velum (V)	Euivivíparos	Asincrónicos	Múltiples
<i>Pisidium sterkianum</i>	AY093512	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium sp.</i>	AY093511	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium adamsi</i>	AY093513	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium casertanum</i>	AY093515	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium compressum</i>	AY093518	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium fallax</i>	AY093519	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium hallae</i>	AY093520	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium hibernicum</i>	AY093522	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium milium</i>	AY093523	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium nipponense</i>	AY093525	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium nitidum</i>	AY093526	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium personatum</i>	AY093527	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium subtruncatum</i>	AY093528	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium supinum</i>	AY093529	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium variabile</i>	AY093530	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium parvum</i>	AY093531	Velum (V)	Euivivíparos	Sincrónico	Único

<i>Pisidium japonicum</i>	AY093532	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium dubium</i>	AY093533	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium lilljeborgi</i>	AY093531	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium moitessierianum</i>	DQ062591	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium henslowanum</i>	DQ0625832	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Pisidium chilense</i>	En estudio	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium corneum</i>	AY093535	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium fabale</i>	AY093536	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium nucleus</i>	AY093537	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium rhomboideum</i>	AY093538	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium simile</i>	AY093540	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium striatinum</i>	AY093541	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium occidentale</i>	AY093541	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium novaezelandiae</i>	AY093543	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium tasmanicum</i>	AY093544	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium solidum</i>	GU123690	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium baicalense</i>	AY093534	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único
<i>Sphaerium rivicola</i>	AY093539	Velum (V)	Euivíparos	Sincrónico	Único

Tabla II: Valores del Factor de Bayes (FB) a favor del modelo dependiente (*) para las combinaciones pareadas de la comparación de modelo de correlación dependiente e independiente (Sac: sacos; Vivip: vivíparismo; Tr: tipo de reproducción; Vel: velum).

RASGO	FB
Sac./Vivip.	3.76
Sac/Tr	11.91
Sac/Vel.	8.28
Vel/Vivip.	3.34
Vel./Tr,	3.02
Vivip./Tr.	5.34

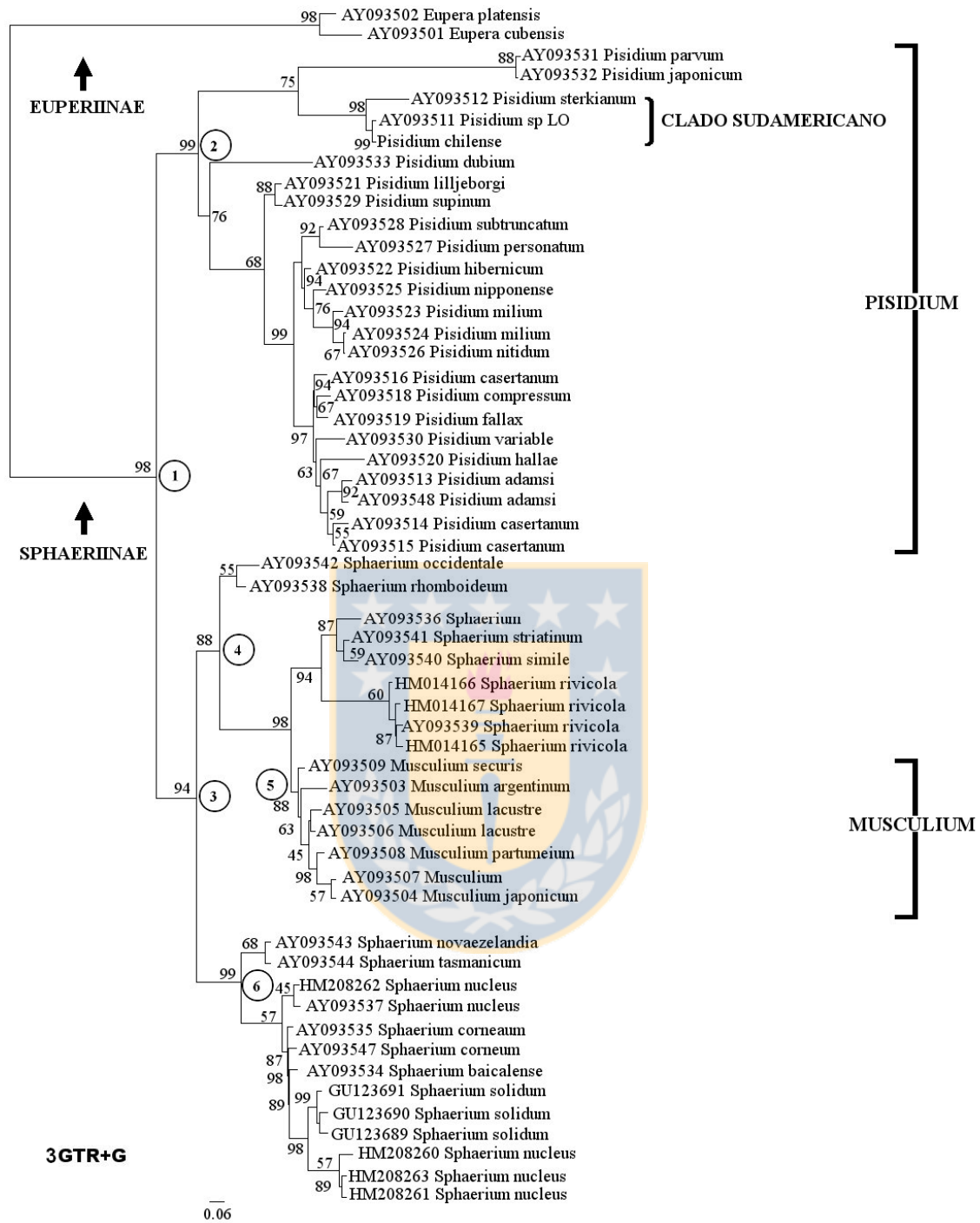


Figura 1: Árbol consenso bayesiano por regla de la mayoría de Sphaeriidae, en los nodos se muestran los valores de probabilidad a *posteriori*. Los círculos representan el número del nodo de interés. Las flechas las subfamilias de Sphaeriidae.

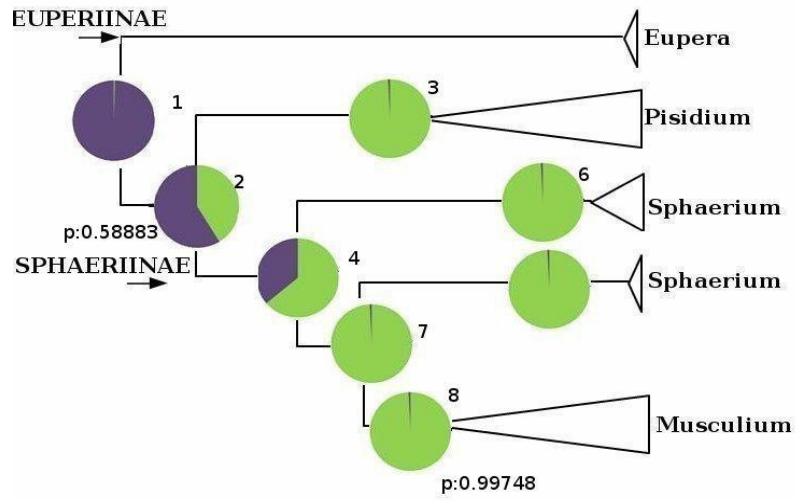


Fig.2

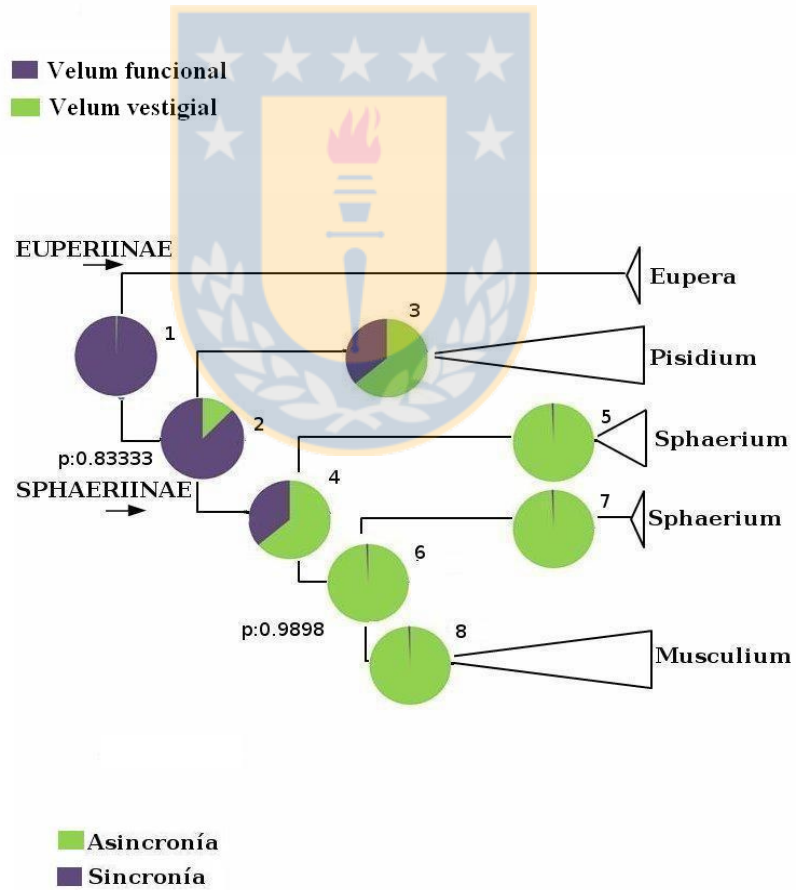
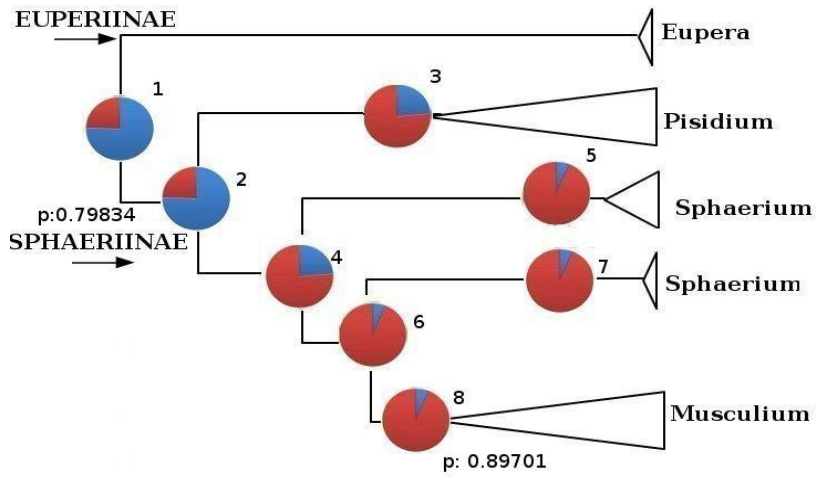
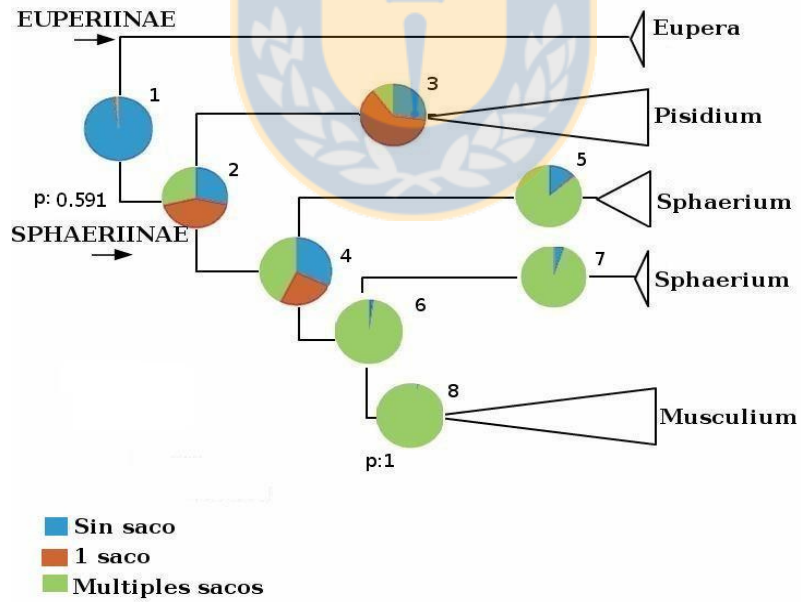


Fig.3



■ Ovoviviparia
 ■ Euoviviparia

Fig.4



■ Sin saco
 ■ 1 saco
 ■ Múltiples sacos

Fig.5

Figura 2, 3, 4 y 5: Reconstrucción filogenética de los estados ancestrales de l rasgo velum, sincronía, viviparidad y sacos incubatorioa. Sobre .los nodos enumerados las gráficas de torta muestran el valor de probabilidad de cada estado del rasgo. Las flechas las subfamilias de Sphaeriinae.



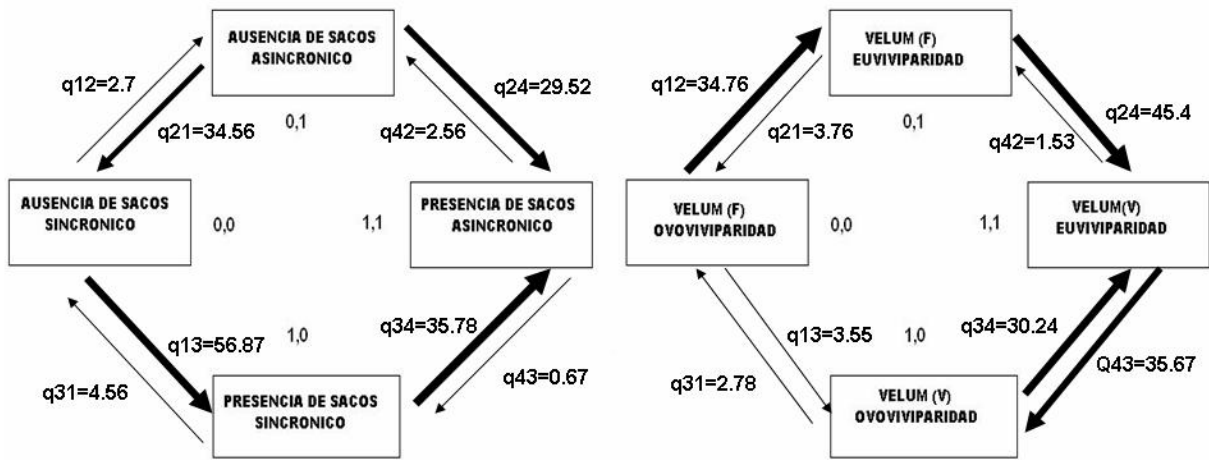


Fig.6

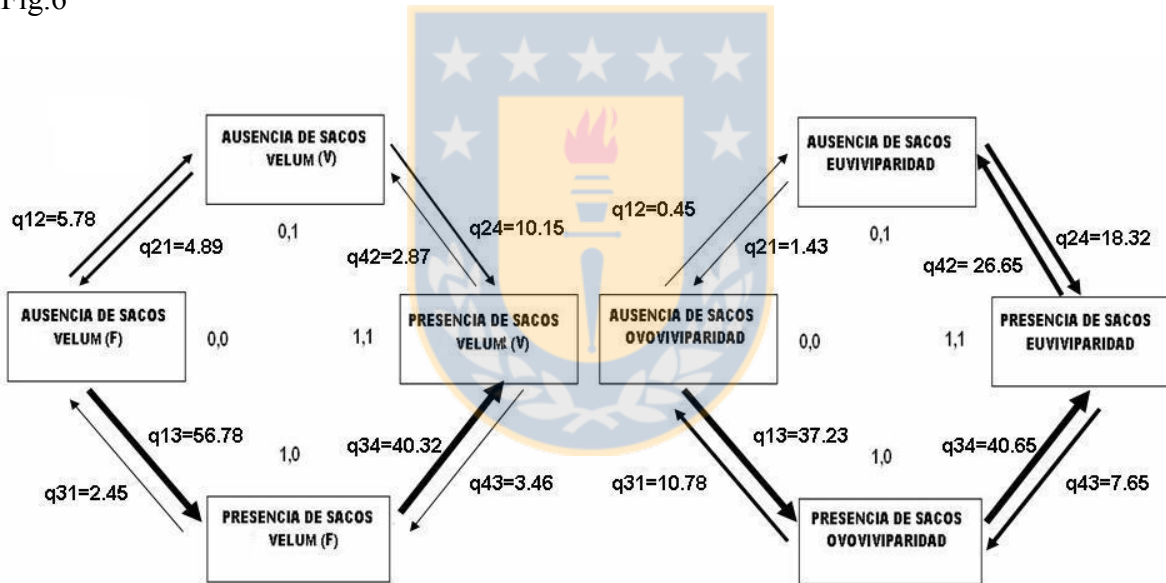


Fig.7

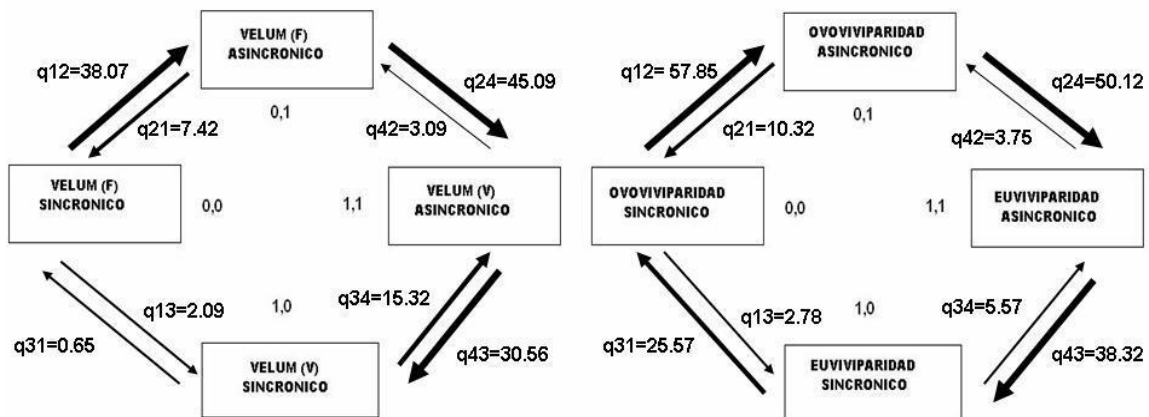


Fig.8

Figuras 6, 7 y 8: Esquema de las principales rutas de transición entre los estados (q_{xy} - q_{yx}), planteadas para las correlaciones pareadas de los rasgos. El grosor de las flechas muestran los valores de frecuencia de las tasas de transición.

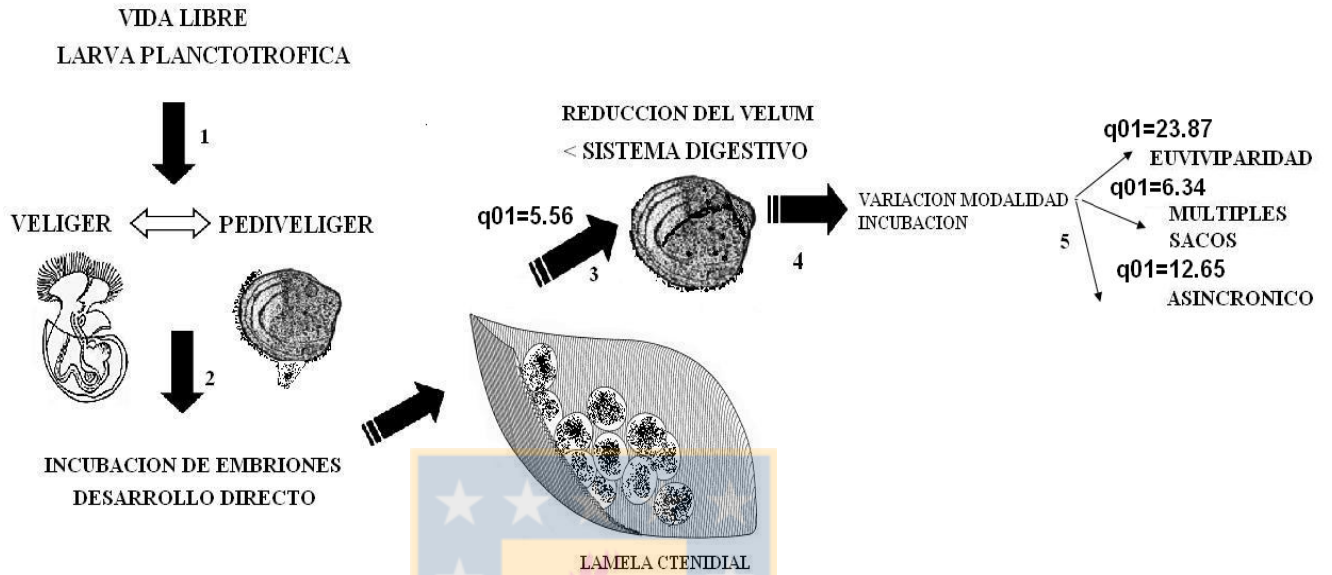


Figura 9: Mecanismo evolutivo planteado para Sphaeriidae a partir de su hipotético estado ancestral de larva hacia el desarrollo directo y la secuencia de cambios acontecidos en los diversos rasgos, basado en las frecuencias de las tasas de transición (q_{xy}).

CONCLUSIONES GENERALES

En la siguiente tesis se evaluó el estado del conocimiento de los moluscos dulceacuícolas chilenos en varios de sus aspectos, que abordaron los potenciales mecanismos y procesos que explican el origen de la diversidad en territorio nacional. Al analizar algunos tópicos que involucraron endemismo, diversidad, distribución, variación local, aspectos filogenéticos e implicancias de sus estrategias reproductivas en el origen de la diversidad actual finalmente concluimos:

1-Aspectos sistemáticos, endemismo y nuevas especies

Respecto a la diversidad malacológica es necesario realizar una revisión taxonómica y distribucional de algunas familias como Ancyliidae y Lymnaeidae que permitan corroborar el número de especies existentes en territorio nacional. Nuestros resultados al igual que los aportados por Valdovinos (2006); Fuentealba et al. (2010), revelan que estos grupos son los que presentan mayores vacíos del conocimiento. Respecto a los ejemplares de Hydrobiidae y la problemática nomenclatural (Collado et al. 2011; Kroll et al. 2012), se validan en el presente trabajo mediante las relaciones filogenéticas establecidas a las especies: *Heleobia chimbaensis*, *Heleobia cumingii*, *Heleobia limariensis* y *Heleobia loaensis*.

En relación a los patrones de endemismo y distribución, de la fauna malacológica nacional la zona con mayor endemismo esta entre los 44-56°S, sugerimos que esta área ha sido el producto de eventos vicariantes, tales como las glaciaciones pleistocénicas y eventos tectónicos postglaciales que afectaron al sistema hidrográfico. Estos eventos causaron la fragmentación y la interconexión de los cuerpos de agua dulce (Clapperton 1993; Turner et al. 1996). La revisión de especies de la familia Planorbidae durante la determinación de los patrones de endemismo y de distribución, permitieron aumentar su rango distribucional hasta Patagonia (Laguna Cisnes 47°7'10.02"S; 72°27'40.65"W Aysén), con la inclusión de una nueva especie *Biomphalaria cristiani*, familia que en un principio fue registrada preliminarmente hasta los 41°44'S, 72°06'W (Anton 1839).

Mediante estudios filogeográficos de los grupos de Cochliopidae nacionales, (relacionadas con especies altiplánicas), se determinó que un grupo importante colonizó los sistemas

dulceacuícolas nacionales desde el Norte a las Zonas centrales desde el lago Titicaca. Se destaca la tolerancia de esta familia a la salinidad, factor importante en los procesos de diversificación y endemismo local (Kroll et al. 2012). Por otra parte, considerando estudios genéticos poblacionales, utilizando como modelo a *Diplodon chilensis*, se demostró la gran capacidad migratoria durante su fase larval (Parada & Peredo 2002) y la baja variabilidad genética, a pesar de estar en ambientes fragmentados, lo que sugiere su gran capacidad de adaptación y explica su amplio rango distribucional a diferencia de los gasterópodos (Fuentealba et al.2010).

Considerando la controversial filogenia global de Hyriidae y su problemática a nivel de subfamilia (Graf & Cummings 2006; Graf 2013), mediante la incorporación de ejemplares de *Diplodon chilensis*, las especies sudamericanas asignadas a Hyriinae son recuperadas como un grupo monofilético, sin embargo Hyridellinae (Australia –Nueva Zelanda) es parafilética. Respecto a Sphaeriidae, se recupera el clado de Sphaeriinae y las especies sudamericanas conforman un grupo monofilético (clado sudamericano. Además, se resuelve finalmente la parafilia en torno *Pisidium* como consecuencia de la incorporación de una nueva especie sudamericana endémica (*Pisidium chilense*) y las metodologías de reconstrucción filogenética basada en modelos complejos de evolución (Lee & O'Foighil 2003; Graf 2013).

Al analizar el origen y dispersión de los bivalvos a Sudamérica, evaluando el complejo de hipótesis planteadas previamente McMichel & Hiscock (1958); Parodiz & Bonetto 1963), se demuestra que los hyriidos sudamericanos tendrían un origen australiano, el que a su vez se apoya en la evidencia fósil con una estimación del reloj molecular de 95.25 Ma. Estos, habrían migrado a Sudamérica a través de la conexión Antártica (Leppe 2009), conocida como la fosa cuenca marina Rocas Verdes. Respecto a Sphaeriinae, en Sudamérica aún no es posible reconstruir un modelo por la falta de antecedentes moleculares de los grupos sudamericanos, australianos y de Asia.

2- Evolución de las estrategias reproductivas en Unionoidea y Sphaeriidae (Sphaeriinae)

En relación, a las reconstrucciones de rasgos relevantes en la historia de vida de los bivalvos, dulceacuícolas, permiten concluir que en Hyriidae el estado ancestral es una larva calcárea Gloquidium. Las tasas de transición de ambos rasgos difieren, lo cual implica de acuerdo a los resultados que el modo de evolución sigue una tendencia hacia la gloquidiosis. La distribución de los estados larvales esta determinada por la condición generalista/ especialista, el cual es un rasgo correlacionado a través de la historia de Unionoidea y que podría explicar el tamaño del rango mediante la amplitud del nicho.

En los Sphaeriinae (Sphaeriidae) existe una tendencia hacia el desarrollo directo, cuyo ancestro presento larva de vida libre. Además la pérdida de complejidad en los procesos de metamorfosis, conduce a sustentar la hipótesis larva primero. Estos resultados demuestran que la ley de Dollo, es soportada para todos los rasgos evaluados no existe, evidencia sustentable hacia una tendencia a que estos rasgos surgan nuevamente en el curso de la evolución de Sphaeriinae. Finalmente, asociado a este evento se producen una serie de cambios que fueron claves y generaron drásticas modificaciones morfológicas y de las estrategias reproductivas (velum rudimentario, sacos incubatorios, euviviparidad y asincronía reproductiva), los que se encuentran vinculados mediante las correlaciones evolutivas planteadas en donde el cambio de uno afecta al otro, favoreciendo de esta forma el desarrollo directo como estrategia de sobrevivencia en este grupo de bivalvos.

Bibliografía

ANTON H.E (1839). Verzeichniss der Conchylien, welche sich in der Sammlung von Hermann Eduard Anton befinden, Halle. 110 pp.

