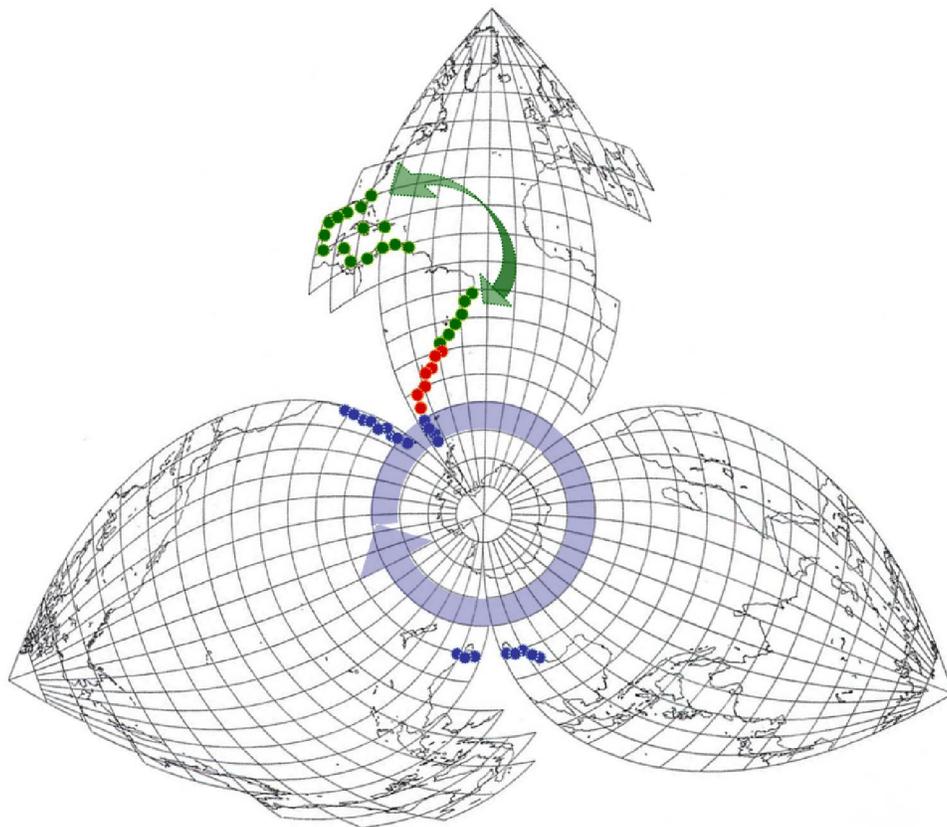


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

Centro Regional Universitario Bariloche

**“Filogeografía y Diversidad de Mejillines  
(Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae) en Sudamérica: Un Collage  
de Patrones y Procesos”**



**Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en Biología**

Berenice Trovant

Director: Dr. Daniel E. Ruzzante

Co-Director: Dr. Néstor G. Basso

2014

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>10</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>13</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>14</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>18</b>
Marco teórico.....	18
Sistema de estudio.....	23
Relaciones filogenéticas de los Brachidontinae (Mytilidae) .....	31
Objetivo general.....	32
Objetivos específicos.....	32
Hipótesis .....	32
Descripción del contenido de los capítulos .....	33
<b>CAPÍTULO 1. Diversidad, filogenia y biogeografía de mejillines (Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae) de la costa de Argentina y Uruguay .....</b>	<b>34</b>
RESUMEN.....	35
INTRODUCCIÓN.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
Muestras .....	38
Obtención de ADN: Extracción, amplificación, secuenciación y alineamiento.....	42
Diseño de iniciadores COI.....	48
Estructura genética intra-específica .....	48
Estructura genética inter-específica .....	50
Análisis filogenético.....	51
RESULTADOS .....	54
Observaciones sobre materiales de referencia.....	54
Estructura genética intra-especifica .....	55
Análisis filogenético.....	60
DISCUSIÓN .....	62
Status de las especies de <i>Brachidontes</i> de Argentina y Uruguay .....	62
Estructura genética intra-especifica e implicancias filogeográficas .....	63
Relaciones filogenéticas de <i>Brachidontes</i> s.l.....	64