COLLADO G, I VILA & M MENDEZ (2012). Monophyly, candidate species and vicariance in Biomphalaria snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano Zoologica Scripta 1-10.

FUENTEALBA C, MORRONE J & R FIGUEROA (2010) Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. Revista Chilena de Historia Natural, 83: 289-298.

GRAF D L & K S CUMMINGS (2006). Freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) of Angola, with description of a new species, *Mutela wistarmorrisi*. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 155: 163-194.

GRAF D (2013). Patterns of Freshwater Bivalve Global Diversity and the State of Phylogenetic Studies on the Unionoida, Sphaeriidae, and Cyrenidae. American Malacological Bulletin 31(1): 135–153.

KROLL O, R HERSHLER, C ALBRECHT, EDMUNDO M. TERRAZAS, R APAZA , C FUENTEALBA, C WOLFF & T WILKE (2012) The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: correlation between molecular evolution and hydrographic history 1517 Ecology and Evolution, 2(7): 1517-1530.

LEPPE M (2009).Tras las pistas de un evento vicariante de mas de 100 millones de años. Boletín Antártico Chileno 28 (2): 23-25.

VALDOVINOS C (2006). Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. Gayana 70: 88-95.





ANEXO: CAPITULO II: ENDEMISMO, PATRONES DE DIVERSIDAD, DISTRIBUCIÓN, NUEVOS REGISTROS DE GASTROPODA Y MODIFICACIONES NOMENCLATURALES.

A-Endemismo y Distribución

Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile



REVISTA CHILENA DE HISTORIA NATURAL

Revista Chilena de Historia Natural 83: 289-298, 2010

© Sociedad de Biología de Chile

Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile

Endemism analysis of Chilean freshwater mollusks

RESUMEN

La diversidad geológica y climática de Chile continental permite la diferenciación de una gran variedad de ecosistemas terrestres y acuáticos. La evidencia de los actuales patrones de distribución de especies dulceacuícolas sugiere en gran medida una relación con las glaciaciones del Pleistoceno y algunos eventos tectónicos postglaciales que afectaron la hidrografía del país. Las especies de moluscos dulceacuícolas en Chile, a diferencia de las especies marinas, han sido escasamente valoradas, a pesar del papel que cumple un importante número de ellas en los ecosistemas. Actualmente no existen estudios biogeográficos que permitan establecer patrones distribucionales y los procesos que los condicionaron. Un análisis de parsimonia de endemismos (PAE) y de riqueza de cinco zonas hidrográficas, basado en 75 especies de moluscos dulceacuícolas, sugiere la existencia de tres áreas biogeográficas: Norte (entre las latitudes 17°-33° S), Centro-Sur (33°-44° S) y Sur (44°-56° S). La zona hidrográfica V (44°-56° S), incluida en el área Sur, posee el mayor porcentaje de endemismo (75 %), a diferencia de la zona hidrográfica III (17°-26° S), incluida en el área Centro-Norte, la cual registró el valor más bajo (42 %).

Palabras clave: biodiversidad, biogeografía, moluscos dulceacuícolas, PAE, zonas hidrográficas.

ABSTRACT

The Chilean geological and climatic diversity allows the differentiation of a great variety of terrestrial and aquatic ecosystems. Evidence provided by distributional patterns of freshwater species suggests a correspondence with Pleistocene glaciations, and some post-glacial tectonic events that affected the hydrography of the country. The species of freshwater Chilean mollusks, unlike the marine species, have been undervalued. Currently there are no biogeographic studies that would allow identifying distribution patterns and the possible processes that shaped them. A parsimony analysis of endemism (PAE) and the richness of five hydrographic zones, based on 75 freshwater mollusk species, suggests the existence of three main biogeographic areas: Northern (between latitudes 17°-33° S), Central-Southern (33°-44° S) and Southern (44°-56° S). Hydrographic zone V (44°-56° S), included in the Southern area, has the highest endemism percentage (75 %), contrasting with hydrographic zone I (17°-26° S), included in the Central-Northern area, which registered the lowest value (42 %).

Key words: biodiversity, biogeography, freshwater molluscs, hydrographic zones, PAE.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los sistemas dulceacuícolas chilenos en la actualidad ha ganado relevancia debido a que constituyen ecosistemas vulnerables que alojan especies endémicas, algunas de ellas consideradas centinelas y potenciales bioindicadores de ecosistemas perturbados (Valdovinos & Cuevas 1996, Silva et al. 2007). Pese a que los moluscos dulceacuícolas constituyen un componente importante en el flujo de energía y ciclo de

nutrientes, ya que representan una porción significativa de la masa macrobentónica, no han sido considerados al estimar cuestiones de biodiversidad, biogeografía y conservación (Letelier 2006, Parada & Peredo 2006, Vila et al. 2006). Del total de especies de moluscos descritas para Chile solo el 6.7 % es dulceacuícola (Valdovinos 1999). El estado actual de su conocimiento taxonómico, a pesar de ser precario, sugiere que la diversidad de bivalvos es mucho menor que la de gasterópodos, a pesar de su amplio rango

¹ CARMEN FUENTEALBA¹, *, RICARDO FIGUEROA^{2,3} & JUAN J. MORRONE⁴

distribucional, en el cual son determinantes sus estadios larvales (larva gloquideo), rasgo ecológico que les ha permitido colonizar una gran diversidad de ecosistemas de agua dulce (Bonetto et al. 1986, Peredo & Parada 1986, Parada et al. 1987). Los gasterópodos presentan una distribución más o menos discontinua, asociada con las cuencas y el mosaico de hábitats encontrados dentro de ellas, como consecuencia de procesos morfogénicos, geomorfológicos, climáticos y la ecología del grupo (Valdovinos 1999, Parada & Peredo 2002, 2006, Parra 2002). Estudios previos demuestran la sensibilidad de ciertas especies de moluscos, que las condiciona a un determinado tipo de hábitat: e.g., especies de Chiliniidae, Ancyliidae, Sphaeriidae e Hyriidae generalmente están restringidas a aguas frías ($< 10^{\circ} \text{C}$), oxigenadas ($> 70\%$ saturación) y de baja turbidez (< 1 UTN); mientras que unas pocas especies de Lymnaeidae, Physidae y Planorbidae toleran condiciones adversas de calidad de agua (Valdovinos et al. 2004).

Los bivalvos se encuentran representados por dos familias: Hyriidae, con un género y dos especies, *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) y *Diplodon solidulus* (Philippi, 1869); y Sphaeriidae, con tres géneros: *Pisidium* Pfeiffer, 1821, con las especies *Pisidium chilense* (d'Orbigny, 1846), *Pisidium magellanicum* (Dall, 1908), *Pisidium lebruni* Mabille, 1804, *Pisidium observationis* Pilsbry, 1911, *Pisidium meierbrook* Kuiper & Hinz, 1983, *Pisidium huillichum* Ituarte, 1999 y *Pisidium llanquihuense* Ituarte, 1999; *Sphaerium* Scopoli, 1777, con las especies *Sphaerium lauricochae* (Philippi, 1869) y *Sphaerium forbesi* (Philippi, 1869); y *Musculium* Link, 1807, con las especies *Musculium argentinum* (d'Orbigny, 1835) y *Musculium patagonicum* (Pilsbry, 1911). Los gasterópodos sudamericanos incluyendo Chile, a diferencia de los bivalvos, en general presentan un elevado grado de endemismo y sugieren posibles relaciones gondwánicas (von Ihering 1891, Van Bruggen 1980, Pugh & Scout 2002). De acuerdo con Stuardo (1961), para Chile se han descrito 73 especies de Prosobranchia (una familia) y Pulmonata (cinco familias): 30 especies de Chiliniidae (*Chilina* Gray, 1828), cuatro de Physidae (*Physa* Draparnaud, 1801), cinco de Lymnaeidae (*Lymnaea* Lamarck, 1799), siete de Planorbidae (*Biomphalaria* Preston, 1910), cinco de Ancyliidae (*Anisancylus* Pilsbry, 1924 y

Uncancylus Pilsbry, 1913) y 22 de Hydrobiidae (*Potamolithus* Pilsbry, 1896 y *Littoridina* Souleyet, 1852). La distribución global de los gasterópodos chilenos se extiende desde Arica en el norte hasta Magallanes en el sur. Sin embargo, la mayor parte de las especies tiene su rango geográfico restringido a una o unas pocas cuencas hidrográficas contiguas a lo largo del gradiente latitudinal. Su mayor concentración de especies se localiza entre las regiones administrativas VII y X (Valdovinos 2006).

Chile comprende una franja continental muy estrecha, con un ancho medio de 200 km, comprendida entre dos o tres meridianos como promedio ($66^{\circ}30' \text{W} - 76^{\circ} \text{W}$) y con latitudes que van desde los $17^{\circ}30' \text{S}$ a los $56^{\circ}30' \text{S}$. Presenta diversidad climatológica y de rasgos geomorfológicos, y litológicos, que determinan también distintos comportamientos respecto al escurrimiento superficial. Su fisiografía distingue un fuerte gradiente altitudinal de oeste a este, que distingue la planicie litoral, la Cordillera de la Costa, la depresión intermedia y la Cordillera de los Andes, con desniveles que pueden superar los 5,000 m y que determinan cuencas hidrográficas de gran torrencialidad. A pesar de esta diversidad, existen patrones de similitud en los caudales, regímenes de escorrentía, red de drenaje y la situación de las cuencas con respecto a las unidades morfológicas, que permiten definir cinco zonas hidrográficas relativamente homogéneas. Estas zonas hidrográficas fueron propuestas por Niemeyer & Cereceda (1984): I ($17^{\circ}-26^{\circ} \text{S}$), de régimen esporádico, en la Zona árida; II ($26^{\circ}-33^{\circ} \text{S}$), de régimen mixto, en la Zona Semiárida; III ($33^{\circ}-38^{\circ} \text{S}$), de régimen mixto, en la Zona Subhúmeda; IV ($38^{\circ}-44^{\circ} \text{S}$), de régimen de ríos con regulación lacustre; y V ($44^{\circ}-56^{\circ} \text{S}$), de ríos caudalosos de la Patagonia Septentrional y Meridional Campos de Hielo (Tabla 1). Existe otra propuesta que divide a Chile en seis regiones hidrográficas, basada en rasgos climatológicos, geológicos y de régimen hídrico (Santis 1975). Estas regiones fueron utilizadas por Pérez-Losada et al. (2002) como unidades para planes de conservación.

Nuestros objetivos son analizar la riqueza y endemismo de moluscos dulceacuícolas, utilizando las zonas hidrográficas propuestas por Niemeyer & Cereceda (1984), mediante un análisis de parsimonia de endemismos (PAE).

TABLA 1

Cuencas hidrográficas por zona hidrográfica.

Hydrographic basins per hydrographic zone.

Zona I (17°-26° S)	Zona II (26°-33° S)	Zona III (33°-38° S)	Zona IV (38°-44° S)	Zona V (44°-56° S)
Taltal	Copiapó	Maipo	Imperial	Cisnes
Lluta	Huasco	Rapel	Toltén	Aisén
Azapa	Limarí	Maule	Budi	Baker
Camarones	Elqui	Itata	Lleulleu	
Lauca	Illapel	Biobío	Carampangue	
Isluga	Aconcagua		Valdivia	
Tamarugal			Bueno	
Salar de Atacama			Mauñín	
Loa			Puelo	
			Palena	

MÉTODOS

Los datos de distribución fueron obtenidos a partir de estudios de revisión y bases de datos (Valdovinos 1989, 1999, 2006, Parada & Peredo 2002, 2005, 2006). Esta información se actualizó a través de la revisión de las colecciones depositadas en el Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile y prospecciones realizadas en terreno. También se consultaron los ejemplares tipo depositados en la colección del Museo de Historia Natural de Santiago (MHNS).

Se construyó una matriz de datos de presencia (1) / ausencia (0) con registros latitudinales de las 75 especies de moluscos dulceacuícolas chilenos (Tabla 2). Se realizó un análisis de parsimonia de endemismos (PAE) (Morrone 1994, 2009), anexando un área externa codificada con todos "0" para enraizar el cladograma (Rosen & Smith 1988). Se utilizó el programa Nona (Goloboff 1998), ejecutado a través del programa Winclada (Nixon 2002). El soporte de los nodos fue evaluado a través de un análisis de "bootstrap" (Felsenstein 1985).

RESULTADOS

La riqueza específica de un total de 75 especies de moluscos incluidas en el presente estudio varía latitudinalmente de norte a sur, con mayor concentración entre las latitudes 26° y 44° con valores que superan el 20 %, obteniéndose registros más bajos entre los 17°-25°, con un porcentaje equivalente al 12 % (Fig. 1).

El análisis de parsimonia de endemismos permitió obtener un solo cladograma (Fig. 2) de 87 pasos, índice de consistencia de 0.91 e índice de retención de 0.63. El PAE permite

agrupar las cinco zonas hidrográficas en tres áreas biogeográficas (Fig. 2):

(1) Área biogeográfica Norte (17°-33° S): comprende las zonas hidrográficas I y II. Está sustentada por las especies *L. choapaensis*, *L. opachensis*, *L. transitoria*, *B. montana* y *B. termala*.

(2) Área biogeográfica Centro-Sur (33°-44° S): comprende las zonas hidrográficas III y IV. Está sustentada por las especies *L. oblonga*, *L. obtusa*, *C. dombeyana*, *C. fluctuosa*, *B. chilensis* y *P. llanquihuense*.

(3) Área biogeográfica Sur (44°-56° S): representada solo por la zona hidrográfica V. Está sustentada por las especies *L. simplex*, *C. fluviatilis*, *C. ovalis*, *C. patagonica*, *C. amoena*, *C. fusca*, *C. nervosa*, *C. fueguiensis*, *C. monticola*, *C. aurantia*, *L. lebruni*, *B. atacamensis*, *P. lebruni*, *P. observationis* y *D. solidulus*.

DISCUSIÓN

La diversidad geológica y climática de Chile continental permite la diferenciación de una gran variedad de ecosistemas terrestres y acuáticos (Parra et al. 2002). Dentro de los cambios ocurridos durante la segunda parte del Terciario, que modificaron drásticamente la geomorfología, el clima y la hidrografía, destacan el levantamiento de los Andes, transgresiones oceánicas, ciclos de aridez y disminución de la temperatura (Villagrán & Hinojosa 1997).

TABLA 2

Listado de especies y su distribución en cada zona hidrográfica.

Species list and its distribution in every hidrographic zone.

	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
<i>Potamolithus australis</i> Biese, 1944	0	0	0	1	0
<i>Littoridina atacamensis</i> (Philippi, 1860)	1	0	0	0	0
<i>Littoridina bruninensi</i> Biese, 1944	0	1	0	0	0
<i>Littoridina compacta</i> Biese, 1944	0	1	0	0	0
<i>Littoridina copiapoensis</i> Biese, 1944	0	1	0	0	0
<i>Littoridina coquimbensis</i> Biese, 1944	0	1	0	0	0
<i>Littoridina chimbaensis</i> Biese, 1944	1	0	0	0	0
<i>Littoridina choapaensis</i> Biese, 1944	1	1	0	0	0
<i>Littoridina cumingii</i> Biese, 1944	1	1	1	0	0
<i>Littoridina gracilis</i> Biese, 1944	0	0	0	1	0
<i>Littoridina limariensis</i> Biese, 1944	0	1	0	0	0
<i>Littoridina loaensis</i> Biese, 1947	1	0	0	0	0
<i>Littoridina magallanica</i> Biese, 1947	0	0	0	1	1
<i>Littoridina oblonga</i> Biese, 1944	0	0	1	1	0
<i>Littoridina obtusa</i> Biese, 1944	0	0	1	1	0
<i>Littoridina opackensis</i> Biese, 1947	1	1	0	0	0
<i>Littoridina pachispira</i> Biese, 1944	0	0	0	1	0
<i>Littoridina puuloensis</i> Biese, 1944	0	0	0	1	0
<i>Littoridina santiaguenses</i> Biese, 1944	0	0	1	0	0
<i>Littoridina simplex</i> Pilsbry, 1911	0	0	0	0	1
<i>Littoridina striata</i> Biese, 1944	0	1	0	0	0
<i>Littoridina transitoria</i> Biese, 1947	1	1	0	0	0
<i>Chilina dombeyana</i> (Bruguère, 1789)	0	0	1	1	0
<i>Chilina fluctuosa</i> (Gray, 1828)	0	0	1	1	0
<i>Chilina bulloides</i> ((d'Orbigny, 1835)	0	0	0	1	0
<i>Chilina ampullacea</i> Sowerby, 1838	0	0	0	1	1
<i>Chilina tenuis</i> Sowerby, 1838	0	1	1	0	0
<i>Chilina fluviatilis</i> Sowerby, 1838	0	0	0	0	1
<i>Chilina major</i> Sowerby, 1838	0	0	0	1	0
<i>Chilina robustior</i> Sowerby, 1838	0	0	0	1	1
<i>Chilina gibosa</i> Sowerby, 1838	0	0	0	1	0
<i>Chilina ovalis</i> Sowerby, 1838	0	0	0	0	1
<i>Chilina fasciata</i> (Gould, 1847)	0	1	0	0	0
<i>Chilina obovata</i> (Gould, 1847)	0	1	0	0	0
<i>Chilina angusta</i> Philippi, 1860	0	1	0	0	0
<i>Chilina elegans</i> von Frauenfeld, 1865	0	0	0	1	0

TABLA 2 (continuación)

	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
<i>Chilina limnaeformis</i> Dall, 1870	0	1	0	0	0
<i>Chilina patagonica</i> Sowerby, 1874	0	0	0	0	1
<i>Chilina subcylindrica</i> Sowerby, 1874	0	0	0	1	0
<i>Chilina acuminata</i> Sowerby, 1874	0	0	0	1	0
<i>Chilina portillensis</i> Hidalgo, 1880	0	1	0	0	0
<i>Chilina amoena</i> Smith, 1881	0	0	0	0	1
<i>Chilina fusca</i> Mabilie & Rochebrune, 1883	0	0	0	0	1
<i>Chilina nervosa</i> Mabilie & Rochebrune, 1891	0	0	0	0	1
<i>Chilina fueguiensis</i> Smith, 1905	0	0	0	0	1
<i>Chilina monticola</i> Strebel, 1907	0	0	0	0	1
<i>Chilina aurantia</i> Marshall, 1924	0	0	0	0	1
<i>Chilina olivacea</i> Marshall, 1924	0	0	0	1	0
<i>Chilina bullocki</i> Marshall, 1933	0	0	1	0	0
<i>Chilina iheringi</i> Marshall, 1933	0	0	0	1	0
<i>Chilina llanquikuensis</i> Marshall, 1933	0	0	0	1	0
<i>Chilina minuta</i> Haas, 1951	0	0	1	0	0
<i>Physa chilensis</i> Claessin, 1886	0	0	1	0	0
<i>Physa nodulosa</i> Biese, 1948	0	1	0	0	0
<i>Physa porteri</i> Germain, 1913	0	1	0	0	0
<i>Physa rivales</i> Sowerby, 1874	0	0	1	0	0
<i>Lymnaea lebruni</i> Mabilie, 1883	0	0	0	0	1
<i>Biomphalaria atacamensis</i> (Biese, 1951)	0	1	0	0	0
<i>Biomphalaria chilensis</i> (Antón, 1839)	0	0	1	1	0
<i>Biomphalaria schmiererianus</i> (Biese, 1951)	0	0	1	0	0
<i>Biomphalaria montana</i> (Biese, 1951)	1	1	0	0	0
<i>Biomphalaria costata</i> (Biese, 1951)	1	0	0	0	0
<i>Biomphalaria termala</i> (Biese, 1951)	1	1	0	0	0
<i>Biomphalaria aymara</i> Valdovinos & Stuardo, 1991	1	0	0	0	0
<i>Anisancylus obliquus</i> (Broderip & Sowerby, 1832)	0	0	1	0	0
<i>Uncancylus gayanus</i> (d'Orbigny, 1837)	0	0	1	0	0
<i>Uncancylus concentricus</i> (d'Orbigny, 1835)	0	0	1	0	0
<i>Uncancylus foncki</i> (Philippi, 1866)	0	0	0	0	1
<i>Pisidium lebruni</i> Mabilie, 1884	0	0	0	0	1
<i>Pisidium observationis</i> Pilsbry, 1911	0	0	0	0	1
<i>Pisidium huillichum</i> Ituarte, 1999	0	0	0	1	0
<i>Pisidium llanquikuense</i> Ituarte, 1999	0	0	1	1	0
<i>Pisidium chilense</i> (d'Orbigny, 1846)	0	1	1	1	1
<i>Diplodon (Diplodon) chilensis</i> (Gray, 1828)	1	1	1	1	1
<i>Diplodon solidulus</i> Philippi, 1869	0	0	0	0	1

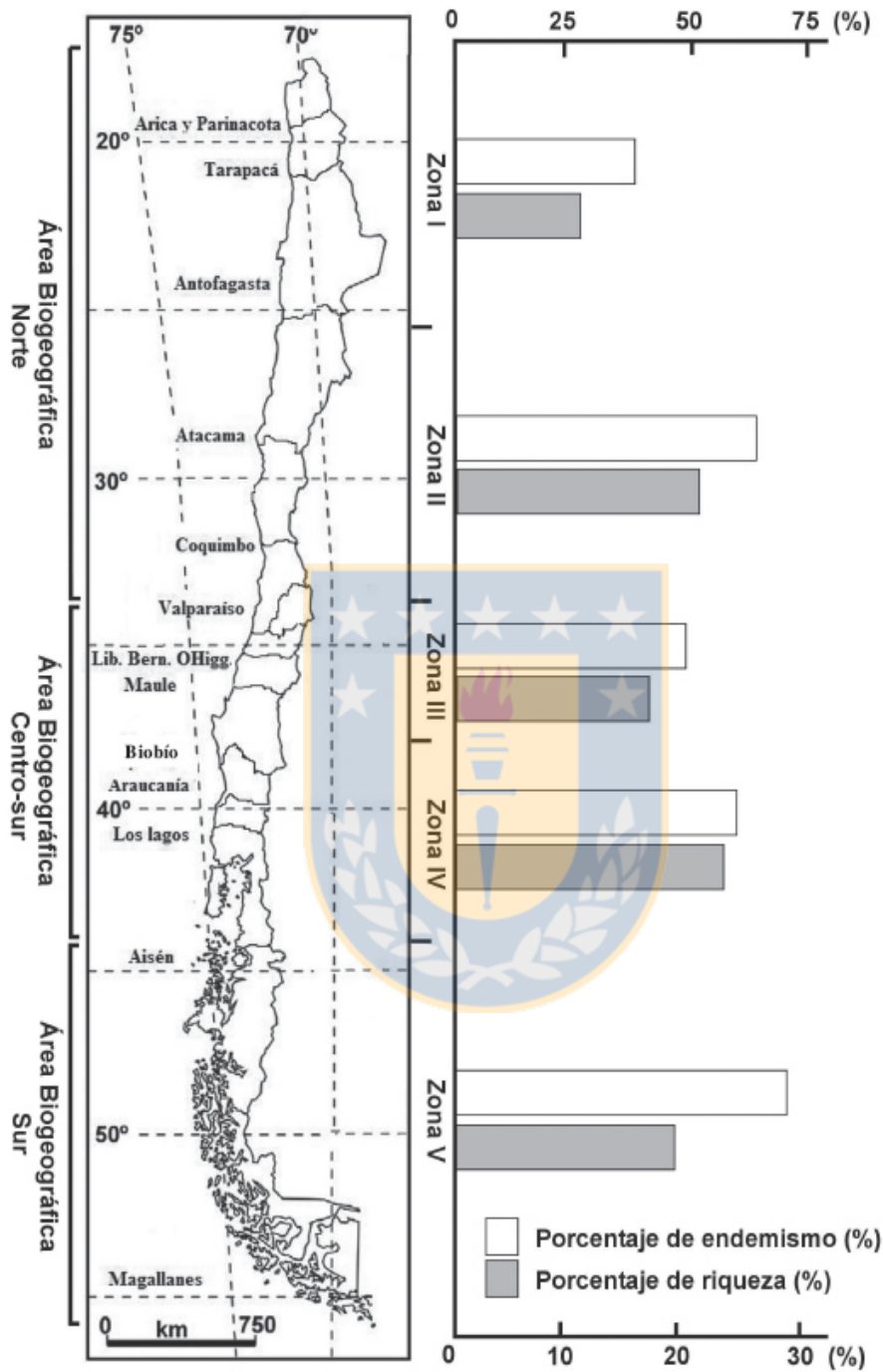


Fig. 1: Porcentaje de endemismo y riqueza por zona hidrográfica, las cuales son agrupadas en tres áreas biogeográficas.

Specific richness distribution and endemism percentages by hydrographic zone, which are grouped in three biogeographical areas.

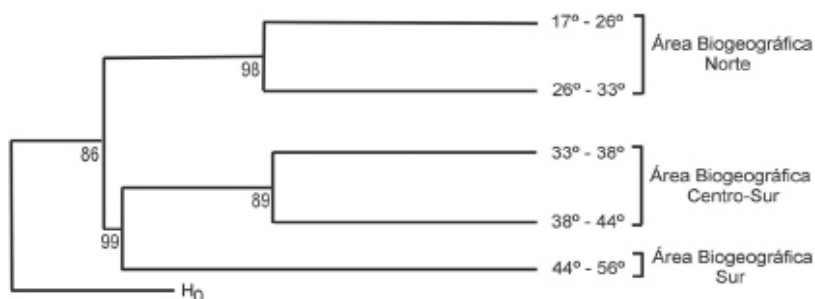


Fig. 2: Cladograma obtenido del análisis de parsimonia de endemismos de los moluscos dulceacuicolas chilenos. En los nodos se indican los valores de "bootstrap".

Cladogram obtained from the parsimony analysis of endemicity of Chilean freshwater molluscs. Bootstrap values are indicated on the nodes.

En el área Norte, situada entre los 17° y 33° S, los valores de riqueza alcanzan el 36 %. No obstante, encontramos en ella la zona hidrográfica de menor riqueza (12.1 %), debiéndose este incremento principalmente al aporte de especies de la zona hidrográfica II. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en estudios sobre patrones de riqueza en plecópteros (Palma & Figueroa 2008) y macrófitos (Ramírez et al. 1986), los cuales pueden explicarse por factores propios de la hidrografía del norte de Chile bajo condiciones climáticas extremas, como el menor número de cuencas, temperaturas altas, ríos esporádicos y cuencas mayoritariamente cerradas del tipo endorreico, con elevado contenido mineralógico (Figueroa et al. 2007). Algunos autores reconocen adicionalmente la fragilidad de estos ecosistemas, caracterizados por temperaturas y aridez extremas, y la ocupación humana de más de 10,000 años (Jaksic et al. 1997). Los ecosistemas del norte son esencialmente desérticos, caracterizados por una productividad muy variable y dependiente de las precipitaciones y disponibilidad de nutrientes, principalmente nitrógeno; un alto cociente productividad/biomasa (tasa de recambio o producción relativa); un alto cociente entre biomasa sobre y debajo del suelo; una baja eficiencia de utilización de la producción de plantas por parte de los herbívoros; la biomasa de plantas es removida principalmente por erosión (Noy-Meir 1973, 1985).

El área con mayor riqueza de especies (45 %) se encontró a los 33°-44° S. Dentro de

ella, el aporte en riqueza proviene fundamentalmente de la zona hidrográfica IV, con un 25.2 %. Esta zona se caracteriza por ser del tipo exorreica, fundamentalmente con un clima templado y lluvioso, por lo que es posible encontrar una gran abundancia y variedad de sistemas límnicos (Ramírez & San Martín 2006).