<b>CAPÍTULO 2. Mejillines de la costa templado-fría de América del Sur: relaciones filogenéticas, conexión transpacífica y huellas de las glaciaciones del Cuaternario .....</b>	<b>66</b>
RESUMEN.....	67
INTRODUCCIÓN.....	69
MATERIALES Y MÉTODOS .....	74
Muestras .....	74
Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.....	74
Análisis filogenético.....	78
Estructura y diversidad genética de <i>Perumytilus</i> .....	80
Historia demográfica de <i>Perumytilus</i> .....	81
Gradientes latitudinales de temperatura superficial del mar .....	83
RESULTADOS .....	84
Filogenia de los Brachidontinae.....	84
Estructura y diversidad genética en <i>Perumytilus</i> .....	87
Historia demográfica de <i>Perumytilus</i> .....	91
Distribución de los clados de <i>Perumytilus</i> relativos a los gradientes térmicos latitudinales.....	92
DISCUSIÓN .....	96
Relaciones filogenéticas y filogeográficas de los brachidontinos del sur de Sudamérica .....	96
Clados Norte y Sur de <i>Perumytilus</i> .....	98
Diversidad genética en <i>Perumytilus</i> .....	101
ANEXO.....	106
<b>CAPÍTULO 3. Relaciones filogenéticas y patrones biogeográficos de los mejillines de la costa templado-cálida del Atlántico sudoccidental.....</b>	<b>113</b>
RESUMEN.....	114
INTRODUCCIÓN.....	115
MATERIALES Y MÉTODOS .....	117
Obtención de muestras .....	117
Extracción, amplificación y secuenciación de ADN.....	117
Análisis filogenético y estimación de tiempos de divergencia .....	118
Estructura y diversidad genética .....	119
Historia demográfica.....	120
RESULTADOS .....	126

Filogenia de <i>Brachidontes</i> s.s. y estimación de tiempos de divergencia .....	126
Estructura y diversidad genética de las especies – Historia demográfica .....	129
Revisión del material de los museos .....	135
DISCUSIÓN .....	136
Relaciones filogenéticas y patrones filogeográficos .....	136
Estructura y diversidad genética de las especies – Historia demográfica .....	139
Distribución geográfica y ecológica de las especies .....	140
<b>CAPÍTULO 4. Relaciones putativas entre <i>Brachidontes rodriguezii</i> y formas fósiles del mar Entrerriense (Mioceno) .....</b>	<b>142</b>
RESUMEN.....	143
INTRODUCCIÓN.....	144
MATERIALES Y MÉTODOS .....	148
Muestras .....	148
Análisis genético.....	149
Análisis morfogeométrico .....	150
RESULTADOS.....	153
DISCUSIÓN .....	160
<b>CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>162</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>167</b>
<b>TRABAJOS DE RESPALDO .....</b>	<b>194</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura IG1.** Genealogías hipotéticas de genes para una especie con flujo génico restringido entre dos poblaciones físicamente separadas. Los óvalos sombreados representan rangos geográficos de linajes particulares y las flechas sobre las poblaciones actuales (arriba) denotan magnitudes de dispersión contemporánea de individuos desde los sitios de origen (modificado de Avise, 2000).

**Figura IG2.** Relaciones filogenéticas de poblaciones o especies con distribución disjunta bajo escenarios de vicarianza y dispersión. Las letras en minúscula representan taxones; las letras en mayúscula, áreas geográficas. Bajo vicarianza, la filogenia de los taxones refleja la separación de las áreas, mientras que bajo dispersión, las áreas y los taxones pueden reflejar relaciones históricas más variadas. Todos los resultados son afectados por factores adicionales como la historia demográfica poblacional, tiempos evolutivos de los eventos de vicarianza o dispersión y el poder de resolución del análisis molecular u otro tipo de análisis (modificado de Avise, 2000).

**Figura IG3.** Principales eventos históricos que ocurrieron en América durante el Cenozoico.

**Figura IG4.** Rango latitudinal de distribución de las especies de *Brachidontes* s.l. citadas en la bibliografía para América del Sur. Los límites de las provincias biogeográficas se indican con barras transversales celestes.

**Figura IG5.** Hipótesis de dispersión mediada por la deriva de los vientos occidentales (“*West Wind Drift*”) de equinodermos. Los números indican taxones descritos para la región y D representa el punto de origen de cada linaje (modificado de Waters, 2007).

**Figura IG6.** Mapa mundial donde se muestra los principales eventos de intercambio biótico durante el Mioceno Superior, Plioceno y Pleistoceno-Reciente. Intercambios simétricos son indicados con una flecha doble. Para los intercambios asimétricos, la dirección de invasión predominante es indicada por flechas simples. Los signos de preguntas indican incertezas sobre la direccionalidad del intercambio. Cuando se observan dos flechas y una posee un signo de interrogación en la base: intercambio corroborado solo en una dirección, el otro con incertezas. Cuando se observan dos flechas, ambas con signos de interrogación en la base: intercambio en ambas direcciones con incertezas. Notar que no se señala ningún intercambio marino en el Atlántico occidental (modificado de Vermeij, 1991).

**Figura IG7.** Provincias de Moluscos durante el Mioceno tardío en el Atlántico Sudoccidental. Rayado: extensión corroborada en el campo. Gris: extensión hipotética (modificado de Martínez y del Río, 2002a).

**Figura 1.1.** Rango latitudinal de distribución de las especies de *Brachidontes* s.l. del Atlántico sudoccidental estudiadas en este capítulo (barras) y sitios de muestreo (símbolos); (◆) *B. darwinianus*, (▲) *B. rodriguezii*, (●) *B. purpuratus*. Los números indican las localidades: 1: Punta Canario, 2: Santa Clara del Mar, 3: Bahía San Blas, 4: Bahía Rosas, 5: Puerto Madryn, 6: Caleta Carolina, 7: Puerto Deseado, 8: Surfer Bay, 9: Bahía Ensenada (ver Tabla 1.1 para más información).

**Figura 1.2.** Ejemplares secuenciados y materiales tipo. (A-F): *B. darwinianus*; (A, B) sintipo ilustrado por d’Orbigny (1842): ilustración original (A) y presumiblemente el mismo ejemplar conservado en el Museo Británico (B); (C, E) sintipos, (D, F) ejemplares secuenciados de Punta Canario (Montevideo, Uruguay). (G-K) *B. rodriguezii*; (G) ilustración de d’Orbigny (1842), (H) presumiblemente el mismo individuo, designado como lectotipo, (I)

paralectotipo; (J-K) ejemplares secuenciados, (J) Bahía San Blas (localidad tipo), (K) Bahía Rosas; (L) *B. purpuratus*, ejemplar secuenciado de Puerto Deseado. Barra: 1 cm.

**Figura 1.3.** Pasos para la obtención de ADN.

**Figura 1.4.** Esquema del ADN mitocondrial donde se indica la ubicación del gen utilizado, la citocromo oxidasa I, COI (modificado de Taylor et al., 2005).

**Figura 1.5.** Esquema del complejo de genes ribosomales nucleares donde se indica la ubicación de los genes utilizados, el espaciador interno de transcripción nuclear ribosomal (ITS1) y el dominio D1-D3 de la subunidad grande 28S (LSU, sus siglas en inglés).

**Figura 1.6.** Gel de agarosa donde se observa una amplificación de ADN. En la primera calle se ve el marcador de tamaño molecular (“*ladder*”) de 100 -1000 pb.

**Figura 1.7.** *Philobrya blakeana* (Melvill y Standen, 1914) *comb. nov.*, vista de la superficie interior y exterior de la valva. Arriba: ilustraciones de Melvill y Standen (1914), su lámina VII: Figs. 4 y 4a. Abajo: imágenes del holotipo (valvas secas), depositado en el Museo de Manchester (Catálogo # EE.7674; cortesía de Rebecca Machin, curadora). Barra: 5 mm.