El área Centro-Sur incluye la zona de transición climática (36°-38° S), lo que no necesariamente se correlaciona con un elevado grado de endemismo. Esta zona de transición entre los climas mediterráneo y templado (Di Castri & Hajek 1976), localizada en la región del Biobío, se caracteriza por una gran diversidad de ecosistemas (Morla & Pineda 1985), por lo que es posible encontrar una elevada riqueza de especies (Teneb et al. 2004; Cavieres et al. 2005). Se ha descrito un "hotspot" de biodiversidad de invertebrados dulceacuicolas, situado entre las regiones VII (35° S) y XI (43° S), el cual fue utilizado en conjunto con los sistemas hidrográficos por Pérez-Losada et al. (2002) en el estudio de patrones de riqueza y determinación de índices de diversidad genética y filogenética. Estos autores sugirieron que la región hidrográfica compuesta por los ríos Tucapel, Imperial y Toltén es prioritaria para la conservación de aeglidos, concordando con nuestra área de mayor riqueza.

Respecto al grado de endemismo por zona hidrográfica, el mayor porcentaje incluyó a las regiones de Magallanes y Aisén con un 75 %. Sin embargo, esta región es una de las unidades biogeográficas con menor riqueza (20 %), la cual incluye solo a la zona

hidrográfica V. Esta zona se caracteriza por un predominio de las precipitaciones anuales, alimentando ríos caudalosos de fuerte pendiente y aguas oxigenadas. De acuerdo con Vera (2007), los valores de riqueza faunística en Ephemeroptera fueron igualmente bajos en Magallanes. Las diferencias entre las provincias bióticas de la Patagonia y el Bosque Magallánico serían consecuencia de factores orográficos y climáticos (Morrone 2006). Hidrográficamente, y según la intensidad y carácter de la glaciación en la Patagonia chilena, podemos distinguir dos subáreas: Patagonia Septentrional, con ríos caudalosos trasandinos; y Patagonia Meridional, caracterizada por campos de hielo, canales y fiordos. Estas hoyas de gran tamaño, originadas en la faja subandina oriental de la Patagonia, incorporan grandes lagos de origen glacial, los cuales se vacían posteriormente en el Pacífico (Niemeyer & Cereceda 1984). Esta subárea, incluida en el área Sur, se caracteriza por condiciones topográficas y climáticas complejas, razón por la cual ha sido poco explorada (Scrub et al. 1998). El conocimiento de la biodiversidad y endemismo de esta área, en relación con las otras aún es precario y considerado preliminar. De acuerdo con los antecedentes glaciológicos del último ciclo (Hollin & Schilling 1981, Denton et al. 1999), las regiones Aisén y Magallanes, incluyendo Chiloé continental, fueron drásticamente afectadas por el último máximo glacial, modificando ecosistemas y el rango distribucional de las especies. Los efectos de la glaciación en América del Sur fueron diversos en los ecosistemas dulceacuícolas: obstrucción en los sistemas de drenajes, cambios en sus parámetros fisicoquímicos y fragmentación continental (Clapperton 1993, Turner et al. 1996). Procesos de interacción entre extinción local y recolonización habrían incluso modificado la estructuración poblacional de las especies en zonas antiguamente cubiertas por hielo (Schneider et al. 1998). Algunos ecosistemas habrían actuado como refugios glaciales (Veblen et al. 1996, Villagrán et al. 1996), lo cual sin duda fue un factor determinante del grado de endemismo de las especies patagónicas. Sin embargo, se desconocen sus efectos en la

demografía, hasta que punto lograron sobrevivir efectivamente tales especies en estos drenajes y sus posibles rutas de recolonización (Ruzzante et al. 2008).

Respecto a las especies de Hyriidae, las revisiones actuales han permitido validar a *Diplodon chilensis* Letelier (2006) en casi todo el territorio nacional, no encontrándose a la fecha ningún ejemplar de la subespecie *D. chilensis patagonicus*, la cual estaría presente solo en la Argentina. No obstante, *D. solidulus* se encuentra solo presente en Puerto Montt, lo que permite considerarla endémica del país (Parada & Peredo 2002). En el centro-sur de Chile, en relación con las Sphaeridae, se ha registrado un rango distribucional restringido para las especies *P. llanquihuense* y *P. huillichum*, a diferencia de *P. chilense*, de amplia distribución en Chile. Respecto a *P. observationis* y *P. lebruni*, son especies propias de regiones patagónicas (Ituarte 1996). Sin embargo, *P. observationis* probablemente se halla en áreas geográficas del territorio trasandino, por lo cual debería realizarse una revisión más detallada (Parada & Peredo 2006). En relación con los gasterópodos, en los trabajos de Valdovinos (2006) se describe un 91.7 % de endemismo del total de especies descritas, donde todas las especies de Hydrobiidae, Chilinidae, Physidae y Planorbidae son endémicas; las Lymnaeidae tienen como único representante endémico a *Lymnaea lebruni*, descrita para Punta Arenas; para Ancyliidae solo *Uncancylus foncki* es endémica, conociéndose del río Maullín y el lago Llanquihue; y respecto a *Anisancylus* la información es limitada. Se requiere una revisión detallada y actualizada a nivel de familia, ya que es un grupo muy restringido y desconocido (Valdovinos 1998).

En Chile, la declinación de las poblaciones de moluscos no es muy diferente a la de otras latitudes, siendo sus causas principales el manejo de los cuerpos de agua dulce, la pérdida y/o fragmentación de los hábitats, la alteración por procesos de urbanización y el uso de tecnologías convencionales en la agricultura (Valdovinos et al. 2004, Parada & Peredo 2006). En la actualidad no se han desarrollado criterios y parámetros específicos para la clasificación de los moluscos continentales chilenos en las diferentes categorías de conservación propuestas (IUCN, 1994), y establecidas en el Artículo 37 de la Ley 19,300 sobre Bases Generales del Medio Ambiente (Chile). Existe una propuesta preliminar

de clasificación tentativa de las familias que incluyen especies nativas para la Cordillera de la Costa entre 39° y 42° S, las cuales deberían ser consideradas con precaución sobre la base de información fragmentaria y observaciones generales que aún no han sido reevaluadas (Valdovinos et al. 2004). Por otro lado, la agrupación de las especies en cuencas geográficas permite establecer una base para estudios de conservación (Veloso 2006).

Como consideración final, a pesar de la falta de información en algunas estaciones de muestreo en la Patagonia chilena, se proponen tres áreas de endemismo. Sobre estas deberían orientarse proyectos destinados a la conservación y manejo integrado de las principales cuencas hidrográficas, además de profundizarse los estudios taxonómicos que permitan definir el rango distribucional de las especies a lo largo del territorio nacional.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Ciencias Ambientales EULA-Chile de la Universidad de Concepción por su apoyo. A Viviane Jerez, del Departamento de Zoología de la Universidad de Concepción, por la revisión y sugerencias. A Sergio Letelier del Museo Historia Natural de Santiago por el acceso a las colecciones.

LITERATURA CITADA

- BONETTO A, MP TASSARA & A RUMMI (1986) *Australis* n. subgen. of *Diplodon* Spix (Bivalvia, Unionacea) and its possible relationships with Australian Hyriidae. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* (Chile) 57: 55-61.
- CAVIERES LA, M MIHOC, A MARTICORENA, C MARTICORENA, M BAEZA, O MATTHEI & MTK ARROYO (2005) La flora de la Cordillera de la Costa en la Región del Biobío: Riqueza de especies, géneros familias y endemismos. En: Smith-Ramírez C, JJ Armesto & C Valdovinos (eds) *Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*: 245-552. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- CLAPPERTON CM (1993) Quaternary geology and geomorphology of South America. Elsevier, Amsterdam.
- DENTON GH, CJ HEUSSER, TV LOWELL, PI MORENO, BG ANDERSEN, LE HEUSSER, C SCHLÜCHTER & DR MARCHANT (1999) Interhemispheric linkage of paleoclimate during the last glaciation. *Geografiska Annaler* 2: 107-153.
- DI CASTRI F & E HAJEK (1976) *Bioclimatología de Chile*. Ediciones de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.
- FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- FIGUEROA R, A PALMA, V RUIZ & X NIELL (2007) Análisis comparativo de índices bióticos utilizados en la evaluación de la calidad de las aguas en un río mediterráneo de Chile: Río Chillán, VIII Región. *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 225-242.
- GOLOBOFF P (1998) NONA ver. 2.0. Disponible en http://www.cladistics.com/about_nona.htm.
- HOLLIN JT & DH SCHILLING (1981) Late Wisconsin-Wichselian mountain glaciers and small ice caps. In: Denton JH & TJ Hughes (eds) *The last great ice sheets*: 179-206. Wiley, New York.
- ITUARTE CF (1996) Argentine species of *Pisidium* Pfeiffer, 1821, and *Musculium* Link, 1807 (Bivalvia: Sphaeriidae). *The Veliger* 39: 189-203.
- JAKSIC F, PA MARQUET & H GONZÁLEZ (1997) Una perspectiva ecológica sobre el uso del agua en el Norte Grande: La Región de Tarapacá como caso de estudio. *Estudios Públicos* 68: 171-192.
- LETELIER S (2006) Distribución geográfica de *Diplodon* (*Diplodon*) *chilensis* (Gray 1828) basado en la colección del Museo de Historia Natural (MNHCL), Santiago de Chile. *Amici Molluscarum* (Chile): 13-15.
- MORLA C & F PINEDA (1985) The woody vegetation in the mediterranean-atlantic boundary in the north-west of the Iberian Peninsula. *Candollea* 40: 435-446.
- MORRONE JJ (1994) On the identification of areas of endemism. *Systematic Biology* 43: 438-441.
- MORRONE JJ (2006) Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology* 51: 467-494.
- MORRONE JJ (2009) *Evolutionary biogeography: An integrative approach with case studies*. Columbia University Press, Nueva York.
- NIEMEYER H & P CERECEDA (1984) *Hidrografía*. Ediciones Geografía de Chile. Instituto Geográfico Militar, Santiago.
- NIXON KC (2002) WinClada ver. 1.0000. Disponible en http://www.cladistics.com/about_winc.htm.
- NOY-MEIR I (1973) Desert ecosystems: Environment and producers. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 25-51.
- NOY-MEIR I (1985) Desert ecosystems: Structure and function. En: Evenari M, I Noy-Meir & DW Goodall (eds) *Hot deserts and arid shrublands*: 93-103. Elsevier, Amsterdam.
- PALMA A & R FIGUEROA (2008) Latitudinal diversity of Plecoptera (Insecta) on local and global scales. *Illesia* 4: 81-90.
- PARADA E, S PEREDO & C GALLARDO (1987) Reproductive effort in *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia, Hyriidae) a proposition for its determination. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* (Chile) 58: 121-126.
- PARADA E & S PEREDO (2002) Estado actual de la taxonomía de bivalvos dulceacuícolas chilenos: Progresos y conflictos. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 691-701.
- PARADA E & S PEREDO (2005) La relocalización como una herramienta de conservación y manejo de la biodiversidad: Lecciones aprendidas con *Diplodon chilensis* (Gray 1828) (Bivalvia, Hyriidae). *Gayana* 69: 41-47.

- PARADA E & S PEREDO (2006) Estado de conocimiento de los bivalvos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70: 82-87.
- PARRA O, C VALDOVINOS, R URRUTIA, M CISTERNAS, E HABIT & M MARDONES (2002) Caracterización y tendencias tróficas de cinco lagos costeros de Chile central. *Limnetica* 22: 51-83.
- PEREDO S & E PARADA (1986) Reproductive cycle in the freshwaters mussel *Diplodon chilensis chilensis* (Mollusca: Bivalvia). *Veliger* 28: 418-425.
- PÉREZ-LOSADA M, CG JARA, G BOND-BUCKUP & KA CRANDALL (2002) Conservation phylogenetics of Chilean freshwater crabs *Aegla* (Anomura, Aegliidae): Assigning priorities for aquatic habitat protection. *Biological Conservation* 105: 345-353.
- PUGH PJA & B SCOUT (2002) Biodiversity and biogeography of non-marine Mollusca on the islands of the Southern Ocean. *Journal of Natural History* 36: 927-952.
- RAMÍREZ CD, D CONTRERAS & J SAN MARTIN (1986) Distribución geográfica y formas de vida en hidrófitos chilenos. Actas VIII Congreso Nacional de Geografía, Publicación Especial del Instituto Geográfico Militar 1: 103-110.
- RAMÍREZ CD & C SAN MARTIN (2006) Diversidad de macrófitos chilenos. En: Vila I, A Veloso, R Schlatter & C Ramírez (eds) Macrófitos y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile: 21-70. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- ROSEN BR & AB SMITH (1988) Tectonics from fossils? Analysis of reef-coral and sea-urchin distributions from late Cretaceous to Recent, using a new method. En: Audley-Charles MG & A Hallam (eds) Gondwana and Thethys: 275-301. Oxford University Press, Oxford.
- RUZZANTE DE, SJ WALDE, JC GOSSE, VE CUSSAC, SS ZEMLA, & ED ADAMS (2008) Climate control on ancestral population dynamics: Insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology* 17: 2234-2244.
- SANTIS H (1975) Mapa de regiones hídricas. Editora Nacional Gabriela Mistral, Chile.
- SCHNEIDER C, M CUNNINGHAM & C MORITZ (1998) Comparative phylogeography and the history of endemic vertebrates in the wet tropics rainforest of Australia. *Molecular Ecology* 7: 487-498.
- SCRUB PT, J MESIAS, V MONTECINOS, J RUTLLAND & S SALINAS (1998) Coastal ocean circulation of western South America coastal segment. En: Robinson AR & K Brink (eds) *The sea*: 273-313. Wiley & Sons, Inc, New York.
- SILVA J, C FUENTEALBA, E BAY-SCHMITH & A LARRAÍN (2007) Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un tóxico de referencia. *Gayana* 71: 135-141.
- STUARDO J (1961) Contribución a un catálogo de los moluscos chilenos de agua dulce. *Gayana Zoología* 1: 7-32.
- TENEBA EA, L CAVIERES, M PARRA & A MARTICORENA (2004) Patrones geográficos de distribución de árboles y arbustos en la zona de transición climática mediterráneo-templada de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 77: 51-71.
- TURNER TF, JC TREXLER, DN KUHN & HW ROBINSON (1996) Life history variation and comparative phylogeography of darters (Pisces: Percidae) from the North American Central Highlands. *Evolution* 50: 2023-2036.
- VALDOVINOS C (1989) Catálogo de los moluscos terrestres y dulceacuícolas de la Cordillera de Nahuelbuta y áreas adyacentes. Comunicaciones del Museo Regional de Concepción (Chile) 3: 7-14.
- VALDOVINOS C (1998) Zoobentos. En: Parra O & E Habit (eds) Documento de síntesis estudio de línea base para la evaluación de impacto ambiental del complejo forestal industrial Itata: 67-78. Ediciones Centro EULA-Chile, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- VALDOVINOS C (1999) Catálogo de moluscos chilenos: Base de datos taxonómica y distribucional. *Gayana* 63: 111-164.
- VALDOVINOS C (2006) Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana* 70: 88-95.
- VALDOVINOS C (2008) Invertebrados dulceacuícolas En: Rovira J, J Ugalde & M Stutzin (eds) Biodiversidad de Chile. Patrimonios y desafíos: 202-223. Conama, Chile.
- VALDOVINOS C, C MOYA & V OLMOS (2004) Biodiversidad de moluscos terrestres en la Ecorregión Valdiviana (Chile) En: Smith C, J Armesto & C Valdovinos (eds) Biodiversidad y ecología de los bosques de la Cordillera de la Costa: 292-306. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- VALDOVINOS C & R CUEVAS (1996) Tasas de aclarancia de *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae): Un suspensívoro bentónico dulceacuícola de Chile Central. *Medio Ambiente* 13: 114-118.
- VAN BRUGGEN AC (1980) Gondwanaland connections in the terrestrial mollusks of Africa and Australia. *Journal of the Malacological Society of Australia* 4: 215-222.
- VEBLEN T, T KITSBERGER, B BURNSY, & AJ REBERTUS (1996) Perturbaciones y dinámica y regeneración de bosques andinos del sur de Chile y Argentina. En: Armesto J, C Villagrán & MK Arroyo (eds) Ecología de los bosques andinos de Chile: 169-198. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- VELOSO A (2006) Batracios de las cuencas hidrográficas de Chile: Origen, diversidad y estado de conservación. En: Vila I, A Veloso, R Schlatter & C Ramírez (eds) Macrófitos y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile: 103-139. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- VERA-PALACIOS M (2007) Ephemeroptera (Insecta) en la región de Magallanes. *Anales del Instituto de la Patagonia (Chile)* 35: 35-43.
- VILA I, A VELOSO, R SCHLATTER & C RAMÍREZ (2006) Macrófitos y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- VILLAGRÁN C & L HINOJOSA (1997) Historia de los bosques templados del sur de Sudamérica II: Análisis fitogeográfico. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 241-267.
- VILLAGRÁN C, P MORENO & R VILLA (1996) Antecedentes palinológicos acerca de la historia cuaternaria de los bosques chilenos. En: Armesto J, C Villagrán & MK Arroyo (eds) Ecología de los bosques andinos de Chile: 51-69. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

Editor Asociado: Sylvain Faugeron

Recibido el 19 de marzo de 2009; aceptado el 17 de diciembre de 2009

Endemic gastropod fauna Lake Titicaca: correlation between molecular evolution and hydrographic history.

Ecology and Evolution

Open Access

The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: correlation between molecular evolution and hydrographic history

Keywords

Altiplano, *Heleobia*, molecular clock, phylogeography, species flock.

Correspondence

Thomas Wilke, Department of Animal Ecology and Systematics, Justus Liebig University Gießen, Heinrich Buff Ring 26–32 (IFZ), 35392 Gießen, Germany.
Tel: +49-641-99-35720;
Fax: +49-641-99-35709;
E-mail: tom.wilke@allzool.bio.uni-giessen.de

Received: 17 February 2012; Revised: 19 April 2012; Accepted: 23 April 2012

Ecology and Evolution 2012; 2(7): 1517–1530

doi: 10.1002/ece3.280

Abstract

Lake Titicaca, situated in the Altiplano high plateau, is the only ancient lake in South America. This 2- to 3-My-old (where My is million years) water body has had a complex history that included at least five major hydrological phases during the Pleistocene. It is generally assumed that these physical events helped shape the evolutionary history of the lake's biota. Herein, we study an endemic species assemblage in Lake Titicaca, composed of members of the microgastropod genus *Heleobia*, to determine whether the lake has functioned as a reservoir of relic species or the site of local diversification, to evaluate congruence of the regional paleohydrology and the evolutionary history of this assemblage, and to assess whether the geographic distributions of endemic lineages are hierarchical. Our phylogenetic analyses indicate that the Titicaca/Altiplano *Heleobia* fauna (together with few extralimital taxa) forms a species flock. A molecular clock analysis suggests that the most recent common ancestor (MRCAs) of the Altiplano taxa evolved 0.53 (0.28–0.80) My ago and the MRCAs of the Altiplano taxa and their extralimital sister group 0.92 (0.46–1.52) My ago. The endemic species of Lake Titicaca are younger than the lake itself, implying primarily intralacustrine speciation. Moreover, the timing of evolutionary branching events and the ages of two precursors of Lake Titicaca, lakes Cabana and Ballivián, is congruent. Although Lake Titicaca appears to have been the principal site of speciation for the regional *Heleobia* fauna, the contemporary spatial patterns of endemism have been masked by immigration and/or emigration events of local riverine taxa, which we attribute to the unstable hydrographic history of the Altiplano. Thus, a hierarchical distribution of endemism is not evident, but instead there is a single genetic break between two regional clades. We also discuss our findings in relation to studies of other regional biota and suggest that salinity tolerance was the most likely limiting factor in the evolution of Altiplano species flocks.

Introduction

Ancient Lake Titicaca (Peru/Bolivia), which is located in the northern part of the endorheic, high-elevation Altiplano (Dejoux 1994; Allmendinger et al. 1997; Pawley et al. 2001; Baker et al. 2005; Fig. 1), contains a diverse endemic fauna whose biogeographic history is poorly understood. The fol-

lowing two hypotheses have been proposed for the generation of endemic diversity in ancient lakes (e.g., Martens 1997). (1) These water bodies have functioned as sinks for extralimital biota over long time periods, resulting in the accumulation of phylogenetically diverse assemblages (reservoir function). (2) The lakes have served as a venue for local (intralacustrine) speciation (cradle function). Both of these

Autor(es): Oliver Kroll¹, Robert Hershler², Christian Albrecht¹, Edmundo M. Terrazas³, Roberto Apaza⁴, Carmen Fuentealba⁵, Christian Wolff¹ & Thomas Wilke¹

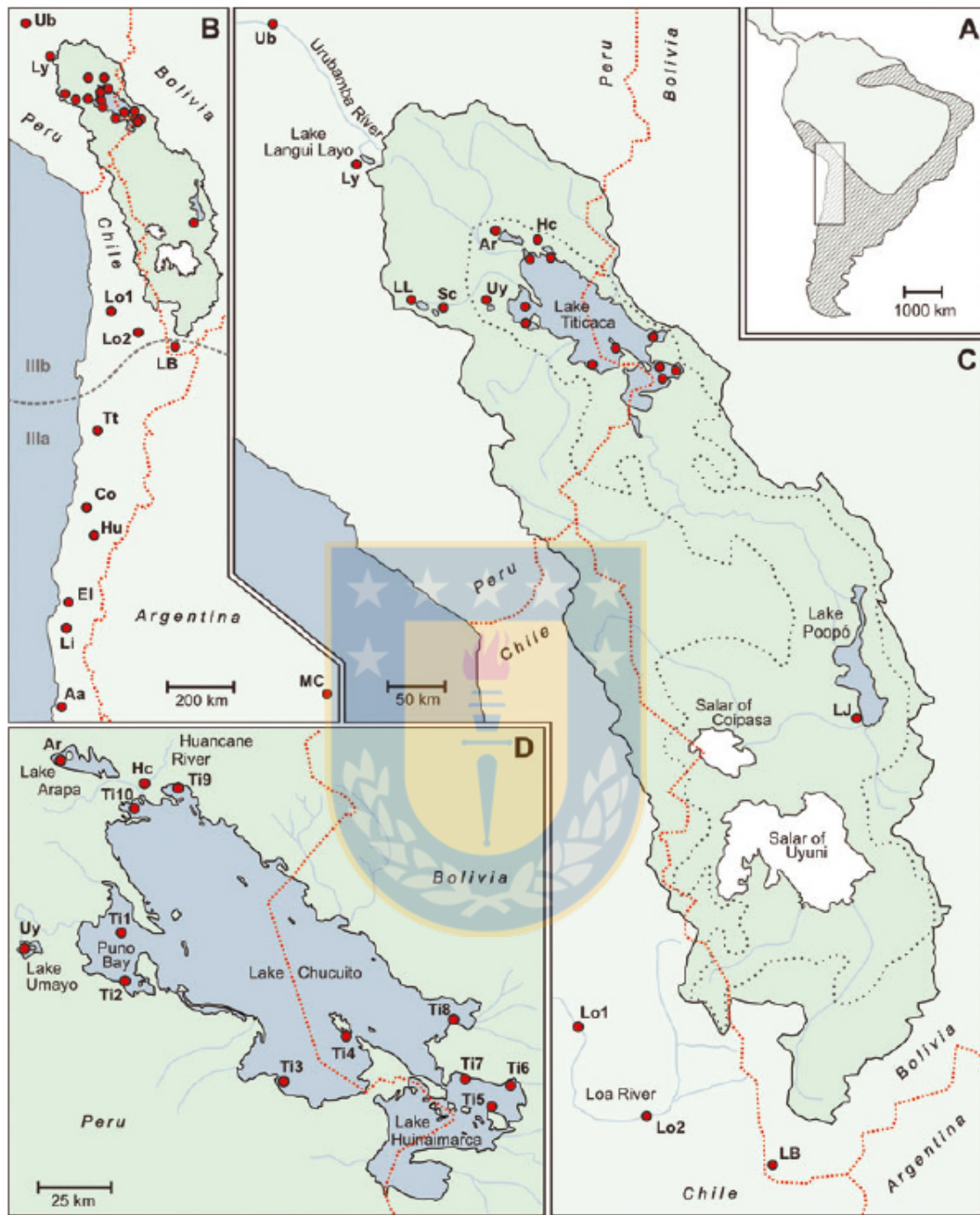


Figure 1. Sampling sites in the Altiplano (red circles). (A) Geographic range of the genus *Heleobia* (dashed area, modified from Hershler and Thompson 1992: map 6) and location of the sampling area (rectangle) in South America. (B) Closeup of the portion of (A) showing the sampling sites outside the Altiplano. The gray dashed line indicates the geographic distribution of the two main *Heleobia* clades IIIa and IIIb. (C) Closeup of the portion of (B) showing the sampling sites in the Altiplano and the major hydrologic features of the region. The maximum prior extent of Lake Titicaca is indicated by a dotted black line (Lavenú 1992; Wirrmann 1992). (D) Closeup of portion of (C) showing the sampling sites in Lake Titicaca and its two subbasins, Lake Chucuito and Lake Huinaimarca. For locality codes see Table 1.

contrasting scenarios assume that the paleohydrology of these lakes has played a pivotal role in the assembly of endemic biota (e.g., Martens 1997).

The history of Lake Titicaca was punctuated by a series of major hydrologic events. The lake originated during the Late Pliocene/Early Pleistocene, about 2–3 million years (My) ago (Lavenú 1992) and underwent several phases of expansion and contraction during the Late Pleistocene that were caused by glacial–interglacial cycles and associated changes in effective moisture (Wirrmann 1992; Argollo and Mourguiart 2000; Cross et al. 2000; Fritz et al. 2007; Blard et al. 2011). At least five major phases have been recognized, which are sometimes referred to as “paleolakes” (Lavenú 1981, 1995; Lavenú et al. 1984; Wirrmann 1992; Cross et al. 2000; Baker et al. 2005; also see Figs. 1C and 2).

The Mataro Lake, coeval with the Purapurani formation (Calvario/Kaluyo interglacial S_5) 1.5–1.6 My ago (Lavenú 1995; also see Lavenú et al. 1984; Marshall and Sempere 1991), was 3950 m in elevation (i.e., ca. 140 m higher than at present) and constituted the largest recorded expansion of Lake Titicaca, overlapping much of the Altiplano (Fig. 1C; Lavenú et al. 1984). Lake Mataro eventually desiccated and Lake Cabana, corresponding to the Kaluyo/Sorata interglacial (S_4) (Lavenú 1995; also see Lavenú et al. 1984; Marshall and Sempere 1991), developed ca. 1.1–1.0 My ago with a maximum lake-level elevation of 3900 m. The third episode gave rise to Lake Ballivián with a lake level of 3860 m (Lavenú 1981; Lavenú et al. 1984). Most authors suggest that Lake Ballivián originated during the Sorata/Choqueyapu I interglacial (S_3/t_3) about 0.6–0.5 My ago (Lavenú 1995; also see Lavenú et al. 1984; Marshall and Sempere 1991; but see Fornari et al. 2001).