**Figura 1.8.** Análisis de componentes principales (PCA) de los  $\Phi_{ST}$  obtenidos a partir del gen mitocondrial COI. (◆) *B. darwinianus*, (▲) *B. rodriguezii* y (●) *B. purpuratus*. Los números indican localidades: 1: Punta Canario, 2: Santa Clara del Mar, 3: Bahía San Blas, 4: Bahía Rosas, 5: Puerto Madryn, 6: Caleta Carolina, 7: Puerto Deseado, 8: Surfer Bay, 9: Bahía Ensenada (ver Tabla 1.1 para más información).

**Figura 1.9.** Redes de haplotipos basadas en el gen mitocondrial COI (A) *Brachidontes darwinianus*, (B) *B. rodriguezii* y (C) *B. purpuratus*. Cada haplotipo es representado por un círculo, y su tamaño es proporcional a su frecuencia; los colores indican localidad de origen. La información de latitud y longitud de cada localidad está indicada en la Tabla 1.1.

**Figura 1.10.** Asociación entre las relaciones filogenéticas de las especies *Brachidontes* y su distribución geográfica en la región de interés, basada en los genes (A) COI ADNmt, (B) 28S ADNr, y (C) ITS1 ADNr. (◆) *B. darwinianus*, (▲) *B. rodriguezii* y (●) *B. purpuratus*. Los números indican localidades: 1: Punta Canario, 2: Santa Clara del Mar, 3: Bahía San Blas, 4: Bahía Rosas, 5: Puerto Madryn, 6: Caleta Carolina, 7: Puerto Deseado, 8: Surfer Bay, 9: Bahía Ensenada (ver Tabla 1.1 para más información).

**Figura 1.11.** Árboles bayesianos de *Brachidontes* s.l. basados en (A) el gen mitocondrial COI y (B) el gen nuclear 28S ADNr, incluyendo especies secuenciadas en este estudio y en estudios anteriores, utilizando a *Ischadium recurvum* y *Geukensia granosissima* (Mytilinae) como grupos externos. Los números por encima de las ramas representan los valores de las probabilidades posteriores bayesianas / ML “*bootstraps*” (> 60) como soporte a los nodos. Los números que siguen a los sitios de muestreo indican el número de individuos por localidad.

**Figura 2.1.** Rango latitudinal de los mejillines presentes a lo largo de las costas de Chile y Argentina. Sitios de muestreo: [1] San Marcos, Iquique; [2] La Chimba, Antofagasta; [3] Coquimbo; [4] Coliumo, Concepción; [5] La Misión; [6] Huinay; [7] Puerto Madryn; [8] Caleta Carolina; [9] Puerto Deseado; [10] Surfer Bay; [11] Bahía Ensenada (ver Tabla 2.2 para más información).

**Figura 2.2.** Representación esquemática de la ubicación del complejo de genes ribosomales utilizados en este capítulo: la subunidad pequeña 18S (SSU, sus siglas en inglés) y el dominio D1-D3 de la subunidad grande 28S (LSU, sus siglas en inglés).