Subsequent climatic changes resulted in the North Minchin episode, corresponding to the Choqueyapu I/II (t_2) interglacial (Lavenú 1995), approximately 73–30 kiloyears (ka) ago with a lake level of 3825 m (Fornari et al. 2001), and the North Tauca episode, corresponding to the postglacial Choqueyapu II (t_1) phase (Lavenú 1995), approximately 18.0–14.5 ka ago with a lake level of 3815 m (Blard et al. 2011). Lake-level fluctuations continued into the Holocene; contractions of up to 100 m depth and drastically increased salinity levels have been reported for this time interval (Bentancourt et al. 2000; Cross et al. 2000). It is generally assumed that these paleohydrologic events helped shape the evolutionary history of regional aquatic biota. For example, the repeated cycles of lake extension and shrinking may have promoted dispersal and vicariance, respectively; and desiccation and associated fluctuations in salinity may have resulted in extinction (e.g., Lüssen et al. 2003; Benavides 2005).

The Lake Titicaca region contains at least 533 aquatic species (Dejoux 1994); at least 64 of these (12%) are considered to be endemic (González and Watling 2003; Lüssen et al. 2003; Benavides 2005). However, these numbers are

considerably smaller than in most other ancient lake basins (e.g., Martens 1997). The relatively small number of endemic species in this lake has been attributed to (1) the possibility that the ancestral biota was tropical in origin and consequently was depleted during the uplifting of the Altiplano because few species could tolerate high elevations and/or low temperatures (de Lattin 1967); and (2) the large variation in lacustrine water chemistry during the late Cenozoic, which resulted in extinctions (Wirrmann et al. 1991; Dejoux 1994).

Despite the relatively small number of endemic species in Lake Titicaca, there are possible species flocks of pupfishes (genus *Orestias*; e.g., Lüssen et al. 2003), amphipods (genus *Hyaella*; e.g., González and Watling 2003; Väinölä 2008), and microgastropods (genus *Heleobia*; e.g., Hershler and Thompson 1992). The phylogenetic relationships and biogeographic history of these three groups have not been well established, although the molecular evolution of *Orestias* has been detailed in an unpublished dissertation (Lüssen 2003). That study included preliminary molecular-clock analyses that suggest that speciation was recent and possibly associated with Middle to Late Pleistocene paleohydrologic processes.

Virtually nothing is known about the phylogenetic relationships of the *Heleobia* flock (14 species) in Lake Titicaca. Altiplano congeners are mostly endemic whereas extralimital members of the genus range more widely. This prevailing biogeographical pattern suggests that *Heleobia* may be a particularly suitable group for investigating evolutionary diversification in the Lake Titicaca region.

We here use a molecular clock approach together with a phylogeographical analysis to address the following questions:

- (1) Did Lake Titicaca serve as a biogeographic reservoir for Altiplano species or did the endemic snail lineages in the lake evolve through rapid intralacustrine speciation? This relates to the age and phylogenetic composition of the endemic fauna, and the extent to which evolutionary diversification occurred within the lake.
- (2) Are diversification events in *Heleobia* spp. related to major paleohydrological episodes on the Altiplano? The question is associated with processes of speciation in ancient Lake Titicaca and the abiotic factors driving evolution.
- (3) Are there hierarchical spatial levels of endemism in the Lake Titicaca region? This question is related to the concept of ecological isolation of ancient lake species, that is, assumed low levels of faunal exchange between ancient lakes and their watersheds as well as between watersheds and extralimital areas.

This is the first phylogeographical study of an Altiplano invertebrate species assemblage and may contribute to a better understanding of speciation processes in Lake Titicaca. Furthermore, given that Lake Titicaca differs from most, if not all other ancient lakes in its physical and biotic features, this study may help identify the unifying patterns and processes

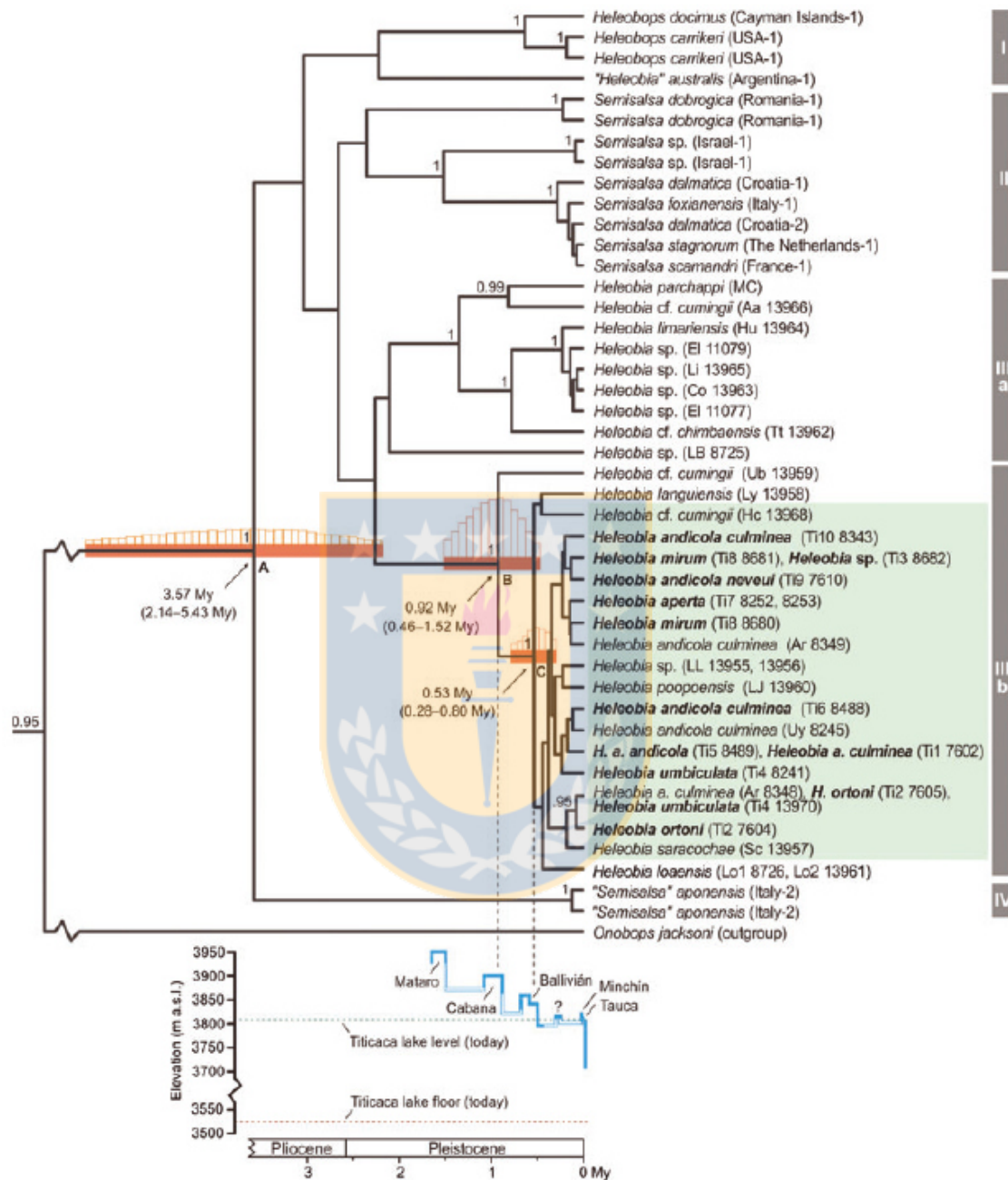


Figure 2. Bayesian phylogenetic tree under the strict clock model inferred from the mitochondrial COI gene (top). Two of the three outgroups (*Spurwthkia salsa*, *Cochilopa* sp.) were removed from the tree a posteriori. Specimens are labeled with a locality code according to Table 1. In addition, specimens of the genus *Helicobops* carry the respective DNA voucher number behind the locality code. Bayesian posterior probabilities are indicated when ≥ 0.95 . Major clades are delineated by gray bars and labeled with Roman numerals. Lake Titicaca specimens are bold faced; specimens from the Altiplano are green shaded. The ages of MRCAs discussed in the text (labeled A–C) are provided and their 95% HPD intervals are illustrated by orange bars (associated node-depth distributions are indicated by white bars above the HPD intervals). Major paleohydrologic events in Lake Titicaca (including prior lake floor levels) are shown below (Early and Middle Pleistocene data are from Lavenú [1995]; Late Pleistocene and Holocene data are from Betancourt et al. [2000] and Blard et al. [2011]). The question mark refers to an unnamed prior configuration of Lake Titicaca (Lavenú 1995) that could be equivalent to the central Altiplano Escara period (Fornari et al. 2001).

in world-wide ancient lakes that, in general, can explain their often outstanding degree of biodiversity.

Methods

Study species and sampling sites

Heleobia Stimpson 1865 is one of three genera belonging to the primarily brackish water subfamily Semisalsinae Giusti and Pezzoli 1980 (Caenogastropoda: Rissooidea: Cochliopidae). The other two are *Semisalsa* Radoman 1974 (treated as a subgenus of *Heleobia* by some authors) and *Heleobops* Thompson 1968. This subfamily is composed of small (typically 2–8 mm in shell height), dioecious fresh water and brackish water gastropods that usually live on hard substrates or aquatic vegetation.

Heleobia is distributed in South America from central Peru south to the Tierra del Fuego, along the eastern coasts of Argentina and Brazil, and in the Amazon Basin (Fig. 1A; also see Hershler and Thompson 1992). The center of diversity of the genus is the Altiplano, which contains 20 species, the majority of which are endemic to Lake Titicaca (Haas 1955, 1957; Blume 1958; Hershler and Thompson 1992).

Our study is based on hierarchical sampling that included (1) eight *Heleobia* taxa from Lake Titicaca, (2) six *Heleobia* taxa from other Altiplano areas, (3) representative *Heleobia* taxa from the Andes and the Chilean coastal region, (4) two congeners from Argentina, (5) seven members of the sister genus *Semisalsa* from Europe and western Asia, and (6) two species of the genus *Heleobops* from North and Central America (Table 1).

Heleobia was sampled in the Altiplano and nearby sites during April–July 2007, October–December 2009, and January 2010. Specimens were collected in shallow waters by hand, in depths of up to 4 m by snorkeling and in depths of up to 38 m by boat using a small triangular dredge, and preserved in 70–80% ethanol. Snails were identified to species and subspecies based on original taxonomic descriptions and published keys (D'Orbigny 1835; Bavay 1904; Pilsbry 1924; Biese 1944, 1947; Haas 1955, 1957; Blume 1958; Dejoux 1992).

DNA extraction, PCR amplification, and sequencing

Genomic DNA was obtained from individual specimens using the CTAB protocol described in Wilke et al. (2006). DNA vouchers were deposited at the University of Giessen Systematics and Biodiversity collection (UGSB) (see Table 1). Digital images of specimens were taken prior to consumptive DNA isolation and deposited in the UGSB database.

We obtained sequences of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene with a target length of 658 base pairs (bps) (excluding 51-bp primer sequence). Forward and

reverse primers for PCR amplification and DNA sequencing were LCO1490 (Folmer et al. 1994) and COR722b (Wilke and Davis 2000); the latter is based on primer HCO2198 (Folmer et al. 1994).

Bidirectional DNA sequencing was performed on a Long Read IR2 4200 sequencer (LI-COR, Lincoln, NE) using the Thermo Sequenase Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). The protein-coding COI sequences, which are free of insertions and deletions in the Rissooidea (Wilke et al. 2001), were unambiguously aligned in BioEdit 7.0.4.1 (Hall 1999). The first base pairs behind the 3' end of each primer were difficult to read. We therefore trimmed these regions, leaving a 638-bp-long overlapping fragment for the COI gene. New sequences were deposited in and additional sequences were taken from GenBank (see Table 1).

Molecular dating: general problems and applicability in *Heleobia* spp.

Molecular dating is a challenging task (e.g., Takahata 2007). At least four conditions have to be met for reliable molecular clock estimations (reviewed in Wilke et al. 2009): (1) the sampling design should be appropriate (i.e., ideally without missing lineages), (2) the gene(s) used should exhibit a low degree of rate heterogeneity within and among lineages, (3) the target gene should also have a good performance over the time frame of interest (i.e., a sufficient number of substitutions but no signs of significant substitutional saturation), and (4) robust internal calibration points and/or external molecular clock rates have to be available.

These conditions severely constrain the possibility of robust molecular dating. Although condition (1) may be satisfied assuming that the target taxa can be sampled, conditions (2) and (3) are violated by a substantial portion of genomic regions (e.g., Takahata 2007). Moreover, in the absence of robust internal calibration points, researchers frequently have to use external clock rates that are gene-specific and thus restrict the number of available genes. Consequently, most molecular dating studies use a single or very few genes, typically derived from mitochondrial DNA. Thus, the basis for molecular clock analyses differs from traditional phylogenetic investigations, which often include several genes derived from mitochondrial and nuclear DNA. Recent molecular clock analyses have incorporated sophisticated procedures for estimating the degree of rate heterogeneity, the error of the clock estimation, and the error of the external clock rate in order to partly compensate for this problem and to obtain meaningful time estimations. Efforts are also made to optimize external clock rates relative to their variability and specificity.

Table 1. Collection and locality data (latitude, longitude, and elevation in parentheses), locality code, DNA voucher number (UGSB collection), and GenBank accession numbers for specimens analyzed in this study. Information on outgroup species is given in the text. *Sequences from GenBank (references in parentheses), **sequences provided by Hsiu-Ping Liu (Metropolitan State College of Denver).

Taxon	Collection site	Locality code	DNA voucher number	GenBank accession number ^a
<i>Heleobops</i>				
<i>Heleobops docimus</i> Thompson 1968	Cayman Islands, Pond at Chisholm Point (19.3486°N, 81.2293°W, 0 m), leg., det.: R. Hershler	Cayman Islands-1	n/a	AF129322 (Hershler et al. 1999)
<i>Heleobops carrieri</i> Davis and McKee 1989	USA, Oyster Pond, Falmouth (41.5345°N, 70.6395°W, 0 m), leg., det.: G. M. Davis	USA-1	584 597	JQ973018 JQ973019
<i>Semisalsa</i>				
<i>"Semisalsa" aponensis</i> (E. von Martens 1858)	Italy, thermal spring near Villaga, Vicenza (45.40°N, 11.53°E), leg., det.: I. Niero	Italy-2	3242 3245	JQ973020 JQ973021
<i>Semisalsa dalmatica</i> (Radoman 1974)	Croatia, Pirovac Spring, Pirovac (43.8167°N, 15.6766°E), leg., det.: A. Falniowski and M. Szarowska	Croatia-1	2114	AF367631 (Wilke et al. 2001)
	Croatia, Krka River, Skradin (43.8172°N, 15.9281°E, 7 m), leg., det.: A. Falniowski	Croatia-2	2099	JQ973022
<i>Semisalsa dobrogica</i> (Grossu and Negra 1989)	Romania, Movile Cave, Mangalia (43.825°N, 28.561°E), leg., det.: not specified in original publication	Romania-1	n/a n/a	EU938128 EU938132 (Falniowski et al. 2008)
<i>Semisalsa foxianensis</i> (De Stefani 1883)	Italy, thermal springs, Torretta establishment, Montecatini Terme (43.89°N, 10.77°E), leg., det.: S. Cianfanelli & E. Loro	Italy-1	3760	JQ973023
<i>Semisalsa stagnorum</i> (Gmelin 1791)	The Netherlands, Kaaskenswaters, Zierikzee (51.65582°N, 3.93580°E, 0 m), leg., det.: T. Wilke	The Netherlands-1	2915	JQ973024
<i>Semisalsa scamandri</i> (Boeters et al. 1977)	France, Étang du Charnier, Saint Gilles (43.62°N, 4.31°E, 0 m), leg., det.: H. Girard	France-1	3088	JQ973025
<i>Semisalsa</i> sp.	Israel, Mouth of Nahal Taninim River, Ma'agan Michael (32.5386°N, 34.9029°E, 0 m), leg., det.: F. Ben-Ami & J. Heller	Israel-1	2005 2148	JQ973026 JQ973027
<i>Heleobia</i>				
<i>Heleobia andicola</i> <i>andicola</i> (D'Orbigny 1835)	Bolivia, Lake Titicaca, Patapatani Island (16.306°S, 68.686°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	T15	8489	JQ973028
<i>Heleobia andicola</i> <i>culminea</i> (D'Orbigny 1840)	Peru, Lake Titicaca, Ramis Bay (15.324°S, 69.831°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	T110	8343	JQ973029
	Bolivia, Lake Titicaca, Huarina (16.209°S, 68.621°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	T16	8488	JQ973030
	Peru, Lake Titicaca, Puno Bay (15.453°S, 69.552°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	T11	7602	JQ973031
	Peru, Lake Arapa, Arapa (15.147°S, 70.104°W, 3815 m), leg., det.: O. Kroll	Ar	8348 8349	JQ973032 JQ973033
	Peru, Lake Umayo, Umayo Island (15.739°S, 70.171°W, 3840 m), leg., det.: O. Kroll	Uy	8245	JQ973034
<i>Heleobia andicola neveu</i> (Bavay 1904)	Peru, Lake Titicaca, Vilque Chico (15.236°S, 69.695°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	T19	7610	JQ973035
<i>Heleobia aperta</i> (Haas 1955)	Bolivia, Lake Titicaca, Chua (16.120°S, 68.449°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	T17	8252 8253	JQ973036 JQ973037
<i>"Heleobia" australis</i> (D'Orbigny 1835)	Argentina, Mar Chiquita, Cangrejito Inlet (37.7442°S, 57.4195°W, 69 m), leg., det.: R. Hershler (USNM 1002579)	Argentina-1	n/a**	JQ972708**

Table 1. Continued.

Taxon	Collection site	Locality code	DNA voucher number	GenBank accession number*
<i>Heleobia</i> cf. <i>chimbaensis</i> (Biese 1944)	Chile, Quebrada de Taltal (25.503°S, 70.411°W, 577 m), leg., det.: O. Kroll	Tt	13962	JQ973038
<i>Heleobia</i> cf. <i>cumingii</i> (D'Orbigny 1835)	Peru, Huancane River (15.216°S, 69.792°W, 3815 m), leg., det.: O. Kroll	Hc	13968	JQ973039
	Peru, Urubamba River, Urubamba (13.312°S, 72.110°W, 2861 m), leg., det.: O. Kroll	Ub	13959	JQ973040
<i>Heleobia</i> cf. <i>languiensis</i> (Haas 1955)	Chile, Aconcagua River, Concon (32.916°S, 71.497°W, 0 m), leg., det.: O. Kroll	Aa	13966	JQ973041
	Peru, Lake Langui Layo (14.452°S, 71.280°W, 3999 m), leg., det.: O. Kroll	Ly	13958	JQ973042
<i>Heleobia</i> <i>limariensis</i> (Biese 1944)	Chile, Huasco River, Vallenar (28.579°S, 70.765°W, 380 m), leg., det.: O. Kroll	Hu	13964	JQ973043
<i>Heleobia</i> <i>loaensis</i> (Biese 1947)	Chile, Loa River, Quillagua (21.637°S, 69.549°W, 812 m), leg.: U. Bößneck, det.: O. Kroll	Lo1	8726	JQ973044
	Chile, Loa River, Calama (22.453°S, 68.903°W, 2260 m), leg., det.: O. Kroll	Lo2	13961	JQ97304
<i>Heleobia</i> <i>mirum</i> (Haas 1957)	Bolivia, Lake Titicaca, Ajllata (16.011°S, 68.819°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	Tl8	8680	JQ973046
			8681	JQ973047
<i>Heleobia</i> <i>ortoni</i> (Pilsbry 1924)	Peru, Lake Titicaca, Chucuito (15.882°S, 69.898°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	Tl2	7604	JQ973048
<i>Heleobia</i> <i>parchappi</i> (D'Orbigny 1835)	Argentina, Mar Chiquita, Canal Ea (37.5468°S, 57.3128°W, 69 m), leg., det.: R. Hershler (USNM 1002582)	MC	n/a**	JQ972709**
<i>Heleobia</i> <i>poopoenis</i> (Bavay 1904)	Bolivia, Laca Jahuirá River (19.079°S, 67.314°W, 3696 m), leg., det.: O. Kroll	LJ	13960	JQ973050
<i>Heleobia</i> <i>saracocha</i> (Haas 1955)	Peru, Lake Saracocha (15.764°S, 70.621°W, 4154 m), leg., det.: O. Kroll	Sc	13957	JQ973051
<i>Heleobia</i> <i>umbiculata</i> (Haas 1955)	Bolivia, Lake Titicaca, Sol Island (16.044°S, 69.156°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	Tl4	8241	JQ973052
			13970	JQ973053
<i>Heleobia</i> sp.	Peru, Lake Titicaca, Chocasuyu (16.205°S, 69.398°W, 3809 m), leg., det.: O. Kroll	Tl3	8682	JQ973054
	Peru, Lake Lagunillas (15.706°S, 70.806°W, 4174 m), leg., det.: O. Kroll	LL	13955	JQ973055
	Bolivia, Lake Blanca (22.812°S, 67.766°W, 4323 m), leg.: U. Bößneck, det.: O. Kroll	LB	13956	JQ973056
	Chile, Coplazo River, Atacama (27.808°S, 70.128°W, 800 m), leg., det.: O. Kroll	Co	8725	JQ973057
	Chile, Elqui River, Coquimbo (29.961°S, 71.322°W, 0 m), leg., det.: B. Werdling	EI	11077	JQ973059
	Chile, Limari River, Ovalle (30.597°S, 71.176°W, 215 m), leg., det.: O. Kroll	LI	11079	JQ973060
			13965	JQ973061

Here, we use such a “trait-specific” external clock rate (i.e., a rate that can be assigned to a range of taxa that share similar biological and life-history characteristics supposedly affecting rate heterogeneity) for the COI gene proposed by Wilke et al. (2009). This trait-specific rate has been shown to perform well in dioecious aquatic protostomes from tropical and subtropical habitats that share a generation time of approximately one year and a body size of 2–50 mm. All of these conditions are met by *Heleobia*.

Phylogenetic and molecular clock analyses

Fifty ingroup sequences and three cochliopid outgroup sequences (*Spurwinkia salsa* [GenBank accession number AF367633, Wilke et al. 2001], *Cochliopa* sp. [AF354762, Liu et al. 2001], and *Onobops jacksoni* [AF367645, Wilke et al. 2001]) were used for the phylogenetic and molecular clock analyses.

The best-fit model of sequence evolution was inferred based on the Bayesian information criterion by conducting dynamical likelihood ratio tests in jModelTest 0.1.1 (Posada

2008). Given that molecular clock analyses are particularly sensitive to substitution saturation (Wilke et al. 2009), we tested the degree of saturation using the entropy-based method of Xia et al. (2003) as implemented in DAMBE 5.2.9 (Xia and Lemey 2009). The input parameter for invariable sites was taken from jModelTest. The test did not indicate substantial saturation even under the conservative assumption of an asymmetrical tree as indicated by an “index of substitution saturation value” ($I_{ss} = 0.309$) being significantly smaller than the respective critical value ($I_{ss.c} = 0.386$).

We then tested whether the molecular clock hypothesis was accepted (i.e., whether a strict molecular clock can be assumed) using the Bayes factor (Kass and Raftery 1995) as model-choice criterion. In order to generate the Bayes factor, we conducted two Bayesian Inference analyses (no clock vs. strict clock assumption) in MrBayes 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003) with the nucleotide substitution model suggested by jModelTest (i.e., GTR + I + G). The individual analyses were terminated when the final average standard deviations of split frequencies in MrBayes reached values of <0.01 . The posterior distributions were then used to estimate the Bayes factor. The harmonic means of $-\ln = 3142.4$ and $-\ln = 3151.8$ for the strict clock and no clock models, respectively, and the resulting Bayes factor of 18.8 provide strong evidence against the no clock model (see Kass and Raftery 1995 for an interpretation of Bayes factor values). Therefore, the strict clock model was used for subsequent phylogenetic analyses.

Priors for the Bayesian analysis were specified in BEAUti v.1.6.1 (Drummond and Rambaut 2007) as follows: site model = GTR + I + G (four gamma categories); clock model = strict clock (with a normal prior distribution as well as the COI trait specific clock rate of 0.017 and a standard deviation of 0.0034 suggested by Wilke et al. 2009). Phylogenetic reconstruction and estimation of the age of selected most recent common ancestors (MRCAs) were done in BEAST v.1.6.1 (Drummond and Rambaut 2007). We performed three independent analyses with different seeds and 10 Mio generations each.

During the runs, every 1000th tree was sampled and parameter convergence was monitored in Tracer v.1.5.0 (Drummond and Rambaut 2007). The combined set of trees showed both high ESS (effective sample size) values (>3000 for all major parameters) and a smooth frequency plot, indicating that the sampled trees well represent the posterior distribution. We then computed a consensus tree in TreeAnnotator v.1.6.1 (Drummond and Rambaut 2007) with the posterior probability limit set to zero and the first 10% of generations ignored as burn-in. From this tree, we obtained the means of selected time estimates and their 95% highest posterior density (HPD) intervals (i.e., the Bayesian analog to a confidence interval). This conservative error estimation incorporated both the errors of the phylogenetic analysis (i.e.,

the node-depth variation of individual Bayesian trees) and the error of the trait-specific COI clock rate. Note that we did not correct our clock estimates for ancestral polymorphism since the trait-specific Protostomia COI clock applied here is also uncorrected (Wilke et al. 2009). Given that this external rate is based on calibration points that have an average age of 3 My, there may be a small bias toward overestimation of divergence times for events younger than 3 My and underestimation for older events.

Phylogeographical analysis

We constructed a parsimony haplotype network for Altiplano *Heleobia* utilizing TCS 1.21 (Clement et al. 2000), with the connection limit set to 95%.

Results

Phylogenetic analysis

The consensus Bayesian tree under the strict clock assumption is shown in Figure 2. This topology delineates four clades whose MRCAs predate the Pleistocene. These correspond to the genus *Heleobops* and the South American “*Heleobia*” *australis* (clade I), the European/western Asian genus *Semisalsa* (clade II), the genus *Heleobia* (clade III), and representatives of the Italian thermal water species “*Semisalsa*” *aponensis* (clade IV). The *Heleobia* clade (III) is subdivided into geographically distinct subclades. Clade IIIb is composed of taxa distributed in Altiplano and Andean localities to the west and north of this plateau (herein referred to as the “northern *Heleobia* clade”); clade IIIa is composed of species distributed slightly to the south of the Altiplano (“southern *Heleobia* clade”). Although many of the young clades are not well supported, suggesting a need for additional phylogeographical analyses (see below), all of the deeper nodes pertinent to the goals of this study are supported by Bayesian posterior probability (BPP) values of ≥ 0.95 . These are the MRCAs of the Semisalsinae (split A in Fig. 2), the northern *Heleobia* clade (split B), and the Altiplano taxa (split C).

Our results indicate that the Lake Titicaca *Heleobia* assemblage is not monophyletic but instead forms a clade together with other Altiplano species and two species that are distributed in areas adjacent to the Altiplano (i.e., Loa River and Lake Langui Layo). The sister to this clade is a congener distributed to the north of the Altiplano (*Heleobia* cf. *cumingii*, Urubamba River).

Molecular clock analysis

We only estimated the age of those clades that are well supported and pertinent to the goals of this paper. The MRCA of Semisalsinae exemplars is 3.57 My old with a 95% HDP interval of 2.14–5.43 My (see split A). The MRCA of the Altiplano fauna and its extralimital sister group (i.e., the northern *Heleobia* clade) is 0.92 (0.46–1.52) My old (split B) and the

MRCA of the Altiplano fauna is only 0.53 (0.28–0.80) My old (split C).

Network analysis

The COI-based TCS network for the northern *Heleobia* clade (corresponding to clade IIIb in Fig. 2) is shown in Figure 3. It consists of 19 haplotypes, six of which are shared. The haplotype with the highest probability of being ancestral is shared by two specimens from Lake Titicaca (Ti5 8489 and Ti1 7602). Specimens from Lake Titicaca and other Altiplano sites cluster together as in the Bayesian tree. Extralimital specimens (i.e., Ly 13958, Ub 13959, and Lo1 8726/Lo2 13961) have terminally positioned (young) haplotypes.

Haplotypes derived from the same species do not always cluster together and substitutional differences among species are generally low. Furthermore, some haplotypes are shared among species. This implies incomplete lineage sorting, hybridization, or confused taxonomy. Note that some specimens were morphologically transitional between species (indicated as white circles in Fig. 3), further suggesting hybridization.

Discussion

Lake Titicaca: reservoir versus cradle function

The generation of endemic diversity in ancient lakes has been generally attributed to multiple independent colonization events (reservoir function) or intralacustrine diversification of single lineages (cradle function). Previous studies typically favored the reservoir function model (e.g., Rossiter and Kawanabe 2000) or a combination of both models (Wilson et al. 2004). Most of the recently published data, however, support the intralacustrine speciation model. Examples include faunas of Lake Baikal (e.g., Kaygorodova et al. 2007), Lake Tanganyika (e.g., Marijnissen et al. 2006), Lake Malawi (e.g., Schultheiß et al. 2009, 2011), and Lake Ohrid (e.g., Albrecht et al. 2006; Wilke et al. 2007; Wysocka et al. 2008; Trajanovski et al. 2010). Our findings are highly pertinent to this subject and suggest the following:

- (1) The Altiplano *Heleobia* fauna (together with several species distributed in close proximity to this region) is a species flock.
- (2) The evolutionary development of this flock postdates the age of the lake, suggesting that the flock is a product of intralacustrine and/or other local speciation events.
- (3) The haplotype with the highest probability of being ancestral is shared by two Lake Titicaca specimens (Fig. 3). Furthermore, all but one internal haplotype in this network are from Lake Titicaca specimens (the only exception is haplotype Ar 8349 from Lake Arapa, a small satellite lake only 7 km north of Lake Titicaca). This suggests that Lake Titicaca

was the principal site of speciation within the region (although not necessarily the center of origin of the species flock).

Our finding of primarily intralacustrine speciation is not contradicted by the distribution of a few members of the flock in extralimital areas closely proximal to the Altiplano. The haplotypes of these taxa are peripherally positioned in the phylogeographical network (Fig. 3) and thus are possibly derived from Altiplano taxa. These extralimital areas may have been colonized via drainages originating close to the Altiplano such as the Loa (*Heleobia loaensis*), the Urubamba (*H. cf. cumingii*), and the Jilatunga and Quelcapampa rivers. The latter two drain into Lake Langui Layo, which contains endemic *H. languiensis*. However, given that some of these haplotypes cluster as outgroups to Altiplano/Lake Titicaca haplotypes in the phylogenetic analysis (Fig. 2), we cannot exclude the possibility that the Altiplano was colonized by an MRCA originating in these areas.

Correlation between paleohydrology and molecular evolution

One of our most striking results of this study is the close correlation of cladogenetic events with prior hydrological configurations of Lake Titicaca. The age of the Cabana episode approximates the onset of diversification of the *Heleobia* flock (event B in Fig. 2). Although this episode may have separated ancestral Altiplano taxa from those distributed to the north of the plateau, the tree topology does not indicate an increased rate of speciation at this time. Substantial diversification occurred coincident with the Ballivián episode (event C in Fig. 2), giving rise to all extant Altiplano taxa. Note that the 95% HDP intervals of splits B and C extend beyond the duration of the respective "paleolakes" (which, in turn, are also poorly dated). Therefore, a random correlation cannot be ruled out completely. However, the pattern observed for the *Heleobia* flock matches that found in another group of regionally endemic species, the "Agassii" pupfish complex (genus *Orestias*). Based on a different genetic marker, Lüssen (2003) inferred that lineage diversification within this complex occurred 0.53–0.88 My ago. This well conforms to the 95% HDP interval of 0.28–0.80 My that we estimated for the diversification of the *Heleobia* flock. Lüssen (2003) similarly associated colonization of the central and southern Altiplano by pupfishes with the Ballivián episode.

Spatial levels of endemism

Ancient lakes are typically characterized by a relative large number of endemic species. There is also a low level of faunal exchange between the lake and neighboring water bodies; endemic lacustrine organisms typically outcompete invading species but are often inferior outside the lake system (a pattern

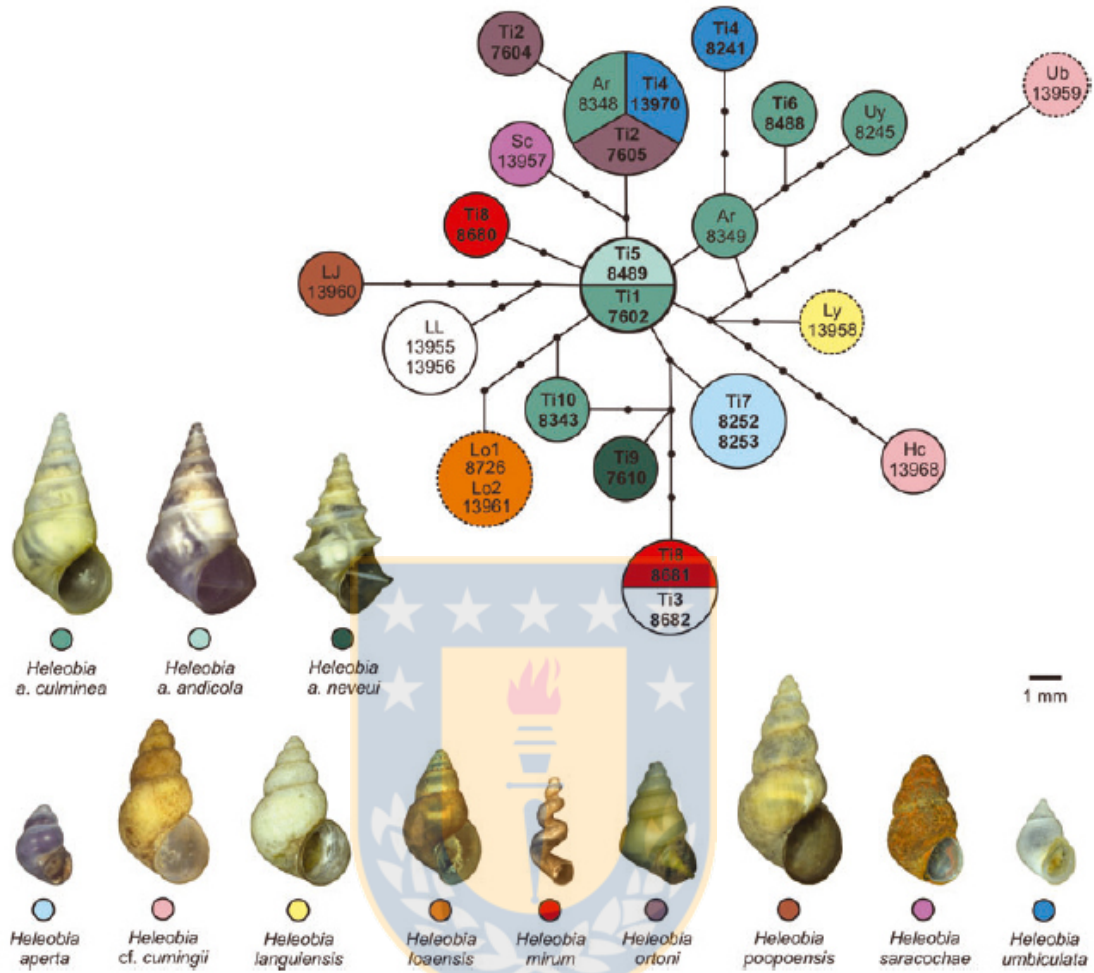


Figure 3. Statistical parsimony haplotype network for members of the northern *Heleobia* clade. Haplotypes are color-coded by nominal taxa (white circles indicate specimens that either could not be identified or that appear to be transitional forms). Circle areas are scaled in proportion to the number of specimens sharing the respective haplotype. Missing haplotypes are indicated by black dots. Haplotypes from Lake Titicaca and from areas outside the Altiplano are marked by bold face and dashed circles, respectively. The haplotype with the highest probability of being ancestral is indicated by a bold circle. Specimens are labeled with locality codes and DNA voucher numbers (see Table 1).

first noted by Brooks 1950 and today sometimes referred to as eco-insularity, Albrecht and Wilke 2008; Wilke et al. 2010).

The spatial scale of these patterns varies. Endemism and eco-insularity have been documented in isolated areas in a lake (point endemism), at the lake level, at the level of the lake and associated water bodies, and at the entire lake basin level (e.g. Albrecht and Wilke 2008; Schreiber et al. 2012).

There have been no comprehensive assessments of the processes that shape these spatial patterns. Although the watersheds of ancient lake have been little investigated biologically,

there is some evidence suggesting that in relatively stable lacustrine systems, endemism is mostly concentrated at the lake level or even within the entire (see Shirokaya 2007 for Lake Baikal, Michel et al. 2004 for Lake Tanganyika, and Albrecht and Wilke 2008 for Lake Ohrid). In less-stable ancient lake systems, there often is evidence of increased faunal exchange within the entire watershed, thus leading to a spatial expansion of endemism (see Genner et al. 2007 and Schultheiß et al. 2009, 2011 for Lake Malawi; Albrecht et al. 2012 for Lake Prespa; and Dumont 1998 for the Caspian Sea).

The *Heleobia* flock conforms to the latter pattern. The network analysis (Fig. 3) implies that Lake Titicaca is the center of diversification in the Altiplano region, which is, in turn, the center of diversification of the northern *Heleobia* clade. However, this hierarchy of contributing biogeographic processes has been somewhat confused by recent immigration and/or emigration events of riverine taxa, resulting in a contemporary pattern that is largely nonhierarchical—that is, there is a single genetic break between the northern and southern *Heleobia* clades.

Our study also provides a possible explanation for why the total number of endemic species in Lake Titicaca, in general, and the number of species flocks, in particular, is low compared to other ancient lake faunas. The biological attributes of the regional species flocks (i.e., *Orestias*, *Hyaletta*, *Heleobia* flocks) suggest that their ancestors all had the potential for adapting to a brackish water lifestyle. *Heleobia* is a primarily brackish water group (Hershler and Thompson 1992), *Hyaletta* contains widespread brackish water representatives outside the Altiplano (Vainöla et al. 2008), and the potential sister groups of *Orestias* (i.e., the pupfish genera *Cyprinodon* and *Aphanius*) contain species living in estuarine or otherwise highly mineralized waters (Lüssen et al. 2003). This suggests that the groups that diversified in the Altiplano have a relatively high salinity tolerance and their progenitors may have been able to tolerate severe changes in salinity during Quaternary paleohydrologic episodes. In contrast, taxa having a lower salinity tolerance may have been prone to extinction (e.g., Benavides 2005) or possibly colonized the Altiplano only within the past 3600 years after the lakes returned to freshwater conditions (Ybert 1992).

Concluding remarks

Our sampling design and choice of marker were optimized to address evolutionary questions above the species level and to utilize a reliable trait-specific clock rate for molecular dating. Future studies should focus on sampling more populations. Moreover, the identification of potential fossil calibration points (e.g., earliest appearance of fossil *Heleobia* in the Altiplano) would assist molecular dating by enabling the use of multilocus approaches.

The species-level taxonomy of Titicaca/Altiplano *Heleobia* needs to be better resolved. Our results imply incomplete lineage sorting and hybridization as previously observed in regional pupfishes. An analysis of highly variable nuclear markers (such as microsatellites) combined with morphological and ecological studies may be useful in this regard.

Nonetheless, we suggest that adding more markers would not change the results or conclusions derived from this paper because we used a highly conservative molecular dating approach that took into consideration the node-depth variation of the COI trees.

Our findings contribute to a rapidly growing body of evidence suggesting that (1) the high degree of endemic biodiversity in ancient lakes is largely the product of intralacustrine speciation, (2) much of this diversification is geologically recent and was triggered by lake-level and associated environmental changes, and (3) the spatial scale of endemism is correlated with watershed stability.

Acknowledgments

We would like to thank D. Aranibar and all employees of the Reserva Nacional del Titicaca (RNT) for their hospitality and support. We are very grateful to M. Bodon, U. Bößneck, S. Cianfanelli, G. M. Davis, A. Falniowski, C. Gamarra, H. Girardi, K. Gonzales, E. Gutierrez, J. Heller, E. Loro, W. Maldonado, E. Miranda, I. Niero, D. Pineda, M. Szarowska, and B. Werding for providing valuable materials and for supporting our fieldwork. We also thank S. Nachtigall for her help with the DNA work as well as R. Schultheiß, M. Haase, and an anonymous referee for their critical comments on a previous version of this paper. H.-P. Liu kindly provided two unpublished *Heleobia* sequences for this study. This study was inspired by the Diploma thesis of O. Kroll, supervised by S. Richter. Partial support for the study came from the DAAD Center of Excellence in Marine Sciences (CEMarin) in Santa Marta, Colombia and from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) grants WI 1902/8-1 and AL 1076/3-1.

References

- Albrecht, C., and T. Wilke. 2008. Ancient Lake Ohrid: biodiversity and evolution. *Hydrobiologia* 615:103–140.
- Albrecht, C., S. Trajanovski, K. Kuhn, B. Streit, and T. Wilke. 2006. Rapid evolution of an ancient lake species flock: freshwater limpets (Gastropoda: Ancyliidae) in the Balkan lake Ohrid. *Org. Divers. Evol.* 6:294–307.
- Albrecht, C., T. Hauffe, K. Schreiber, and T. Wilke. 2012. Assessing mollusc biodiversity in an endangered European ancient lake system: lakes Prespa and Mikri Prespa in the Balkans. *Hydrobiologia* 682:47–59.
- Allmendinger, R. W., T. E. Jordan, S. M. Kay, and B. I. Isaacs. 1997. The evolution of the Altiplano-Puna plateau of the Central Andes. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 25:139–174.
- Argollo, J., and P. Mourguiart. 2000. Late Quaternary climate history of the Bolivian Altiplano. *Quat. Int.* 72:37–51.
- Baker, P. A., S. C. Fritz, J. Garland, and E. Ekdahl. 2005. Holocene hydrologic variation at Lake Titicaca, Bolivia/Peru, and its relationship to North Atlantic climate variation. *J. Quat. Sci.* 20:655–662.
- Bavay, A. 1904. Mission de Crequi-Montfort et Senechal de la Grange en Amerique du Sud. Mollusques terrestres et fluviatilis recoltés par le Dr Neveu-Lemaire. *Bull. Soc. Zool. France* 29:152–156.

- Benavides, E. 2005. The *Telmatobius* species complex in Lake Titicaca: applying phylogeographic and coalescent approaches to evolutionary studies of highly polymorphic Andean frogs. *Monogr. Herpetol.* 7:167–185.
- Betancourt, J. L., C. Latorre, J. A. Rech, K. Quade, and A. Rylander. 2000. A 22,000-year record of monsoonal precipitation from Northern Chile's Atacama Desert. *Science* 289:1542–1546.
- Biese, W. A. 1944. Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte I, Familia Amnicolidae. *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 22:169–190.
- Biese, W. A. 1947. Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte I, Familia Amnicolidae (continuación). *Boletín del Museo de Historia Natural, Chile* 23:63–77.
- Blard, P.-H., F. Sylvestre, A. K. Tripathi, C. Claude, C. Causse, A. Coudrain, T. Condom, J.-L. Seidel, F. Vimeux, C. Moreau, et al. 2011. Lake highstands on the Altiplano (Tropical Andes) contemporaneous with Heinrich 1 and the Younger Dryas: new insights from 14 C, U-Th dating and $\delta^{18}O$ of carbonates. *Quat. Sci. Rev.* 30:3973–3989.
- Blume, W. 1958. Littoridinen aus dem Titicacasee (Mollusca). *Opuscula Zoologica* 25:1–8.
- Brooks, J. L. 1950. Speciation in ancient lakes. *Quat. Rev. Biol.* 25:131–176.
- Clement, M., D. Posada, and K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9:1657–1660.
- Cross, S. L., P. A. Baker, G. O. Seltzer, S. C. Fritz, and R. B. Dunbar. 2000. A new estimate of the Holocene low-stand level of Lake Titicaca (16°S) and implications for regional paleohydrology. *Holocene* 10:21–32.
- Dejoux, C. 1992. The Mollusca. Pp. 311–336 in C. Dejoux, and A. Ilties, eds. *Lake Titicaca—a synthesis of limnological knowledge*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dejoux, C. 1994. Lake Titicaca. *Archiv für Hydrobiologie—Adv. Limnol.* 44:35–42.
- de Lattin, G. 1967. *Grundriss der Zoogeographie*. Fischer Verlag, Stuttgart, Germany.
- D'Orbigny, A. 1835. *Synopsis terrestrium et fluviatilium Molluscorum in suo per American meridionalem itinere collectorum*. *Mag. Zool.* 5:1–44.
- Drummond, A. J., and A. Rambaut. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7:214.
- Dumont, H. J. 1998. The Caspian Lake: history, biota, structure, and function. *Limnol. Oceanogr.* 43:44–52.
- Falniowski, E., M. Szarowska, I. Sirbu, A. Hillebrand, and M. Baciu. 2008. *Heleobia dobrogica* (Grossu & Negrea, 1989) (Gastropoda: Rissooidea: Cochliopidae) and the estimated time of its isolation in a continental analogue of hydrothermal vents. *Molluscan Res.* 28:165–170.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. A. Lutz, and R. C. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:294–299.
- Fornari, M., F. Risacher, and G. Féraud. 2001. Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 172:269–282.
- Fritz, S. C., P. A. Baker, G. O. Seltzer, A. Ballantyne, P. M. Tapia, H. Cheng, and R. L. Edwards. 2007. Quaternary glaciations and hydrologic variation in the South American tropics as reconstructed from the Lake Titicaca drilling project. *Quat. Res.* 68:410–420.
- Genner, M. J., P. Nichols, G. R. Carvalho, R. L. Robinson, P. W. Shaw, A. Smith, and G. F. Turner. 2007. Evolution of a cichlid fish in a Lake Malawi satellite lake. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 274:2249–2257.
- González, E. R., and L. Watling. 2003. A new species of *Hyaella* from the Patagonia, Chile with re-description of *H. simplex* Schellenberg, 1943 (Crustacea: Amphipoda). *J. Nat. Hist.* 37:2077–2094.
- Haas, F. 1955. The Percy Sladen Trust Expedition to Lake Titicaca in 1937, 17: Mollusca: Gastropoda. *Transactions of the Linnean Society of London* 1:275–308.
- Haas, F. 1957. Eine neue endemische Schnecke aus dem Titikaca-See. *Arch. Moll.* 85:137–139.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- Hershler, R., and F. G. Thompson. 1992. A review of the aquatic gastropod subfamily Cochliopinae (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Malacol. Rev. Suppl.* 5:1–140.
- Hershler, R., H. P. Liu, and M. Mulvey. 1999. Phylogenetic relationships within the aquatic snail genus *Tryonia*: implications for biogeography of the North American Southwest. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13:377–391.
- Kass, R. E., and A. E. Raftery. 1995. Bayes factors. *J. Am. Stat. Assoc.* 90:773–795.
- Kaygorodova, I. A., D. Yu. Sherbakov, and P. Martin. 2007. Molecular phylogeny of Baikalian Lumbriculidae (Oligochaeta): Evidence for recent explosive speciation. *Comp. Cytogenet.* 1:71–84.
- Lavenú, A. 1981. Origine et évolution néotecto-nique du lac Titicaca. *Rev. Hydrobiol. Trop.* 14:289–297.
- Lavenú, A., M. Fornari, and M. Sebrier. 1984. Existence de deux nouveaux épisodes lacustres Quaternaires dans l'Altiplano Péruvo-Bolivien. *Cah. O.R.S.T.O.M., ser. Geol.* 14:103–114.
- Lavenú, A. 1992. Formation and geological evolution. Pp. 3–15 in C. Dejoux and A. Ilties, eds. *Lake Titicaca—a synthesis of limnological knowledge*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Lavenú, A. 1995. Geodinamica Plio-Cuaternaria en los Andes Centrales: El Altiplano Norte de Bolivia. *Revista Técnica de YPFB* 16:79–96.

- Liu, H.-P., R. Hershler, and F. G. Thompson. 2001. Phylogenetic relationships of the Cochliopinae (Rissooidea: Hydrobiidae): an enigmatic group of aquatic gastropods. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21:17–25.
- Lüssen, A. 2003. Zur Systematik, Phylogenie und Biogeographie chilenischer Arten der Gattung *Orestias* Valenciennes, 1839 (Teleostei, Cyprinodontidae): morphologische, biochemische und molekularbiologische Befunde. Ph.D. thesis, University of Hamburg, Hamburg, Germany.
- Lüssen, A., T. M. Falk, and W. Villwock. 2003. Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29:151–160.
- Marijnissen, S. A. E., E. Michel, S. R. Daniels, D. Erpenbeck, S. B. J. Menken, and E. R. Schram. 2006. Molecular evidence for recent divergence of Lake Tanganyika endemic crabs (Decapoda: Platyhelphusidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 40:628–634.
- Marshall, L. G., and T. Sempere. 1991. The Eocene to Pleistocene vertebrates of Bolivia and their stratigraphic context: a review. Pp. 631–652 in R. Suarez-Soruco, ed. *Fosiles y facies de Bolivia: Vertebrados*. Revista Técnica de Yacimientos Petrolíferos Fiscales Bolivianos, Santa Cruz, Bolivia.
- Martens, K. 1997. Speciation in ancient lakes (review). *Trends Ecol. Evol.* 12:177–182.
- Michel, E., J. A. Todd, D. E. R. Cleary, I. Kingma, S. A. Cohen, and M. J. Gerner. 2004. Scales of endemism: challenges for conservation and incentives for evolutionary studies in a gastropod species flock from Lake Tanganyika. *J. Conchol.* 3:1–18.
- Pawley, A., S. C. Fritz, P. A. Baker, G. O. Seltzer, and R. Dunbar. 2001. The biological, chemical, and physical limnology of Lake Titicaca, Bolivia/Peru. Pp. 195–215 in M. Munawar and R. Hecky, eds. *The Great Lakes of the World: food web, health and integrity*. Ecovision world monograph series. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Pilsbry, H. A. 1924. South American land and freshwater molluscs. Notes and descriptions. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 76:49–66.
- Posada, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25:1253–1256.
- Ronquist, F., and J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572–1574.
- Rossiter, A., and H. Kawanabe. 2000. *Ancient lakes: biodiversity, ecology and evolution*. Academic Press, London & New York.
- Schreiber, K., T. Hauffe, C. Albrecht, and T. Wilke. 2012. The role of barriers and gradients in differentiation processes of pyrgulinid microgastropods of Lake Ohrid. *Hydrobiologia* 682:61–73.
- Schultheiß, R., B. Van Bocxlaer, T. Wilke, and C. Albrecht. 2009. Old fossils—young species: evolutionary history of an endemic gastropod assemblage in Lake Malawi. *Proc. R. Soc. Lond. B* 276:2837–2846.
- Schultheiß, R., T. Wilke, A. Jørgensen, and C. Albrecht. 2011. The birth of an endemic species flock: demographic history of the *Bellamyia* group (Gastropoda, Viviparidae) in Lake Malawi. *Biol. J. Linn. Soc.* 102:130–143.
- Shirokaya, A. 2007. A new species of *Gerstfeldtiancyclus* Starobogatov, 1989 (Pulmonata: Basommatophora: Acroloxidae) from Lake Baikal. *Zootaxa* 1466:55–67.
- Takahata, N. 2007. Molecular clock: an anti-neo-Darwinian legacy. *Genetics* 176:1–6.
- Trajanovski, S., C. Albrecht, K. Schreiber, R. Schultheiß, T. Stadler, M. Benke, and T. Wilke. 2010. Testing the spatial and temporal framework of speciation in an ancient lake species flock: the leech genus *Dina* (Hirudinea: Erpobdellidae) in Lake Ohrid. *Biogeosciences* 7:3387–3402.
- Vainölä, R., J. D. S. Witt, M. Grabowski, J. H. Bradbury, K. Jazdzewski, and B. Sket. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda: Crustacea) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:241–255.
- Wilke, T., and G. M. Davis. 2000. Intraspecific mitochondrial sequence diversity in *Hydrobia ulvae* and *Hydrobia ventrosa* (Hydrobiidae: Rissooidea: Gastropoda): do their different life histories affect biogeographic patterns and gene flow? *Biol. J. Linn. Soc.* 70:89–105.
- Wilke, T., G. M. Davis, A. Falniowski, F. Giusti, M. Bodon, and M. Szarowska. 2001. Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships. *Proc. Acad. Nat. Sci. Phila.* 151:1–21.
- Wilke, T., G. M. Davis, D. Qiu, and R. C. Spear. 2006. Extreme mitochondrial sequence diversity in the intermediate schistosomiasis host *Oncomelania hupensis robertsoni*: another case of ancestral polymorphism? *Malacologia* 48:143–157.
- Wilke, T., C. Albrecht, V. V. Anistratenko, S. K. Sahin, and M. Z. Yildirim. 2007. Testing biogeographical hypotheses in space and time: faunal relationships of the putative ancient Lake Egirdir in Asia Minor. *J. Biogeogr.* 34:1807–1821.
- Wilke, T., R. Schultheiß, and C. Albrecht. 2009. As time goes by: a simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates. *Am. Malac. Bull.* 47:25–45.
- Wilke, T., R. Schultheiß, C. Albrecht, N. Bornmann, S. Trajanovski, and T. Kevrekidis. 2010. Native *Dreissena* freshwater mussels in the Balkans: in and out of ancient lakes. *Biogeosciences* 7:3031–3065.
- Wilson, A. B., M. Glaubrecht, and A. Meyer. 2004. Ancient lakes as evolutionary reservoirs. Evidence from the thalassoid gastropods of Lake Tanganyika. *Proc. R. Soc. Lond.* 271:529–536.
- Wirmann, D. 1992. Morphology and bathymetry. Pp. 16–22 in C. Dejoux and A. Ilties, eds. *Lake Titicaca—a synthesis of limnological knowledge*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Wirmann, D., J.-P. Ybert, and P. Mourguiart. 1991. A 20,000 years paleohydrological record from Lake Titicaca. Pp. 40–48

- in C. Dejours and A. Ilties, eds. *Lake Titicaca—a synthesis of limnological knowledge*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Wysocka, A., G. Kostoski, A. Kilikowska, B. Wróbel, and J. Sell. 2008. The *Proasellus* (Crustacea, Isopoda) species group, endemic to the Balkan Lake Ohrid: a case of ecological diversification? *Fundam. Appl. Limnol.* 172:301–313.
- Xia, X., and P. Lemey. 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. Pp. 615–630 in P. Lemey, M. Salemi, and A.-M. Vandamme, eds. *The Phylogenetic Handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny*. 2nd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge, United Kingdom.
- Xia, X., Z. Xie, M. Salemi, L. Chen, and Y. Wang. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26:1–7.
- Ybert, J.-P. 1992. Ancient lake environment as deduced from pollen analysis. Pp. 49–62 in C. Dejours and A. Ilties, eds. *Lake Titicaca—a synthesis of limnological knowledge*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.