- Figura 2.3.** Árboles bayesianos de los Brachidontinae basados en los genes nucleares 18S ADNr y 28S ADNr, utilizando *Atrina pectinata*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* como grupos externos. Los números sobre las ramas representan los valores de probabilidades posteriores bayesianas / “bootstraps” de Máxima verosimilitud (sólo > 60) como soporte para los nodos. En el caso de *Perumytilus* los números entre paréntesis que siguen al nombre de las especies indican el código de la localidad de las secuencias (ver Fig. 2.1, Tabla 2.2).
- Figura 2.4.** Análisis filogenético bayesiano con los tiempos de divergencia estimados (Ma), basado en secuencias de ADN mitocondrial (COI). La longitud de la rama indica el tiempo de divergencia. Las barras indican el intervalo de credibilidad del 95% para las edades de los nodos. Las estrellas rojas indican los puntos de calibración.
- Figura 2.5.** Red de haplotipos de *Perumytilus* basada en el gen mitocondrial COI. Cada haplotipo es representado por un círculo cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia; los colores indican la localidad de origen (ver Figura 2.1 y Tabla 2.2 para más información).
- Figura 2.6.** Análisis de escalamiento multidimensional (EMD) utilizando los  $\Phi_{ST}$  pareados calculados con las secuencias mitocondriales de *Perumytilus*. (▲) Clado Norte, (●) Clado Sur. Los números corresponden a las localidades que se muestran en la Figura 2.1.
- Figura 2.7.** Distribución de diferencias pareadas (“mismatch”) (izquierda) y perfiles demográficos bayesianos (“bayesian skyline plots”) (derecha). La distribución de diferencias pareadas muestra las frecuencias observadas (línea punteada) y esperadas bajo un modelo de expansión súbito (línea continua); índice de Harpending (“raggedness”, r) y valores de p. Los perfiles demográficos bayesianos muestran el tamaño efectivo de la población estimado (log) por tiempo generacional, a través del tiempo (Ma); línea punteada: valores medios, banda sombreada: intervalo de confianza del 95%. Arriba: Clado Norte, abajo: Clado Sur.
- Figura 2.8.** Gradientes latitudinales de la temperatura superficial del mar (TSM, 2008-2010) a lo largo de ambas costas de Sudamérica austral para el mes más cálido (febrero, arriba) y el mes más frío (agosto, abajo), indicando las localidades donde se tomaron muestras de *Perumytilus*.
- Figura 2.9.** Registros fósiles existentes y muestras secuenciadas de *Perumytilus*. [+] Registros fósiles más antiguos para el centro-norte de Chile y para el este de la Patagonia. [●] muestras genotipadas del Clado Sur, [▲] *Ibid.*, Clado Norte. ZCS Zona de contacto secundario.
- Figura 2.10.** Eventos hipotéticos que habrían conducido a la especiación en *Perumytilus*. (A) Plioceno Tardío/Pleistoceno temprano: Clado Norte limitado a la región templado-cálida del sureste del Pacífico. (B) iniciación de la diferenciación peripátrica del Clado Sur después de la expansión en la Provincia Magallánica templado-fría. (C) las glaciaciones del Pleistoceno en el sur de Chile aíslan los dos clados, conduciendo a la especiación del Clado Sur en las costas no glaciadas de la Patagonia oriental. (D) luego de la de-glaciación del sur de Chile, el Clado Sur se expande hacia el sur de Chile y se establece una zona de contacto secundario (ZCS) entre los dos clados.
- Figura A1.** Especímenes utilizados en este estudio donde se observa la sección del umbo. (a) *P. purpuratus* (Valparaíso, Chile), exhibiendo el recubrimiento calcáreo del ligamento en forma de tubo roto; (b) *P. purpuratus* (Valparaíso, Chile), exhibiendo el recubrimiento calcáreo del ligamento en forma de tubo roto pero completo; (c) *P. purpuratus* (Pto. Deseado); (d) *Austromytilus rostratus* (Tarooma, Tasmania, Australia); (e) *Mytilisepta virgata* (Japon); (f) *M. bifurcata* (California). (c) y (d) muestran el área de inserción del

músculo aductor anterior en forma de tubérculo; (e) y (f) muestran el septo sobre el que se inserta el músculo. Barra: 0.5 cm.

**Figura 3.1.** Localidades de los especímenes analizados genéticamente y de museo de *Brachidontes solisianus*, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii*, distribuidas a lo largo de Brasil, Uruguay y Argentina. Ver Tabla 3.1 para información detallada de las localidades.

**Figura 3.2.** Reconstrucción filogenética bayesiana de los Brachidontinae a partir de los genes 18S y 28S concatenados. Los números sobre las ramas representan los valores de probabilidades posteriores bayesianas / “*bootstraps*” de máxima verosimilitud (sólo > 60) como soporte para los nodos. Las especies secuenciadas en este estudio se indican en negrita y los números entre paréntesis que siguen al nombre de las especies señalan el número de secuencias.

**Figura 3.3.** Reconstrucción filogenética bayesiana de los Brachidontinae a partir del gen mitocondrial COI. Los números sobre las ramas representan los valores de probabilidades posteriores bayesianas / “*bootstraps*” de máxima verosimilitud (sólo > 60) como soporte para los nodos. Las especies secuenciadas en este estudio se indican en negrita y los números entre paréntesis que siguen al nombre de las especies señalan el número de secuencias.