Nueva especie de Planorbidae (Gastropoda: Basommatophora) en la Patagonia chilena: *Biomphalaria cristiani* sp. nov.

Lat. Am. J. Aquat. Res., 40(4): 929-935, 2012
DOI: 10.3856/vol40-issue4-fulltext-9

929

Research Article

Nueva especie de Planorbidae (Gastropoda: Basommatophora) en la Patagonia chilena: *Biomphalaria cristiani* sp. nov.

RESUMEN. En Chile la familia Planorbidae está representada por el género *Biomphalaria* Preston, 1910, compuesta por siete especies distribuidas desde Isluga hasta el río Puelo. De estas especies, solo *B. peregrina*, ampliamente distribuida en el neotrópico, y *Biomphalaria aymara* de Isluga, han sido reconocidas sobre la base de la morfología del sistema reproductor y la rádula, caracteres que fueron utilizados en el presente estudio para diferenciar a *Biomphalaria cristiani* como nueva especie del grupo y primer registro de la familia en la Patagonia chilena, ampliando su actual rango de distribución. Los caracteres que permiten la diagnosis de *B. cristiani* son el saco vaginal vestigial truncado, ausencia del desarrollo de los músculos suspensores del pene, vaina del pene corta en relación al prepucio, oviducto largo en relación al espermioducto y vaso deferente más delgado y largo que la vaina del pene, de tamaño similar al prepucio. La localidad tipo de *Biomphalaria cristiani* sp. nov. es Laguna Cisnes (47°7'10.02"S, 72°27'40.65"W), región de Aysén.

Palabras clave: *Biomphalaria cristiani*, nueva especie, Planorbidae, sistema reproductor, distribución, Laguna Cisnes, Chile.

First record of Planorbidae (Mollusca: Basommatophora) in Chilean Patagonia: *Biomphalaria cristiani* sp. nov.

ABSTRACT. The family Planorbidae in Chile is represented by the genus *Biomphalaria* Preston, 1910, consisting of seven species distributed from Isluga to Puelo River. Of these species, only *Biomphalaria peregrina* widely distributed in the neotropical and *Biomphalaria aymara* from Isluga are recognized based on the morphology of the reproductive system and radula, characters that were used in the following study to differentiate *Biomphalaria cristiani* as a new species of this group and first record of the family in Chilean Patagonia, extending its current distribution range. The characters for the diagnosis of *B. cristiani* are: truncated vestigial vaginal pouch, lack of development of the penis retractor muscles, penis sheath shorter than the prepuce, oviduct longer than the spermiduct and vas deferens thinner and longer than the penis sheath, similar size to the prepuce. The type locality of *B. cristiani* nov. sp. is Laguna Cisnes (47°7'10.02"S; 72°27'40.65"W), Aysén region.

Keywords: *Biomphalaria cristiani*, new species, Planorbidae, reproductive system, distribution, Laguna Cisnes, Chile.

INTRODUCCION

La distribución de moluscos de agua dulce en Chile ha sido considerada discontinua y relacionada a las características orográficas particulares del sistema

hidrográfico nacional (Fuentealba *et al.*, 2010), además de representar un alto grado de endemismo (Valdovinos, 2006). Los primeros estudios biogeográficos efectuados en la Patagonia chilena (Subregión Subantártica) también revelaron un alto grado de

Autor : CARMEN Autor(es): CARMEN FUENTEALBA¹ & RICARDO FIGUEROA²

endemismo en la mayoría de las familias de gasterópodos dulceacuicolas y una baja riqueza específica, lo que podría deberse a la limitada cantidad de estudios faunísticos realizados en el área (Fuentealba *et al.*, 2010).

Actualmente, la familia Planorbidae en Chile se encuentra representada por el género *Biomphalaria* Preston, 1910 y se han reconocido, tentativamente, un total de siete especies. De estas, cinco fueron descritas por Biese (1951): *Biomphalaria atacamensis* (Biese, 1951), *B. schmiererianus* (Biese, 1951), *B. costata* (Biese, 1951), *B. montana* (Biese, 1951) y *B. thermala* (Biese, 1951), mientras Antón (1839) describió a *B. chilensis* y Valdovinos & Stuardo (1991) a *B. aymara*. La mayoría de estas especies fueron sinonimizadas por Paraense (1966) con *B. peregrina* (D'Orbigny, 1835), un taxon ampliamente distribuido en la Región Neotropical.

De las especies señaladas, sólo *B. costata* con localidad tipo Salar San Martín (21°12'S, 68°15'W) y *B. thermala* con localidad tipo Ojos de Ascotán (21°41'S, 68°12'W), han sido descritas en la región Altoandina sobre los 3.600 m de altura (Biese, 1951) y no fueron sinonimizadas a *B. peregrina*. Por otro lado, respecto a la distribución, *B. atacamensis* fue descrita para el río Copiapó en la Región de Atacama (27°20'S, 70°52'W), mientras *B. schmiererianus* desde el río Choapa (31°38'S, 71°34'W) hasta el río Illapel (31°37'S, 71°09'W) y *B. montana* en el río Hurtado, Región de Coquimbo (30°35'S, 71°11'W). El resto de las poblaciones se distribuyen desde Valparaíso (33°37'S, 71°39'W) hasta la desembocadura del río Manso (41°44'S, 72°06'W) y pertenecerían a la especie *B. chilensis* (Antón, 1839). Respecto a latitudes australes, según Biese (1951) en su revisión de los moluscos, terrestres y de agua dulce de Chile, señaló que las investigaciones y prospecciones destinadas a la búsqueda de estos ejemplares realizadas en Aysén y Magallanes, fueron infructuosas.

La última especie descrita en Chile corresponde a *B. aymara*, colectada en los bofedales de Isluga (19°15'S, 68°40'W), altiplano chileno (Valdovinos & Stuardo, 1991). Sobre este taxon, se realizaron las primeras descripciones en detalle de la anatomía interna, incluyendo la rádula y la concha. Los estudios filogenéticos, son bastante recientes limitándose a algunas especies de la zona norte, sin embargo han permitido aportar valiosa información sobre eventos vicariantes y las relaciones específicas de *Biomphalaria* durante el Pleistoceno (Collado *et al.*, 2011).

Como se ha señalado, la mayoría de las descripciones de planorbidos se ha realizado para la zona norte de Chile, asociadas a ambientes salobres (Biese, 1951; Valdovinos & Stuardo, 1991). En un

listado reciente del rango de distribución del género *Biomphalaria* en el país, las especies fueron registradas desde Isluga (19°15'S, 68°40'W) hasta el río Puelo (41°39'S, 72°17'W), Región de Los Lagos (Valdovinos, 2006). El objetivo de este trabajo, de acuerdo al material malacológico colectado en Aysén, es describir una nueva especie de *Biomphalaria* en Chile, ampliando la distribución de la familia a la Patagonia chilena.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares fueron recolectados en Laguna Cisnes, Región Aysén (47°7'10.02"S, 72°27'40.65"W) (Fig. 1). Se recolectó un total de 40 ejemplares, de los cuales 25 conservaban sus partes blandas en su interior. De éstos, cinco fueron depositados en el Museo de Zoología de la Universidad de Concepción (MZUC). Los ejemplares restantes fueron tratados previamente con pastillas de mentol, para relajar la musculatura antes de la fijación en alcohol (70%). Posteriormente, se lavaron con detergente y agua tibia, luego se procedió a remover el periostraco con hipoclorito de sodio para observar la microestriación y la protoconcha. La rádula fue removida del saco bucal con una solución de hidróxido de potasio al 10% a temperatura ambiente por 24 h, observando cada media hora los tejidos en solución, para evitar cualquier daño en la dentición radular. Para la medición de las conchas y la disección de los animales se utilizó un estereomicroscopio provisto de un ocular graduado. El estudio de la concha y la rádula se realizó bajo microscopía electrónica de barrido mediante la técnica publicada por Solem (1970, 1972), usada por Valdovinos & Stuardo (1991) para la descripción de *B. aymara*. Previamente las muestras fueron tratadas con ultrasonido leve, utilizando un equipo Bransoordes nic 20, y luego se metalizaron con un sistema S 150 Sputer Coater. Para la observación y obtención de fotografías de la rádula se utilizó un microscopio electrónico de barrido Autoscan U-1 Siemen ETEC, en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción.

RESULTADOS

Sistemática

Familia Planorbidae H. & A. Adams, 1855

Género *Biomphalaria* Preston, 1910

Especie tipo: *Biomphalaria smithii* Preston, 1910.

Biomphalaria cristiani nueva especie

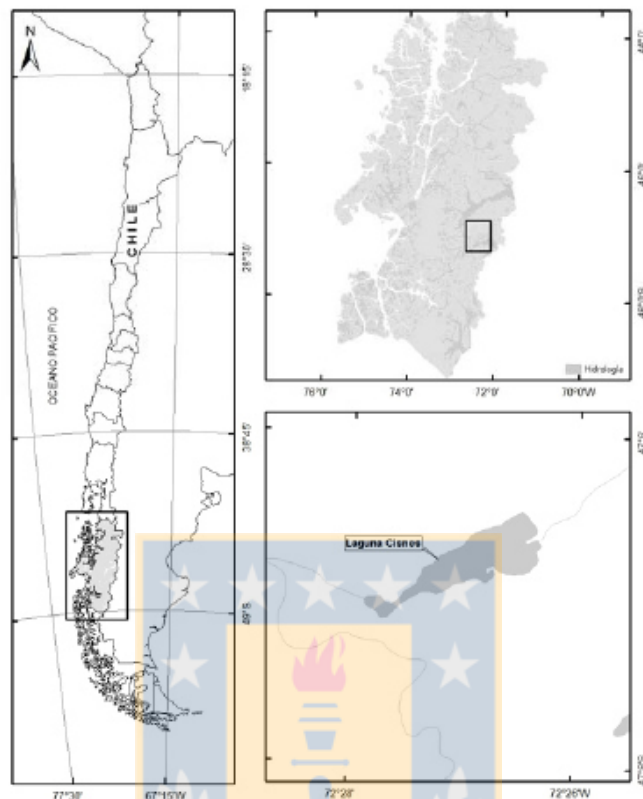


Figura 1. Sitio de colecta de *B. cristiani* spec. nov.

Figure 1. Sampling site of *B. cristiani* spec. nov.

Holotipo: MZUC 035386, ejemplar adulto de *Biomphalaria* colectado por el autor y Dr. Brian Reid en marzo 2008.

Localidad tipo: Laguna Cisnes situada en la región de Aysén ($47^{\circ}7'10.02''S$, $72^{\circ}27'40.65''W$).

Paratipos: un total de cinco individuos adultos completos.

Etimología: dedicado a Cristian Franco, quien aportó con sus valiosos comentarios durante el proceso de elaboración de este manuscrito.

Diagnosis

Concha: concha planiespiral, con 2 a 2,5 vueltas, levógira, color córneo a café claro translúcido. Abertura oval-redondeada casi no desviada del plano de la espira y sutilmente más ancha que alta, bordes de la abertura cortante. Cada vuelta se va ensanchando a partir de la primera vuelta desde el ápice, espira no proyectada, básicamente plana. Último anfracto ensanchado hacia la abertura. La ornamentación de la

superficie se encuentra representada por estrias de crecimiento finas, notorias, irregulares y densas, no se observan líneas longitudinales. Detalle de la sutura profunda (Figs. 2a, 2b y 2c). Las medidas promedio se indican en la Tabla 1.

Rádula: diente raquídeo o central bicúspide más pequeño que los dientes laterales, margen liso; no es posible distinguir mesocono. Ambas cúspides elongadas, puntiagudas y simétricas de base ancha. Dientes laterales tricúspides, mesocono espatulado, margen redondeado, superficie irregular y notablemente más ancho que el ectocono y endocono. El ectocono es $1/3$ más largo que el endocono, el ángulo entre éste y el mesocono es menor que el ángulo del endocono y el mesocono, por tal razón se observa levemente dirigido hacia afuera (Fig. 2d). Fórmula radular $21+R+21$.

Anatomía interna: ovotestis con numerosos divertículos medianos en doble fila. Canal colector corto, simple, delgado y levemente plegado. Vesícula semi-

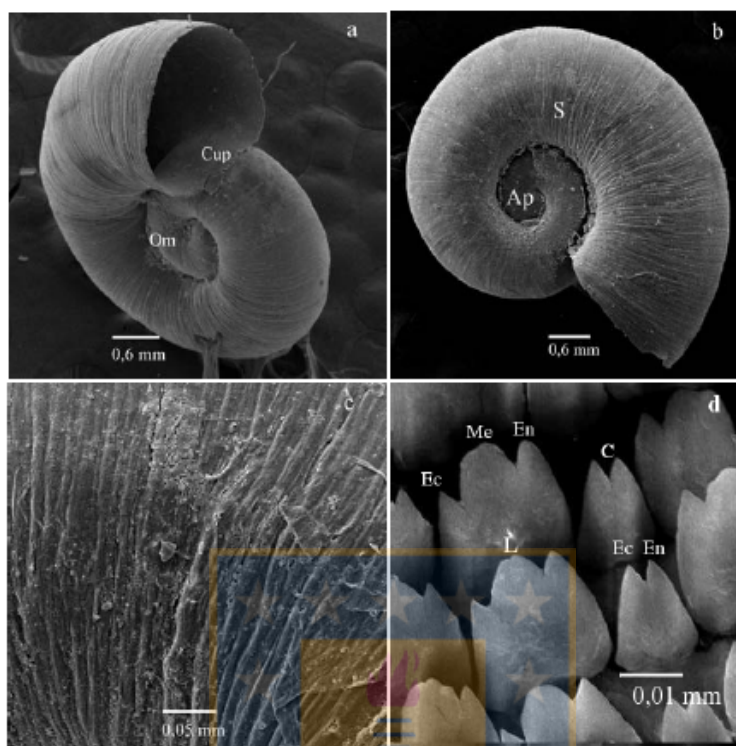


Figura 2. Detalle de la concha y rádula de *B. cristiani* spec. nov. a) Vista apertural, Om: ombligo, Cup: callo parietal, b) vista apical, AP: ápice, S: detalle de la sutura, c) detalle de la superficie de la conchilla destacando estrias de crecimiento, d) detalles del diente raquídeo o central (C) y diente lateral (L), Me: mesocono, En: endocono, Ec: ectocono.

Figure 2. Detail of the shell and radule from *B. cristiani* spec. nov. a) Apertural view, Om: umbilicus, Cup: parietal callus, b) apical view, S: detail of the suture, AP: apex, c) detail of the surface shell showing growth striae, d) detail of the rachidian or central (C) and lateral teeth (L), Me: mesocone, En: endocone, Ec: ectocone.

Tabla 1. Medidas de la concha (mm) de la serie tipo *Biomphalaria cristiani* sp. nov. AiA: altura máxima de la abertura, AIC: altura máxima de la concha, AnA: ancho máximo de la abertura, Dmax: diámetro máximo de la concha, Dmin: diámetro mínimo de la concha, MZUC: Museo Zoológico de la Universidad de Concepción.

Table 1. Shell measurements (mm), from the serie type *Biomphalaria cristiani* sp. nov. AiA: opening maximum height; AIC: shell maximum height, AnA: opening maximum width, Dmax; shell maximum diameter, Dmin: shell minimum diameter, MZUC: Museo de Zoología de la Universidad de Concepción.

Nº MZUC	Dmax	Dmin	AIC	AnA	AiA
Holotipo					
035386	4.45	3.43	2.25	3.90	3.26
Paratipo					
035387	5.67	4.56	3.45	4.02	3.46
035388	6.72	6.02	4.09	3.29	4.28
035389	3.42	3.01	2.49	3.59	3.00
035390	5.66	5.04	3.08	3.80	4.01
Promedio	5.18	4.41	3.07	3.72	3.60
Desviación estándar	1.27	1.21	0.74	0.28	0.53

nal de mayor longitud que el canal conductor, no se distinguen divertículos digitiformes sino más bien levemente esbozados casi como pequeñas prominencias, distribuidos regularmente. Glándula nidamentaria muy desarrollada con forma de cinta plegada, vagina con un leve esbozo de una bolsa vaginal casi vestigial. Esta suele ser confundida con una bolsa en otras especies, sin embargo, en esta especie es una proyección de la pared vaginal. Útero delgado, alargado y sin contorneación en sus márgenes. Ducto espermático alargado, liso y delgado. Próstata bien desarrollada con divertículos pequeños, abundantes y delgados, no se distinguen ramificaciones de estos. Pene alargado y ancho en la base. Vaso deferente delgado y largo en comparación a la bolsa del pene cuyo tamaño es similar al prepucio. Músculos suspensores escasamente distinguibles. Espermateca con cuerpo ovoide, redondeada o piriforme más largo que el conducto espermático, apenas distinguible (Fig. 3). Comparación con otras especies: al realizar la comparación morfológica de *B. cristiani* sp. nov., con las dos especies *B. peregrina* y *B. aymara*, sobre las cuales existe información disponible en Chile de la anatomía interna (Tabla 2), es posible establecer diferencias mediante la diagnosis del saco vaginal vestigial, que a diferencia de las dos especies nombradas es truncado, falta de desarrollo de los músculos suspensores del pene, la vaina del pene más corta en relación al prepucio, oviducto largo en relación al espermiducto y vaso deferente delgado y largo en comparación a la vaina del pene, siendo similar en tamaño al prepucio. Respecto a la rádula, dada las características observadas del mesocono, no permiten por sí solo diferenciarla de *B. peregrina*, aunque en *B. cristiani* la superficie del mesocono es irregular.

DISCUSIÓN

La estructura utilizada inicialmente para la caracterización de la mayoría de los géneros y especies de *Biomphalaria*, incluyendo sus relaciones filogenéticas, fue la concha (Hubendick, 1948, 1955). Esto llevó al reconocimiento preliminar de un mayor número de especies en Chile (Paraense, 1966). No obstante, estudios posteriores reconocieron que tales caracteres son fuertemente influenciados por las condiciones locales del ambiente (Rummi, 1991), llevando al uso de la morfología del sistema reproductor y complementariamente la estructura radular (Valdovinos & Stuardo, 1991), como caracteres confiables. Estos caracteres han permitido, a la fecha, reconocer a lo menos dos especies en la zona norte: *B. aymara* y *B. peregrina*. Según los autores, existen diferencias

reconocibles en las estructuras del sistema reproductor como: la ramificación de los divertículos de la ovotestis y prostáticos, presencia del saco vaginal, superficie de la espermateca y el tamaño del ducto espermático.

Respecto a la especie *B. costata*, estudiada por (Paraense, 1966), no ha sido sinonimizada por presentar diferencias con *B. peregrina*. Sin embargo, su descripción de los órganos reproductores es limitada, y la información disponible para establecer una comparación con *B. cristiani*, es parcial. Algunos de los caracteres disponibles del trabajo de Biese (1951) para *B. costata* son: divertículos de la ovotestis escasos, no ramificados, bifurcados o trifurcados, divertículos prostáticos escasos, no ramificados, presencia de saco vaginal, vaina del pene más corta que el prepucio, oviducto y espermiducto retorcido. Respecto a la rádula, el autor no hace mención de esta estructura en su publicación. En relación a *B. thermala*

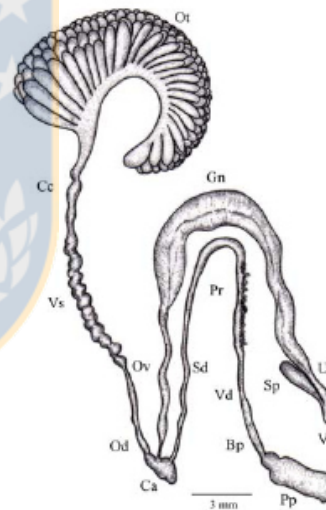


Figura 3. Detalles del sistema reproductivo de *B. cristiani* spec. nov. Ot: ovotestis, Cc: canal colector, Vc: vesícula seminal, Od: ovispermiducto, Ca: carrefour (órgano de divergencia), Ov: oviducto, Sd: espermiducto, Gn: glándula nidamentaria, Pr: próstata, Vd: vaso deferente, Bp: bolsa del pene, Pp: prepucio, Sp: espermateca, Ut: útero, Va: vagina.

Figure 3. Detail reproductive system of *B. cristiani* spec. nov. Ot: ovotestis, Cc: collector duct, Vc: seminal vesicle, Od: ovispermiduct, Ca: carrefour, Ov: oviduct, Sd: spermiduct, Gn: nidamental gland, Pr: prostate, Vd: vas deferens, Bp: Bursa penis, Pp: prepuce, Sp: spermatheca, Ut: uterus, Va: vagina.

Tabla 2. Comparación del sistema reproductor y la rádula de las tres especies de *Biomphalaria*.**Table 2.** Comparison of reproductive system and radule from three species of *Biomphalaria*.

Carácter diagnóstico	<i>B. peregrina</i>	<i>B. aymara</i>	<i>B. cristiani</i> sp. nov.
Divertículos prostáticos	numerosos	escasos	numerosos
Divertículos de la ovotestis	numerosos y algunos ramificados	numerosos no ramificados	numerosos no ramificados
Ducto espermático	corto	alargado	corto
Superficie de la espermateca	lisa	irregular	lisa
Saco vaginal	presente	ausente	vestigial, truncado
Mesocono dientes laterales	truncado no ondeado	truncado ondeado	truncado no ondeado, convexo
Mesocono diente central	no distinguible diente central bicúspide	escasamente desarrollado tricúspide	no distinguible diente central bicúspide
Desarrollo de los músculos suspensores del pene	muy desarrollados	muy desarrollados	no desarrollados
Vaina del pene	largo similar al prepucio	largo similar al prepucio	corto en relación al prepucio
Oviducto	corto en relación al espermi ducto	corto en relación al espermi ducto	largo en relación espermi ducto
Vaso deferente	ancho distalmente más angosto que la vaina del pene	más angosto que la vaina del pene	delgado y largo en comparación a la vaina del pene cuyo tamaño es similar al prepucio

no existe información disponible sobre el sistema reproductor, solo se ha considerado como especie distinta a *B. peregrina* por presentar la superficie lisa de la concha y ser más pequeña que *B. costata*. Sin embargo, para su validez taxonómica, se ha recomendado el estudio del sistema reproductor y la rádula (Valdovinos & Stuardo, 1991).

En este sentido, se ha sugerido que los órganos copuladores masculinos en los planórbidos son considerados los más relevantes en estudios taxonómicos y filogenéticos. En general, el aparato copulador masculino presenta variaciones que determinan tipos morfológicos a nivel específico (Rummi, 1991). Este autor, también afirma que para la discriminación específica de estructuras como la ovotestis, vesícula seminal y otras glándulas anexas, sólo deben utilizarse como caracteres complementarios dado que pueden variar en morfología de acuerdo a su etapa reproductiva. Para la discriminación específica, el autor recomienda considerar el conducto deferente, oviducto, vagina, pene, cuerpo y conducto de la espermateca; destacando que la próstata es aconsejable para discriminar, preferentemente a nivel de género y familia, muy ocasionalmente entre especies. En relación con la morfología radular, recomienda utilizarla para la diferenciación de géneros o grupos de mayor rango taxonómico. Sin

embargo, los caracteres radulares de las especies estudiadas en esta latitud, no parecen ser conservativos para grupos taxonómicos de mayor rango.

En Chile, las estructuras radulares se utilizan de forma complementaria en la descripción y comparación de las especies. *B. peregrina* y *B. aymara*, diferenciadas por el mesocono de los dientes laterales. A pesar que en ambas es básicamente truncado, en la primera, el mesocono es del tipo ondeado, mientras que la segunda presenta un mesocono liso (Valdovinos & Stuardo, 1991). Al comparar las especies *B. aymara* y *B. cristiani*, la primera presenta un mesocono que la diferencia claramente de la segunda. *B. cristiani* tiene mesocono del diente lateral convexo irregular, que la diferencia tanto de *aymara* como de *peregrina*. Las estructuras del sistema reproductor consideradas relevantes y que permiten el reconocimiento de *B. cristiani* como una nueva especie son: saco vaginal vestigial truncado, ausencia del desarrollo de los músculos suspensores del pene, vaina del pene corta en relación al prepucio, oviducto largo en relación al espermi ducto y vaso deferente delgado y largo en comparación a la vaina del pene, cuyo tamaño es similar al prepucio.

Siguiendo estas recomendaciones y basados en la comparación morfológica de las dos especies hasta

ahora reconocidas para Chile, se propone a *Biomphalaria cristiani* como nueva especie, sobre la base de las características del aparato reproductor, las cuales permiten diferenciar de manera confiable a esta nueva especie de *B. peregrina* y *B. aymara*.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción, quienes procesaron las muestras para su observación y al Dr. Brian Reid por su ayuda en la recolección del material biológico. Se agradece especialmente a la Dra. Stella Maris Martín de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo Universidad Nacional de la Plata, por sus valiosas sugerencias en la estructura radular y anatomía blanda de los ejemplares. Se reconoce también al Sr. Pedro Arias, por su ayuda en la confección de diagramas. Este estudio fue financiado por el proyecto DIUC N° 210.310.0581-SP de la Universidad de Concepción.

REFERENCIAS

- Antón, H.E. 1839. Verzeichniss der Conchylien, welche sich in der Sammlung von Hermann Eduard Anton befinden, Halle, 110 pp.
- Biese, W.A. 1951. Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte VII, Familia Planorbidae. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat., 25: 121-230.
- Collado, G., I. Vila. & M. Méndez. 2011. Monophyly, candidate species and vicariance in *Biomphalaria* snails (Mollusca: Planorbidae) from the Southern Andean Altiplano. Zool. Scripta, 40: 613-622.
- Fuentealba, C., R. Figueroa & J.J. Morrone. 2010. Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. Rev. Chil. Hist. Nat., 83: 289-298.
- Hubendick, B. 1948. Studies on *Bulinus*. Ark. Zool., 40(16): 1-63.
- Hubendick, B. 1955. Phylogeny in the Planorbidae. Trans. Zool. Soc. London, 28(6): 453-542.
- Paraense, W.L. 1966. The synonymy and distribution of *Biomphalaria peregrina* in the Neotropical region. Rev. Bras. Biol., 26: 269-296.
- Rummi, A. 1991. La familia *Planorbidae* Rafinesque, 1815 en la Republica Argentina. Fauna de agua dulce de la Republica Argentina, 15: 5-51.
- Solem, A. 1970. Malacological applications of scanning electron microscopy. I. Introduction and shell surface features. Veliger, 12(4): 394-400.
- Solem, A. 1972. Malacological applications of scanning electron microscopy. II. Radular structure and functioning. Veliger, 14(4): 327-336.
- Valdovinos, C. & J. Stuardo. 1991. Planorbidos altoandinos del norte de Chile y *Biomphalaria aymara* spec. nov. (Mollusca Basommatophora). Stud. Neo. Fau. Environ., 26(4): 213-224.
- Valdovinos, C. 2006. Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. Gayana, 70: 88-95.

Received: 2 January 2012; Accepted: 10 October 2012

C- Variación genética poblacional local

Variabilidad genética local del bivalvo dulceacuícola *Diplodon chilensis* (Gray 1828) proveniente de tres lagos Nahuelbutanos.

Gayana 74(2): 113 - 124, 2010

Variabilidad genética local del bivalvo dulceacuícola *Diplodon chilensis* (Gray 1828) proveniente de tres lagos Nahuelbutanos

Local genetic variability of the freshwater bivalve *Diplodon chilensis* (Gray 1828) from three Nahuelbuta lakes.

ABSTRACT

Genetic variability of a freshwater bivalve *Diplodon chilensis* from three Nahuelbuta lakes was described. Each lake shows geographic barriers and environmental characteristics as a consequence of geomorphologic and antropic events. Our results shows that only Lleu-Lleu lake was in Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). All populations show gametic disequilibrium ($P < 0.001$), as an evidence of the species' life cycle. There are heterozygote deficiencies (*Fis*) in Laguna La Posada and Laguna Chica de San Pedro. Global *Fst* (0.027) and AMOVA test values for pooling subpopulation show non structured population, as an evidence of recent migration process.

KEYWORDS: *Diplodon chilensis*, linkage disequilibrium, heterozygote deficit, Hardy-Weinberg equilibrium, lenthic systems.

RESUMEN

Se describe la variabilidad genética del bivalvo dulceacuícola *Diplodon chilensis* proveniente de tres lagos Nahuelbutanos, cada uno de los cuales presenta barreras geográficas y diferencias ambientales reconocibles como consecuencia de diversos eventos geomorfológicos y antrópicos. Nuestros resultados revelaron que sólo Lago Lleu-Lleu se encuentra de equilibrio Hardy-Weinberg ($P < 0.05$). El desequilibrio gamético se manifestó en las tres poblaciones $p < 0.001$ lo que podría explicarse por la complejidad de su ciclo reproductivo. La Posada y Laguna Chica de San Pedro presentan déficit de heterocigotos (*Fis*). Los valores de *Fst* global (0.027) y AMOVA para la población total indican que estas poblaciones no están estructuradas lo que sugiere procesos de migración recientes a través de los cursos de agua.

PALABRAS CLAVE: *Diplodon chilensis*, desequilibrio gamético, déficit de heterocigotos, equilibrio Hardy-Weinberg, sistemas lénticos.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha surgido un notable interés a nivel mundial por el estudio de las poblaciones de bivalvos dulceacuícolas (Nagel *et al.* 1996; Berg *et al.* 1998, 2007; Hoeh *et al.* 1998; Brim Box & Mossa 1999; Parada & Peredo 2002; Baker *et al.* 2004). Diversos autores han reconocido su potencial rol trófico en el ecosistema (Bauer, 2001; Strayer *et al.* 2004), regulando los niveles de turbidez de la columna de agua, (Leff *et al.* 1990; Vallejos 1996; Soto & Mena 1999; Strayer 1999; Vaughn & Hakenkamp 2001). Además, por

su eficiente capacidad de filtración (Valdovinos & Cuevas 1996; Kreeger *et al.* 2004; Fuentealba & Henríquez 2008), los bivalvos dulceacuícolas son considerados una importante herramienta de mejoramiento y control en la calidad de agua (Lara *et al.* 2002; Kreeger *et al.* 2004).

En Chile, se han registrado extinciones locales en algunas poblaciones de bivalvos dulceacuícolas (Parada & Peredo 2005; Valdovinos & Pedreros 2007) así como en otras latitudes (Ricciardi & Rasmussen 1999; Anthony *et al.* 2001), que podrían tener relación con el grado de perturbación

Autor(es): CARMEN FUENTEALBA; FIDELINA GONZALES, RICARDO FIGUEROA & MARIO PALMA

del hábitat (Williams *et al.* 1992; Layzer *et al.* 1993; Brim Box & Mossa 1999; Peredo *et al.* 2003). Diversos autores han destacado la estrecha relación existente entre el estado trófico de un lago, las condiciones geomorfológicas y usos de la cuenca de drenaje (Ryding & Rast 1992; Parra *et al.* 2003; Valdovinos & Pedreros 2007). La materia y energía procedente de estas cuencas influye directa e indirectamente en las poblaciones de bivalvos y su hábitat (Chutter, 1969; Valdovinos & Figueroa 2000). La interacción de estos factores con fenómenos estocásticos o determinísticos es crucial en el establecimiento de la variabilidad genética. Eventualmente, el nivel de perturbación de hábitat puede generar pérdida de la diversidad genética derivando en una reducción drástica del tamaño poblacional inclusive, ocasionar la disminución en la frecuencia alélica en la población (White *et al.* 1999; Ferreira de Souza *et al.* 2009).

En los últimos años, en Chile, diversos estudios del tipo ecológico y sistemático se han centrado en la familia Hyriidae y la especie *Diplodon chilensis* (Gray 1828), sin embargo, actualmente no existen estudios genéticos poblacionales al respecto (Bonetto *et al.* 1986; Parada *et al.* 1987; Lara *et al.* 1988; Soto & Mena 1999; Jara *et al.* 2000; Lara *et al.* 2002; Parada & Peredo 2005). A nivel taxonómico, se han descrito para género *Diplodon* dos especies, *Diplodon chilensis* y *Diplodon solidulus* Philippi 1869. Para la especie *D. chilensis* existirían dos subespecies *D. chilensis chilensis* y *D. chilensis patagonicus* (d'Orbigny 1846). La primera se distribuye desde Valparaíso hasta la Isla de Chiloé y la segunda desde la región más austral de Chile y la Patagonia argentina, con un límite meridional argentino en el lago Futalauquén existiendo registros ambiguos del holotipo para la subespecie *D. chilensis patagonicus* (Letelier 2006) lo cual ha puesto en duda su presencia en territorio chileno (Parada & Peredo 2008).

La historia evolutiva de los bivalvos dulceacuícolas en Chile, al igual que otros invertebrados dulceacuícolas, en los últimos diez mil años ha sido de colonización, aislamiento y adaptación. Los cambios climáticos durante la formación de los ecosistemas dulceacuícolas, sumado a procesos del tipo morfogenéticos (glaciación, vulcanismo o actividad tectónica) conllevaron a la formación de nuevos hábitats cada uno con características particulares (Parada *et al.* 1989; Parada & Peredo 1994; Clapperton 1993; Turner *et al.* 2005; Ruzzante *et al.* 2008). Estos factores habrían determinado la colonización de la especie en una gran variedad de hábitats como ríos y lagos modificando sus patrones de distribución y fenotípicos (Parada & Peredo 1994; Parada & Peredo 2002). Desde el punto de vista genético, las poblaciones líticas a diferencia de las lénticas, mantendrían un mayor nivel de flujo génico como consecuencia del grado de conectividad hídrica. Sin embargo, poblaciones lénticas y líticas en respuesta a las presiones de selección de cada ambiente en

particular, presentan importantes diferencias fenotípicas (plasticidad fenotípica), posibilitando que los adultos se adapten exitosamente a amplios rangos del ambiente (Parada & Peredo 1994). Para ambos ecosistemas las presiones de selección corresponderían fundamentalmente a la modificación de parámetros fisicoquímicos tales como vientos regionales, temperatura, pH, oxígeno disuelto y corrientes (Parada & Peredo 1994). Sin embargo, existe evidencia de tolerancia de las poblaciones *D. chilensis* a distintos rangos de temperatura, como ha sido demostrado en el tiempo geológico, periodos en los cuales las poblaciones no fueron afectadas por los extremos de temperatura producidos en el Pleistoceno y Holoceno (Jackson & Jackson 2008).

En el hábitat natural, la distribución de los individuos en la población tiende a ser en bajas densidades. Se alimentan de fitoplancton y bacterias en hábitats con elevada productividad (Vallejos 1996). No obstante, las poblaciones sólo pueden vivir en condiciones mesotróficas a oligotróficas. La modificación de parámetros como la tasa de sedimentación y remoción del fondo, han demostrado ser factores claves en la declinación paulatina de las poblaciones de bivalvos (Bauer 1988; Williams *et al.* 1992; Layzer *et al.* 1993; Parada & Peredo 1994; Wood & Armitage 1997; Brim Box & Mossa 1999; Dodds & Whiles 2004). Estudios demuestran que *Diplodon chilensis* es susceptible a los procesos de eutroficación disminuyendo notablemente su rango de distribución. Cambios en los niveles de trofia y en los parámetros geográficos de los ecosistemas afectan notablemente la tasa de crecimiento, incluso actualmente, es considerada una especie en peligro (Valdovinos & Pedreros 2007). Probablemente de igual modo son afectados los niveles de variabilidad genética y estructura poblacional por lo que es prioritario conocer la diversidad genética poblacional hasta ahora desconocida.

El propósito del presente trabajo es determinar la variabilidad genética en poblaciones de *Diplodon chilensis* mediante análisis del polimorfismo de isoenzimas. Las poblaciones en estudio fueron recolectadas de tres sistemas lénticos cada uno de los cuales presenta barreras geográficas, sin conexión física entre lagos, y diferencias ambientales reconocibles como consecuencia de diversos eventos geomorfológicos y antrópicos, por lo que se postula la hipótesis de diferenciación en los niveles de variabilidad genética y una marcada estructuración poblacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras fueron colectadas desde 3 sistemas lénticos, lago Lleu-Lleu, laguna La Posada y Laguna Chica de San Pedro, denominados lagos Nahuelbutanos,

ELECTROFORÉISIS DE ISOENZIMAS

Se analizaron 7 sistemas enzimáticos, mediante las técnicas de Harris & Hopkinson (1976) Pasteur *et al.* (1988) y Richardson *et al.* (1986). Los tampones utilizados según la metodología propuesta por Harris & Hopkinson (1976) y Selander *et al.* (1971) encuentran resumidos en la Tabla 2. La homogeneización de forma manual se llevó a cabo mediante el uso de un mortero convencional y en el mismo tubo Eppendorff usando una bagueta, con 50-80 mg de ambos tejidos. Se utilizó buffer Tris-EDTA en la maceración en tejidos branquiales, mediante un sistema de trituración manual, las muestras posteriormente fueron centrifugadas. En el caso de los músculos abductores la maceración se hizo con 3 a 5 gotas de agua destilada cuando era preciso hidratar. Los tejidos branquiales fueron centrifugados a 3.000 rpm por 5 min. Los músculos abductores fueron centrifugados a 10.000 rpm por 3 min obteniéndose de esta forma la separación de fases.

La siembra se llevo a cabo en un gel almidón al 12.5%, utilizando papel Whatman N°3 0.5 x 0.8 mm. Para la corrida electroforética se utilizó una fuente de poder modelo Heath Modelo 2717. La corrida o empuje inicial de las proteínas fue de 25 a 36 mA. Al cabo de una hora se retiraron los papeles de siembra y se aumentó el voltaje manteniendo una temperatura de 5°C. El tiempo de corrida estimado fue

aproximadamente de 6 h expuestos a corriente continua. El voltaje se mantuvo constante en un rango de 36 a 50 mA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos y la obtención de los índices de variabilidad genética, estructuración poblacional, test de equilibrio Hardy- Weinberg utilizamos el programa Poggene (Yeh *et al.* 1997) versión 1.31 y Tools for Population Genetics Analysis (TFPGA) en su versión 1.3 (Miller 1997). Para cada población se obtuvo los estadísticos descriptivos como número de alelos por locus (nivel 95%), heterozigosidad observada (*Ho*), heterozigosidad esperada (*He*), frecuencias alélicas y genotípicas.

Los valores de *Fst* al comparar pares de poblaciones fueron estimados de acuerdo a Cockerham & Weir (1993) usando Arlequin 2.0 (Schneider *et al.* 2000). La significancia fue obtenida usando 1000 permutaciones. Un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) fue utilizado para descomponer la varianza genética entre las 3 poblaciones y verificar cómo se distribuye la varianza dentro y entre poblaciones. Los cálculos de AMOVA fueron realizados usando Arlequin 2.0 y el significado de la varianza entre las poblaciones fue testeado usando 10000 permutaciones.

TABLA 2: Tipo de enzimas, tampón, tejidos y autores incluidos en el estudio. (S* Selander *et al.* 1971). (**) B: Branquia.

TABLE 2. Isozyme systems, buffer, issues and authors included in this study. (S* Selander *et al.* 1971). (**) B: Gill.

ENZIMAS	TAMPÓN	pH	AUTOR (*)	Tejido (**)
MALATO DESHIDROGENASA (MDH) 1.1.1.37	TRIS CITRATO	6.3-6.7	S	B
ESTERASA (EST) 3.1.1.1	TRIS CITRATO	6.3-6.7	S	B
ISOCITRATO DESHIDROGENASA (IDH) 1.1.1.2	TRIS CITRATO	6.3-6.7	S	B
FOSFOGLUCOMUTASA (PGM) 2.7.5.1	TRIS CITRATO	6.3-6.7	S	B
GLUCOSA FOSFATO ISOMERASA (PGI) 5.3.1.9	TRIS CITRATO	6.3-6.7	S	B
GLUTAMATO OXALATO TRANSAMINASA (GOT) 2.6.1.1	TRIS CITRATO	6.3-6.7	S	B
LEUCIN AMINOPEPTIDASA (LAP) 3.4.11.1	TRIS CITRATO	6.3-6.7	S	B

los cuales se encuentran emplazados en la fachada occidental de la cordillera de Nahuelbuta (VIII región Chile). Adicionalmente se incluyó el Lago Lanalhue no encontrándose registros actuales (Fig. 1). Los parámetros fisicoquímicos son mostrados en la Tabla 1.

Se tomaron muestras estacionales de 60 individuos de la especie *Diplodon chilensis*, las que fueron posteriormente transportadas en cautiverio y preservadas a 80°C (Mod: Scien-Temp Adrián Michigan U.S.A). Los organismos fueron descongelados a temperatura ambiente y

posteriormente utilizados de forma gradual en cada análisis evitando de este modo cualquier alteración post-mortem de los complejos enzimáticos. Durante la estandarización previa se utilizaron tejidos tales como: músculo abdutor, pie y branquias, los que fueron extraídos posteriormente de los organismos descongelados. Sobre la base de los resultados obtenidos en la etapa de estandarización previa y de los tejidos se hizo una selección de las branquias, resultando con buena resolución en el sistema, evitando de este modo cualquier error en la interpretación de los resultados.

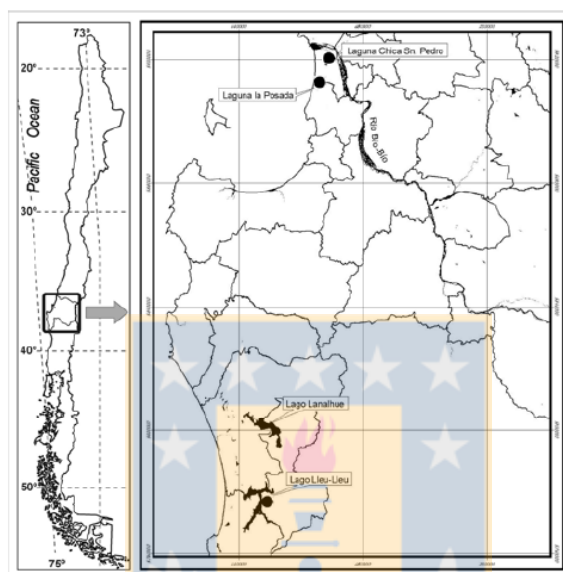


FIGURA 1. Mapa de los sitios de colecta de *Diplodon chilensis*.

FIGURE 1. Collecting sites map of *Diplodon chilensis*.

TABLA 1. Parámetros Fisicoquímicos de los tres lagos nahuelbutanos (Parra *et al.* 2003; Valdovinos & Pedreros 2007).

TABLE 1. Physical and chemical parameters from three nahuelbuta lakes (Parra *et al.* 2003; Valdovinos & Pedreros 2007).

Parámetros Fisicoquímicos	Laguna Chica	Laguna La Posada	Lago Lleu-Lleu	Lago Lanalhue
Temperatura (°C)	17.5	16	15.5	16.8
pH	6.9	7.0	7.5	6.8
Sechi (m)	5.2	2.8	8.0	3.0
Total-P(mg L ⁻¹)	4.9	5.2	3.4	13.4
PO4-P (mg L ⁻¹)	3.1	2.1	2.0	8.0
DIN (mg L ⁻¹)	250.0	163.0	225.0	166.0
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	9.2	9.2	9.8	9.1
Area (km ²)	0.82	0.10	39.80	31.90
Profundidad media	10.3	3.7	23.5	13.1
Latitud	36° 51'	36° 56'	38°09'	37°55'
Longitud	73° 05'	73°10'	73°19'	73°19'
Altitud (m)	5	7	20	12

RESULTADOS

Del total de loci analizados ocho fueron polimórficos EST-1, EST-2 y EST-3, AAT-1, AAT-2, PGM-1, PGI-1 Lap-1 y dos monomórficos AAT-3 y LAP-2. Las tres poblaciones presentaron valores similares de polimorfismo equivalentes a un 80%.

Todos los loci polimórficos en cada población presentaron igual número de alelos ($n=2$), no se encontraron alelos privados o exclusivos por localidad. Con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg por locus, este se manifiesta en distintos niveles, con diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), siendo mayor en la Laguna Chica de San Pedro (Pop-1) con un (88%), Laguna la Posada (Pop-3) un (25%), en tanto que en la Lago Lleu-Lleu (Pop-2) no se evidenciaron loci en desequilibrio. Los valores *Fis* globales revelan que Pop-1 ($f=0.479$; $P=0.000$) y la Pop-3 ($f=0.1500$; $P=0.000$) presentan deficiencia de heterocigotos significativa a diferencia de la Pop-3 ($f=0.060$; $P=0.8386$) (Tabla 3).

El estadístico *Fst* global, calculado desde las frecuencias de alelos por loci, es un poco menor (0,0274; $P = 0.017$) al obtenido de las frecuencias de los fenotipos multilocus (0.064, $P < 0.001$) de acuerdo a estos valores las tres poblaciones son significativamente diferentes ($0.044 < Fst < 0.095$, $P < 0.001$) con bajo a moderado nivel de estructuración poblacional existiendo un bajo porcentaje de la varianza genética dentro de las poblaciones, como consecuencia de la diferencia entre ellas. El análisis de varianza, AMOVA, complementa los resultados obtenidos del análisis de *Fst* entre pares de poblaciones corroborando que mayoritariamente la varianza se encuentra distribuida dentro de las poblaciones (97,1 %) mientras que sólo el (2,9 %) de la varianza se encuentra entre las poblaciones (Tabla 4).

El análisis de desequilibrio gamético de genotipos multilocus, con corrección de Bonferroni, es significativo $P < 0.001$ para todos los loci indicando que no existe asociación aleatoria de los genotipos para cada par de loci analizados (Tablas 4 y 5).

TABLA 3. Valores de frecuencias alélicas, equilibrio Hardy-Weinberg, heterozigosidad observada (*Ho*), heterozigosidad esperada (*He*), probabilidad de equilibrio de Hardy-Weinberg en la población (*P(HW)*) y deficiencia de heterocigotos (*Fis*) en tres sistemas lacustres Nahuelbutanos.

TABLE 3. Values of allele frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium, observed heterozygosity (*Ho*), expected heterozygosity (*He*), probability of population Hardy-Weinberg equilibrium *P(HW)* and heterozygous deficit (*Fis*) found in three Nahuelbuta lake systems.

Sistemas lacustres Nahuelbutanos					
Isoenzimas	Locus	L. Chica de San Pedro	Lago Lleu-Lleu	L. La Posada	
Esterasa 1	1	0.600	0.583	0.5167	
	2	0.400	0.4167	0.4833	
	H esp	0.4800	0.4861	0.4994	
	H. obs	0.3667	0.5333	0.3667	
	Fis	0.244	-0.089	0.274	
	<i>P(HW)</i>	0.05803	0.49162	0.033630	
Esterasa 2	1	0.6750	0.6083	0.5417	
	2	0.3250	0.3917	0.4583	
	H esp	0.4387	0.4765	0.4965	
	H. obs	0.1833	0.4833	0.1167	
	Fis	0.588	-0.006	0.768	
	<i>P(HW)</i>	0.0000	0.963651	0.0000	
EST-3	1	0.600	0.5417	0.4833	
	2	0.400	0.4583	0.5167	
	H esp	0.4800	0.4965	0.4994	
	H. obs	0.2667	0.4833	0.4667	
	Fis	0.451	0.035	0.074	
	<i>P(HW)</i>	0.000447	0.786413	0.566320	
AAT-1	1	0.5833	0.4750	0.4583	

Sistemas lacustres Nahuelbutanos					
Isoenzimas	Locus	L. Chica de San Pedro	Lago Lleu-Lleu	L. La Posada	
LAP	2	0.4167	0.5250	0.5417	
	H esp	0.4861	0.4988	0.4965	
	H. obs	0.2333	0.4833	0.4833	
	Fis	0.526	0.039	0.035	
	P(HW)	0.000042	0.760710	0.786413	
	Fis	0.320	0.194	0.041	
	P(HW)	0.012178	0.132931	0.748041	
	1	0.7667	0.5417	0.5833	
	2	0.2333	0.4583	0.4167	
	H esp	0.3578	0.4965	0.4861	
PGM	H. obs	0.2000	0.4833	0.4667	
	Fis	0.448	0.035	0.048	
	P(HW)	0.000457	0.786413	0.707566	
	1	0.7667	0.5417	0.4833	
	2	0.2333	0.4583	0.5167	
	H. n.b	0.3608	0.5007	0.5036	
	H. obs	0.1333	0.4500	0.5333	
	Fis	0.632	0.102	-0.059	
	P(HW)	0.019822	0.428909	0.645142	
	PGI	1	0.5917	0.5250	0.5583
2		0.4083	0.4750	0.4417	
H esp		0.4832	0.4988	0.4932	
H. obs		0.1833	0.4167	0.4833	
Fis		0.626 0	0.1730	0.028	
P(HW)		0.0000	0.18024	0.825850	
Promedio		H. esp.	0.4278	0.4926	0.4963
		H. obs	0.2249	0.4666	0.4225
		Fis	0.4793	0.0601	0.1500

TABLA 4. Comparación pareada entre poblaciones. Sobre diagonal valores- P (valor- P estimado bajo 1000 permutaciones) y bajo diagonal se muestran valores de F_{st} .

TABLE 4. Pair-wise F_{st} between populations. Above diagonal P -value (P -values estimated from 1000 permutations). Below diagonal F_{st} values are shown.

	Valor- P			
	Lagos	L. Chica	L. Lleu-Lleu	L. La Posada
Valores de F_{st} en poblaciones	L. Chica	—	0,04	0,02
	L. Lleu-Lleu	0,04	—	0,45
	L. La Posada	0,05	0	—

TABLA 5: AMOVA calculada para las tres poblaciones. Global F_{st} entre poblaciones, calculados para un valor de AMOVA = 0.029 ($P = 0.017$, significancia estimada a partir de 10000 permutaciones).

TABLE 5. AMOVA performed on the three populations. Global F_{st} between populations estimated from the AMOVA = 0.029 ($P = 0.017$, significance estimated from 10000 permutations).

Fuente de variación	df	Suma de cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de variación
Dentro poblaciones	2	17,57	0,057	2,92
Entre poblaciones	357	680,07	1,905	97,08

DISCUSIÓN

EQUILIBRIO HARDY WEINBERG, DEFICIT HETEROZIGOTOS Y DESEQUILIBRIO GAMÉTICO.

La electroforesis de proteínas, marcadores relativamente conservados, ha sido utilizada preliminarmente y como referencia para estimar la variación existente en poblaciones naturales de bivalvos dulceacuícolas, permitiendo hacer inferencias sobre aspectos poblacionales (van der Bank 1995; Nagel *et al.* 1996; Mulvey *et al.* 1997; Berg *et al.* 1998, 2007; Hoeh *et al.* 1998; Curole *et al.* 2004; Elderkin *et al.* 2006). También aspectos relacionados con la función metabólica y la adecuación biológica (Brokordt *et al.* 2000 a,b).

Respecto al desequilibrio de Hardy-Weinberg, los datos sugieren que algún factor importante ha influido drásticamente sobre la Laguna Chica para provocar esta desviación significativa en relación a las poblaciones restantes. Casos de desequilibrio de Hardy-Weinberg relativo al déficit de heterocigotos, han sido reportados como una situación frecuente en bivalvos marinos (Saavedra *et al.* 1993; Gallardo *et al.* 1998, Laudien *et al.* 2003; Zouros & Foltz 1984; Gaffney *et al.* 1990; Bierne *et al.* 1998). También se ha registrado en bivalvos dulceacuícolas (Hoeh *et al.* 1998; Berg *et al.* 1998, 2007; Johnson *et al.* 1998; Elderkin *et al.* 2006). Este déficit ha sido atribuido a diversos factores tanto en poblaciones dulceacuícolas como marinas, entre ellos la presencia de alelos nulos (Foltz 1986), endogamia, reproducción no aleatoria, selección y efecto Wahlund (Gaffney *et al.* 1990; Bierne *et al.* 1998). Al analizar la deficiencia de heterocigotos por cuenca encontrado en laguna Chica y laguna La Posada, los resultados obtenidos permiten sugerir como factores causales la endogamia y procesos reproductivos no aleatorios. Experiencias previas en bivalvos dulceacuícolas de la familia Unionidae (*Utterbackia*), han atribuido este déficit a las estrategias reproductivas, encontrándose, diferencias en los valores obtenidos para poblaciones hermafroditas y gonocóricas (Hoeh *et al.* 1998).

Respecto al desequilibrio gamético en invertebrados dulceacuícolas, este ha sido escasamente documentado. Estudios realizados en la ameba dulceacuícola, *Naegleria* revelaron vía electroforesis, valores significativos de desequilibrio gamético, los cuales permitieron concluir relevantes aspectos sobre su modo de reproducción (Pernin & Cariou 1997). Los resultados revelaron desequilibrio en las tres poblaciones de *Diplodon*, es posible que este grupo presente un modo de reproducción alternativo, hermafroditismo facultativo y autofecundación. Esta complejidad en las estrategias reproductivas no es excluyente, puesto que todavía se desconocen detalles de su modo de reproducción, la mayoría de los estudios se han centrado fundamentalmente en aspectos anatómicos de los gloquidios (González, 1998). Estudios a nivel cromosómico realizados por Peredo *et al.* (2003) en *Diplodon chilensis*, revelaron cierto grado de hermafroditismo. A nivel de familia se ha descrito hermafroditismo en los hyriidos (Hebling & Pentead 1974, Avelar & Mendonca 1998). En *Paxyodon serratophorus* se ha encontrado hermafroditismo en baja proporción (Beasley *et al.* 2000). Las hembras de *Hyridella depressa* conservarían tejido gonadal masculino durante su vida, lo que se denomina microhermafroditismo (Byrne 1998). Excepcionalmente, existen especies que conservan el desarrollo directo, situación descrita para *Diplodon charruanus* d'Orbigny 1835 (Bonetto *et al.* 1986).

ESTRUCTURACIÓN POBLACIONAL VERSUS ECOLOGÍA DE LA ESPECIE

En paisajes fragmentados con baja conectividad el flujo genético entre las subpoblaciones tiende a disminuir y la deriva génica aumenta (Mech & Hallett 2001), estructurando poblaciones de hábito sedentario. En la mayoría de los bivalvos dulceacuícolas e invertebrados en general los niveles de estructuración poblacional son determinados por su capacidad de dispersión (Bilton *et al.* 2001). Además de la habilidad para sortear condiciones adversas durante los estadios larvales, siendo este uno de los caracteres más relevantes desde el punto de vista de la evolución del grupo (Berg *et al.* 1998, 2007; Bilton *et al.* 2001). Un caso emblemático respecto a su gran capacidad de dispersión es

Lampsilis siliquoidea, bivalvo dulceacuicola de la familia Unionidae cuyo hospedador puede recorrer distancias que varían entre 6,5 y 75 km (Lyons & Kanehl 2002).

Los valores obtenidos en este estudio, revelan un elevado flujo génico entre los sistemas lacustres estudiados. El índice de fijación de Wright ($F_{st}=0.0274$) y AMOVA indican que no hay estructuración entre las poblaciones, tratándose de una sola gran población que se mantiene homogénea donde la varianza genética se distribuye dentro de las poblaciones.

En los bivalvos dulceacuicolas es frecuente la migración a grandes distancias *via foresis* (Walker *et al.* 2001). Esta migración entre sistemas lacustres estaría mediada por peces, los cuales son hospedadores de larvas gloquidios (Viozzi & Brugni 2001). Adicionalmente la dispersión por aves migratorias no es un fenómeno excluyente. Se ha postulado como agente dispersor a las aves de la especie *Podiceps mayor*; la cual se asienta temporalmente en los humedales aledaños a estos lagos costeros (Lara *et al.* 1988). Respecto a la intervención antrópica no se excluye como factor dispersor adicional, situación que ha sido documentada en los trabajos de Lara *et al.* (1988), relacionada al consumo humano: existen registros arqueológicos que revelan el hallazgo de valvas de *Diplodon* en asentamientos indígenas, desde el Pleistoceno en Chile (Sánchez & Inostroza 1985).

IMPLICANCIAS EVOLUTIVAS Y CONSERVACIÓN

Bajo la perspectiva de la genética de poblaciones la diversidad ha sido considerada un factor clave en la conservación, minimizando el riesgo de extinción (Saccheri *et al.* 1998) y favoreciendo el potencial evolutivo de las especies (Spielman *et al.* 2004). La pérdida de diversidad genética reduce la habilidad de las poblaciones para sortear los cambios ambientales. (Frankham *et al.* 1999, Frankham *et al.* 2002). Si existe compromiso de la aptitud reproductiva como consecuencia de la pérdida de diversidad genética (heterozigocidad), el riesgo de extinción es inminente (Saccheri *et al.* 1998, Newman & Pilson 1997, Bijlsma *et al.* 1999, Reed *et al.* 2002).

En general los valores de diversidad alélica fueron bajos e idénticos para las tres poblaciones estudiadas. Los valores de diversidad podrían ser explicados desde el punto de vista evolutivo, como consecuencia de procesos de recolonización generados por una cadena de eventos postglaciales y tectónicos pleistocénicos, los cuales modificaron los ecosistemas acuáticos locales (Mardones & Jaque 1996). Al igual que los sucesos postglaciales ocurridos en Norteamérica, cuyos efectos fueron evaluados en el bivalvo dulceacuicola *Amblema applicata*, el cual se caracterizó por bajos niveles de diversidad genética (Elderkin *et al.* 2006).

Un posible evento de recolonización posterior desde los hábitats de refugio pudo reducir los niveles de diversidad genética de *Diplodon*, como consecuencia del efecto fundador. Esta hipótesis puede estar sustentada en su paleo-distribución, en cuanto a la secuencia temporal este se encontraría desde finales del Pleistoceno (12.500 años A.P.) en un sitio de Monte Verde (Dillehay 1997) hasta el Holoceno tardío en sitios de Chile central.

Antecedentes respecto a los efectos de las glaciaciones pleistocénicas en los ecosistemas dulceacuicolas de Chile, revelan impactos significativos en el caudal, obstrucción en los sistemas de drenajes, modificación en sus parámetros fisicoquímicos y fragmentación continental (Clapperton 1993; Turner *et al.* 1996). Históricamente el origen de estos sistemas lacustres se remonta al Pleistoceno. En relación al origen de la Laguna Chica y La Posada ambas se emplazan en antiguos valles de la Cordillera de la Costa y cuyos drenajes fueron bloqueados por dunas y cordones litorales ocurridos en la última transgresión marina durante Pleistoceno Superior (Mardones & Jaque 1996). Los valores de diversidad genética (heterozigocidad observada y esperada) son mayores en el Lago La Posada que en el Lago San Pedro, contrario a lo esperado, ya que por su origen común deberían presentar niveles similares. También esto es válido para el Índice de endogamia (F_{is}), que es el doble en Lago San Pedro, indicando una fuerte endogamia, en relación a La Posada. Respecto al lago Lanalhue y Lleu-Lleu su origen es común (tectónico) derivado del solevantamiento de las terrazas costeras de la plataforma de Arauco. El sistema de drenaje del lago Lleu-Lleu fue obstruido en el Pleistoceno Reciente, por las formaciones rocosas, debido a las periódicas crisis sísmicas. Los valores de diversidad genética en el Lago Lleu-Lleu son semejantes a los de La Posada, con un índice de endogamia mucho menor (Tabla 3), indicando que los valores de variabilidad genética no pueden ser atribuidos al origen geológico de los cuerpos de agua, sino que a efectos antrópicos.

Así, desde el punto de vista de intervención antrópica, a diferencia de los otros dos sistemas lacustres, Laguna Chica de San Pedro y Lago Lanalhue son los más impactados. Respecto a la primera, esta ha evolucionado desde tiempos prehispánicos a la actualidad desde una condición oligotrófica a una mesotrófica (Parra *et al.* 2003). El Lago Lanalhue actualmente presenta un gran deterioro en la calidad del agua siendo catalogada como eutrófica, fundamentalmente por la influencia de áreas urbanas y remoción paulatina del bosque nativo (Parra *et al.* 2003). En este lago se ha encontrado evidencias de una fuerte declinación de la población de *Diplodon*, en la actualidad es difícil encontrar poblaciones de esta especie (Valdovinos, *com.pers.*).

Los estudios realizados por Cisternas *et al.* (2000) revelan drásticas transformaciones en el uso de suelo y un incremento en la tasa de sedimentación, como consecuencia del reemplazo de la vegetación de estas cuencas. Existe evidencia en otras latitudes, que revelan el impacto negativo causado por niveles excesivos de sedimentos sobre poblaciones de bivalvos dulceacuícolas, causando su declinación paulatina (Neves & Widlak 1988, Leff *et al.* 1990). El estado actual de *Diplodon chilensis* en el Lago Lanalhue es terminal, la disminución de su rango geográfico en sistemas lacustres, es consecuencia de factores que han sido relacionados directamente con los procesos de eutroficación (Valdovinos & Pedreros 2007).

Experiencias demostradas mediante isoenzimas en bagres de la especie *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus 1766), revelaron como causal de origen los factores antrópicos en la pérdida de diversidad genética (Gallo & Díaz-Sarmiento 2003). Estos factores relacionados con la sobreexplotación, produjo una importante declinación de la especie y deterioro de la cuenca, siendo un factor determinante en los niveles de variación. Estos eventos ya han sido previamente reconocidos como precursor de la pérdida de variabilidad genética (Reeves *et al.* 1995).

La declinación paulatina de la familia Hyriidae no ha sido debidamente considerada, sin embargo, se menciona por primera vez en los trabajos de Parada & Peredo (2005). Estos autores reconocen la acción antrópica como principal causal de la fragmentación de hábitat y de la calidad de agua, afectando la estructura poblacional en *Diplodon*.

Sobre la base de los resultados obtenidos a nivel genético poblacional en *Diplodon chilensis*, se concluye que los factores antrópicos son los que determinan la variabilidad genética. Las estrategias de conservación de las poblaciones de *Diplodon chilensis* deben estar dirigidas al manejo de los cuerpos lacustres, especialmente en el Lago Lanalhue y Laguna Chica de San Pedro. Adicionalmente, se propone el uso de marcadores complementarios que permitan profundizar en el conocimiento de la diversidad genética de la población y comprender la dinámica de las estrategias de reproducción usadas por *Diplodon chilensis* en respuesta a cambios ambientales de corto plazo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los revisores de este manuscrito, especialmente al Dr. Sylvain Faugeron y al Dr. Nicolas Gouin por el impulso inicial al trabajo. Este trabajo fue financiado con aportes del Proyecto DIC- U de C 206.031.085-1.0; 97.031.075-1.0. Grupo de Investigación Genética de Poblaciones Vegetales y Animales 03.C1.01.

BIBLIOGRAFÍA

- ANTHONY, J.L., KESLER, D.H., DOWNING, W.L. & DOWNING, J.A. 2001. Length-specific growth rates in freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae): extreme longevity or generalized growth cessation? *Freshwater Biology* 46:1349-1359.
- AVELAR, W.E.P. & DE MENDONÇA, S.H.S.T. 1998. Aspects of gametogenesis of *Diplodon rotundus gratus* (Wagner, 1827) (Bivalvia: Hyriidae). *American Malacological Bulletin* 14: 157-163.
- BAUER, G. 1988. Threats to the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in central Europe. *Biological Conservation* 45 (4): 239-253.
- BAUER, G. 2001. Factors affecting naiad occurrence and abundance. Pages 155-162 in G. Bauer and K. Wächtler (editors). *Ecology and evolution of the freshwater mussels Unionoida*. Ecological Studies Vol. 145. Springer-Verlag, Berlin.
- BAKER, A.M., SHELDON, F., SOMERVILLE, J., WALKER, K.F. & HUGHES, J.M. 2004. Mitochondrial DNA phylogenetic structuring suggests similarity between two morphologically plastic genera of Australian freshwater mussels (Unionida: Hyriidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:902-912.
- BEASLEY, C. R., TURY, E., VALE, W. G. & TAGLIARO, C. H. 2000. Reproductive cycle, management and conservation of *Paxyodon syrmatophorus* (Bivalvia: Hyriidae) from the Tocantins river, Brazil. *Journal Molluscan Studies* 66: 393-402.
- BERG, D.J., CANTONWINE, E.G., HOEH, W.R. & GUTTMAN, S.I. 1998. Genetic structure of *Quadrula quadrula* (Bivalvia: Unionidae): little variation across large distances. *Journal of Shellfish Research* 17:1365-1373.
- BERG, D. J., CHRISTIAN, A.D. & GUTTMAN, S.I. 2007. Population genetic structure of three freshwater mussel (Unionidae) species within a small stream system: significant variation at local spatial scales. *Freshwater Biology* 52:1427-1439.
- BIERNE, N., LAUNEY, S., NACIRI-GRAVEN, Y. & BONHOMME, F. 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* 148:1893-1906.
- BILTON, D.T., FREELAND, J.R. & OKAMURA, B. 2001. Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32:159-181.
- BIJLSMA, R., BUNDGAARD, J. & VAN PUTTEN, W. F. 1999. Environmental dependence of inbreeding depression and purging in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 1125-1137.
- BRIM BOX, B.J. & MOSSA, J. 1999. Sediments, land us freshwater mussels: Prospects and problems. *Journal of the North American Benthological Society* 18:99-117.
- BROKORDT, K.B., HIMMELMAN, J.H. & GUDERLEY, H.E. 2000a. Effect of reproduction on escape responses and muscle metabolic capacities in the scallop *Chlamys islandica* Muller 1776. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 251:205-225.
- BROKORDT, K.B., Himmelman, J.H. & Guderley, H.E. 2000 b. Reproductive investment reduces recuperation from exhaustive escape activity in the tropical scallop *Envula zizac*. *Marine Biology* 137:857-865.

- BONETTO, A., TASSARA, M. P. & RUMMLI, A. 1986. *Australis n.* subgen. of *Diplodon Spix* (Bivalvia, Unionacea) and its possible relationships with Australian Hyriidae. Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción 57: 55-61.
- BYRNE, M. 1998. Reproduction of river and lake populations of *Hyridella depressa* (Unionacea:Hyriidae) in New South Wales: implications for their conservation. Hydrobiologia 389: 29-43.
- CISTERNAS, M., TORRES L., URRUTIA R., ARANEDA, A. & PARRA, O. 2000. Comparación ambiental mediante registros sedimentarios entre las condiciones prehispanicas y actuales de un sistema lacustre. Revista Chilena de Historia Natural 73:151-162.
- CHUTTER, F.M. 1969. The effect of silt and sand on the invertebrate fauna of streams and rivers. Hydrobiologia 34: 57-76.
- CLAPPERTON, C.M. 1993. Quaternary geology and geomorphology of South America. Elsevier, Amsterdam. 779 pp.
- COCKERHAM, C. C. & WEIR, B.S. 1993. Estimation of gene flow from F-statistics. Evolution 47: 855-863.
- CUROLE, J.P., FOLTZ, D.W. & BROWN, K. M. 2004. Extensive allozyme monomorphism in a threatened species of freshwater mussel, *Margaritifera hembeli* Conrad (Bivalvia: Margaritiferidae). Conservation Genetics 5: 271-278.
- DILLEHAY, T. 1997. Monte Verde: A Late Pleistocene Settlement in Chile. Vol.2; The Archaeological Context. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- DODDS, W.K. & WHILES, M.R. 2004. Quality and quantity of suspended particles in rivers: Continent-scale patterns in the United States. Environmental Management 33:355-367.
- ELDERKIN, C.L., CHRISTIAN, A.D., VAUGHN, C.C., METCALFE-SMITH, J.L. & BERG, D.J. 2006. Population genetics of the freshwater mussel, *Ambiema plicata* (Say 1817) (Bivalvia: Unionidae): evidence of high dispersal and post-glacial colonization. Conservation Genetics 8:355-372.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131:479-491.
- FERREIRA DE SOUZA, M.I., SALGUEIRO, F., CARNAVALE-BOTTINO, M., FELIX, D.B., ALVES-FERREIRA, M., BITTENCOURT, J.V. & MARGIS, R. 2009. Patterns of genetic diversity in southern and southeastern *Araucaria angustifolia* (Bert.). O. Kuntze relict populations. Genetics and Molecular Biology 32:(3)546-556.
- FOLTZ, D. 1986. Null alleles as possible cause heterozygote deficiency in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. Evolution 40 (4): 869-870.
- FRANKHAM, R., LEES, K., MONTGOMERY, M. E., ENGLAND, P. R., LOWE, E. & BRISCOE, D. A. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? Animal Conservation. 2: 255-260.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. D. & BRISCOE, D. A. 2002. Introduction to Conservation. Genetics (Cambridge) Univ. Press, Cambridge, U.K.
- FUENTEALBA, C. & HENRIQUEZ, O. 2008. Rol de las poblaciones de *Diplodon (Diplodon) chilensis* Gray 1828 en la Laguna Chica de San Pedro de la Paz. Amici Molluscarum (16): 20-27.
- GAFFNEY, P.M., SCOTT, T.M., KOEHN, R.K. & DIEHL, W.J. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote efficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. Genetics 124:687-699.
- GALLARDO, M.H., PEÑALOZA, L. & CLASING, E. 1998. Gene flow allozymic population structure in the clam *Venus antiqua* (King of Broderip), (Bivalvia, Veneriidae), from Southern Chile. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 230, 193-205.
- GALLO, H. & DÍAZ-SARMIENTO, J. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum*, (Pises: Pimelodidae) en el río Magdalena (Colombia). Revista de la Academia de Ciencias Colombiana 27(105): 599-605
- GONZÁLEZ, M.R. 1998. Larvas de *Diplodon chilensis chilensis* (Gray, 1828): ¿De vida libre o parasitas de peces? Seminario para optar al Título de Biólogo Marino. Universidad de Concepción. Concepción, Chile.
- HARRIS, H. & HOPKINSON, D.A. 1976. Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics. North Holland Publ. Co., Amsterdam. 283 pp.
- HEBLING, N.J. & PENTEADO, A.M.G. 1974. Anatomia funcional de *Diplodon rotundus gratus* Wagner, 1827 (Mollusca, Bivalvia). Revista Brasileira de Biologia 34: 67-80.
- HOEH, W.R., FRAZER, K.S., NARANJO-GARCÍA, E., BLACK, M.B., BERG, D.J. & GUTTMAN, S.J. 1998. Correlation between matting system and distribution of genetic variation in *Utterbackia* (Bivalvia: Unionidae). Journal Shellfish Research 1:1383-1393.
- JARA-SEGUEL, P., PALMA-ROJAS, C., PARADA, E. & LARA, G. 2000. Quantitative karyotype of *Diplodon chilensis* (Gray1828) (Bivalvia: Hyriidae). Gayana 64(2):189-193.
- JACKSON, D. & JACKSON, D. 2008. Antecedentes arqueológicos del genero *Diplodon* (SPIX, 1827) (Bivalvia, Hyriidae) en Chile. Gayana 72 (2): 188-195.
- JOHNSON, R.L., LIANG, F.G. & FARRIS, J.L. 1998. Genetic diversity among four Amblemini species (Bivalvia: Unionidae) in the Cache and White River, Arkansas. The Southwestern Naturalist 43(3):321-332.
- KREEGER, D., GATENBY, C. & RAKSANY, D. 2004. Beyond biodiversity: the conservation and propagation of native mussel biomass for ecosystem services. Abstract from paper presented at the 2nd Annual Meeting of the Pacific Northwest Native Freshwater Mussel Working Group, April 20, 2004, Vancouver, Washington
- LARA, G., PARADA, E., PEREDO, S., INOSTROZA, J. & MORA, H. 1988. La almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (Gray, 1828), un recurso potencial. Boletín Museo Regional de la Araucanía, Temuco 3:33-40.
- LARA, G., CONTRERAS, A. & ENCINA, F. 2002. La almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae) potencial biofiltro para disminuir los niveles de coliformes en pozos. Experimento de laboratorio. Gayana Zoología 66(2):113-118.
- LAUDIEN, J., FLINT, N.S., Van DER Bank, F.H. & BREY, T. 2003. Genetic and morphological variation in four populations of the surf clam *Donax serra* (Rding) from southern African sandy beaches. Biochemical, Systematics and Ecology 31: 751-772.
- LAYZER, J. B., GORDON, M. E. & ANDERSON, R. M. 1993. Mussels: the forgotten fauna of regulated rivers. a case study of

- the Caney Fork River. *Regulated Rivers: Research and Management* 8:63-71.
- LEFF, L.G., Burch, J.L. & McArthur, J.V. 1990. Spatial distribution, seston removal, and potential competitive interactions of the bivalves *Corbicula fluminea* and *Elliptio complanata* in a coastal plain stream. *Freshwater Biology* 24:409-416.
- LETELLIER, S. 2006. Distribución geográfica de *Diplodon (Diplodon) chilensis* (Gray 1828) basado en la colección del Museo de Historia Natural (MNHCL), Santiago de Chile. *Amici Molluscarum: Boletín de la Sociedad Malacológica de Chile* 13-15.
- LYONS, J. & KANEHL, P. 2002. Seasonal movements of small mouth bass in streams. In: *Black bass: Ecology, conservation, and management, symposium 31*. (EDS Philipp DP, Ridgeway MS (eds American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, pp 149-160.
- MARDONES, M. & JAQUE, E. 1996. Geomorfología del valle del río Laja. I Taller Internacional de geoecología de Montaña y desarrollo Sustentable de los Andes del Sur. The United Nations University 271-286.
- MECH, S.G. & HALLETT, J.G. 2001. Evaluating the effectiveness of corridors: a genetic approach. *Conservation Biology* 15:467-474.
- MILLER, MP. 1997. Tools for Population Genetic Analysis. Version 1.3. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff.
- MULVEY, M., LYDEARD, C., PYER, D.L., HICKS, K.M., BRIM-BOX, J., WILLIAMS, J.D. & BUTLER, R.S. 1997. Conservation genetics of North American freshwater mussels *Amblema* and *Megaloniaias*. *Conservation Biology* 11:868-878.
- NAGEL, K.O., BADINO, G. & ALESSANDRIA, B. 1996. Population genetics of European Anodontinae (Bivalvia: Unionidae) *Journal of Molluscan Studies* 62:343-357.
- NEVES, R.J. & WIDLACK, J.C. 1988. Occurrence of glochidia in stream drift and on fishes of the upper North Fork Holston River, Virginia American. *Midland Naturalist* 119: 111-120.
- NEWMAN, D. & PILSON, D. 1997. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: Experimental populations of *Clarkia pulchella*. *Evolution* 51:354-362.
- PARADA, E. & PEREDO, S. 1994. Un enfoque ecológico evolutivo de las estrategias de historia de vida de los hyriidos chilenos (Molusco: Bivalvia). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* 65: 71-80.
- PARADA, E. & PEREDO, S. 2002. Estado actual e la taxonomía de bivalvos dulceacuícolas chilenos progresos y conflictos. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 691-701.
- PARADA, E. & PEREDO, S. 2005. Relocation as a tool for biodiversity conservation and management lessons from *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia, Hyriidae) *Gayana*. 69(1): 41-47.
- PARADA, E. & PEREDO, S. 2008. *Diplodon patagonicus* (Bivalvia: Hyriidae): to be or not to be. *Gayana* 72(2): 266-267.
- PARADA, E., PEREDO, S. & GALLARDO C. 1987. Esfuerzo reproductivo en *Diplodon chilensis chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia: Hyriidae). Una proposición para su determinación. *Boletín de la Sociedad Biología Concepción* 58:121-126.
- PARADA, E. & PEREDO, S., ANTONIN, F. 1989. Contribución al Conocimiento de los Hyriidae chilenos. *Boletín de la Sociedad Biología Concepción* 60:173-182.
- PARRA, O., VALDOVINOS, C., CISTERNAS, M., HABIT, E. & MARDONES, M. 2003. Caracterización y tendencias tróficas de cinco lagos costeros de Chile Central. *Limnetica* 22(1-2):51-83.
- PASTEUR, N., PASTEUR, G., BONHOMME, F. & BRITTON-DAVIDIAN, J. 1988. *Practical Isozyme Genetics*. John Wiley & Sons Inc., New York. 97-151pp.
- PEREDO, S., JARA – SEGUEL, P. & PALMA-ROJAS, C. 2003. Comparative karyology of lentic and lotic populations of *Diplodon chilensis chilensis* (Bivalvia: Hyriidae). *Veliger* 46: 314-319.
- PERNN, P. & CARIQU, M.L. 1997. Evidence for clonal structure of natural populations of free-living amoebae of the genus *Naegleria*. *Genetic Research* 69: 173-181.
- REED, D. H., BRISCOE, D. A. & FRANKHAM, R. 2002. Inbreeding and extinction: The effect of environmental stress and lineage. *Conservation Genetics* 3: 301-307.
- REEVES, G. H., BRENDA, L. E., BURNETT, K. M., BISSON, P. A. & SEDELL, J. R. 1995. A disturbance-based ecosystem approach to maintaining and restoring freshwater habitats of evolutionary significant units of Anadromous Salmonids in the Pacific Northwest. En: *Evolution and the Aquatic Ecosystem, Defining Unique Units in Population Conservation* (Eds. Nielsen, J. & D. Powers) American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 17:334-349.
- RICCIARDI, A. & RASMUSSEN, J.B. 1999. Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conservation Biology* 13:1220-1222.
- RICHARDSON, BG, BAVERSTOCK, P.R. & ADAMS, M. 1986. *Allozyme Electrophoresis*. Academic Press.
- RUZZANTE, D.E., WALDE, S.J., GOSSE, J.C., CUSSAC, V.E., HABIT, E., ZEMLAK, T.S. & ADAMS, E.D.M. 2008. Climate Control on Ancestral Population Dynamics: Insight from Patagonian Fish Phylogeography. *Molecular Ecology* 17: 2234 – 2244.
- RYDING, S. O. & Rast, W. 1992. El control de la eutrofización en lagos y pantanos UNESCO & Pirámide Madrid.
- SAAVEDRA, C., ZAPATA, C., GUERRA, A. & ÁLVAREZ, G. 1993. Allozyme variation in european populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* 115: 85-95.
- SACCHERI, I., KUUSAAARI, M., KANKARE, M., VIKMAN, P., FORTELIUS, W. & HANSKI, I. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.
- SÁNCHEZ, M. & INOSTROZA, J. I. 1985. Excavaciones arqueológicas en el Alero Quino1. *Boletín del Museo Regional de La Araucanía (Temuco)* 2:53-62.
- SELANDER, R.K., SMITH, M.H., YANG, S.Y., JOHNSON W.E. & GENTRY, J.B. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. 1. Variation in the old field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genetics* VI. University of Texas Publications, 7103, 49-90.
- SCHNEIDER, S., ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. Arlequin ver. 2000: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva. Geneva, Switzerland.
- SOTO, D. & MENA, G. 1999. Filter feeding by freshwater mussel. *Diplodon chilensis* as a biocontrol of salmon farming eutrophication. *Aquaculture* 171: 65-81
- SPIELMAN, D., BROOK, B.W. & FRANKHAM, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact

- them. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 15261–15264.
- STRAYER, D. L. 1999. Statistical power of presence-absence data to detect population declines. Conservation Biology 13:1034–1038.
- STRAYER, D.L., DOWNING, J.A., HAAG, W.R., KING, T.L., LAYZER, J.B., NEWTON, T.J. & NICHOLS, S.J. 2004. Changing perspectives on pearly mussels, North America's most imperiled animals. Bioscience 54, 429–439.
- TURNER, T.F., TREXLER, J.C., KUHN, D.N. & ROBINSON, H.W. 1996. Life history variation and comparative phylogeography of darters (Pisces: Percidae) from the North American Central Highlands. Evolution 50:2023–2036.
- TURNER, K.T., FOGWILL, C.J., MCCULLOCH, R.D. & SUGDEN, D.E. 2005. Deglaciation of the eastern flank of the North Patagonian Icefield and associated continental-scale lake diversions. Geografiska Annaler 87: 363–374.
- VALLEJOS, P. 1996. Utilización de bivalvos de agua dulce (*Diplodon chilensis*) para tratamientos de aguas domésticas residuales. Informe técnico. Proyecto de investigación realizado para CIDERE Biobío. 95 pp.
- VALDOVINOS, C. & CUEVAS, R. 1996. Tasa de aclarancia de *Diplodon chilensis* (Bivalvia, Hyriidae) un suspensívoro bentónico dulceacuícola de Chile Central. Medio Ambiente 13(1) 114–118.
- VALDOVINOS, C. & FIGUEROA, R. 2000. Benthic community metabolism and trophic conditions of four South American lakes. Hydrobiologia 429:151–156.
- VALDOVINOS, C. & PEDREROS, P. 2007. Geographic variations in shell growth rates of the mussel *Diplodon chilensis* from temperate lakes of Chile: Implications for biodiversity conservation. Limnologia 37 (1): 63–75.
- VAN DER BANK, F. H. 1995. Allozyme variation in a freshwater mussel population (*Coelatura kunenensis* Mousson, 1887) from southern Africa. Water SA 21:153–157.
- VAUGHN, C. C. & HAKENKAMP, C. C. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. Freshwater Biology 46:1431–1446.
- VIOZZI, G.P. & BRUGNI, N.L. 2001. Relación parasitaria y nuevos registros de gloquideos de *Diplodon chilensis* (Unionacea: Hyriidae) en peces de la Patagonia argentina. Neotropica 47:3–12.
- WALKER, K.F., BYRNE, M., HICKEY, C.W. & ROPER, D.C. 2001. Freshwater Mussels (Hyriidae) of Australasia. In: Ecology and Evolution Freshwater Mussels Unionoida (eds. Bauer, G. & K. Watchler), pp. 4–31. Springer Verlag, Berlin.
- WILLIAMS, J. D., FULLER, S. L. H. & GRACE, R. 1992. Effects of impoundments on freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionidae) in the main channel of the Black Warrior and Tombigbee Rivers in western Alabama. Bulletin Alabama Museum of Natural History 13: 1–10.
- White, G.M., Boshier, D.H. & Powell, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. Molecular Ecology 8: 1899–1909.
- WOOD, P.J. & ARMITAGE, P.D. 1997. Biological effects of fine sediment in the lotic environment. Environmental Management 21: 203–217.
- YEH, F.C., YANG, R.C., BOYLE, T.B.J., YE, Z.H. & MAO, J.Y.X. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- ZOUROS, E. & FOLTZ, D. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. Malacologia 25:583–591.