**Figura 3.4.** Red de haplotipos de: (A) *B. solisianus*, (B) *B. darwinianus* y (C) *B. rodriguezii*.

**Figura 3.5.** Distribución de diferencias pareadas (“*mismatch*”) de: (A) *B. solisianus*, (B) *B. darwinianus* y (C) *B. rodriguezii*.

**Figura 3.6.** (A) Sintipo de *Mytilus adamsianus* Dunker de Panamá (ID: 18565317\_04, imagen cortesía de Harry Taylor, Natural History Museum); (B) *B. “adamsianus II”* de Isla Jicarón, Panamá (Lee y Ó Foighil, 2005, ID: 9067); (C) *B. “adamsianus I”* de Pto Vallarta, México (Lee y Ó Foighil, 2005, ID: 9077); (D) *B. “exustus I”* de Veracruz, México (Lee y Ó Foighil, 2005); (E) Sintipo de *B. solisianus* d'Orbigny; (F) *B. solisianus* de Cumuruxatiba, Brasil.

**Figura 4.1.** Distribución geográfica de *Brachidontes rodriguezii* y de especies cercanas utilizadas en este estudio. El rectángulo indica el sitio de colecta del material fósil identificado como *B. lepida* de la Formación Paraná (provincia Paraniana).

**Figura 4.2.** Material fósil y reciente de las especies de mejillines utilizadas en este estudio. Arriba, vista externa de la valva de (A) *Brachidontes lepida*; (B) sintipo de *B. rodriguezii*; (C) sintipo de *B. darwinianus* y (D) *Perumytilus purpuratus* (Clado Sur). Abajo, configuración de “*landmarks*” y “*semi-landmarks*” en el contorno de la valva. Barra: 1 cm.

**Figura 4.3.** Morfología de la valva de un mejillín. Barra: 0.5cm.

**Figura 4.4.** Porcentaje de varianza de la forma de la valva explicada por los componentes principales.

**Figura 4.5.** Análisis de componentes principales CP1 y CP2. Los colores corresponden a las distintas especies: celeste, *B. lepida*; rojo, *B. rodriguezii*; verde, *B. darwinianus*; violeta, *P. purpuratus*. Sobre los ejes se observa la deformación de la valva (línea azul) con respecto al promedio total de la forma (línea celeste).

**Figura 4.6.** Análisis de componentes principales CP3 y CP4. Los colores corresponden a las distintas especies: celeste, *B. lepida*; rojo, *B. rodriguezii*; verde, *B. darwinianus*; violeta, *P.*

*purpuratus*. Sobre los ejes se observa la deformación de la valva (línea azul) con respecto al promedio total de la forma (línea celeste).

**Figura 4.7.** Análisis discriminante canónico. Los porcentajes de la varianza utilizados para detectar la máxima discriminación entre los grupos están entre paréntesis sobre cada eje. Los colores corresponden a las distintas especies: celeste, *B. lepida*; rojo, *B. rodriguezii*; verde, *B. darwinianus*; violeta, *P. purpuratus*. Sobre los ejes se observa la deformación de la valva (línea azul) con respecto al promedio total de la forma (línea celeste).

**Figura 4.8.** Árbol bayesiano basado en el marcador nuclear 28S y árbol basado en la distancia de Mahalanobis basados en datos morfogeométricos. El valor ubicado sobre la rama del árbol genético corresponde a la probabilidad bayesiana posterior que le da soporte al nodo. La línea vertical representa el criterio de corte  $p < 0,05$ .

## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.1.** Sitios de muestreo, temperatura media mensual mínima y máxima superficial del agua de mar (TSM, mín - máx), y número de muestras secuenciadas por gen. AR: Argentina, UY: Uruguay.
- Tabla 1.2.** Lista de Iniciadores utilizados en este estudio para los genes COI ADNmt, 28S e ITS1 ADNr.
- Tabla 1.3.** Secuencias del gen COI y del 28S ADNr de las especies de *Brachidontes* y de otros mitílidos de diferentes estudios utilizados para la reconstrucción filogenética, indicando los lugares de origen, los números de acceso a GenBank y sus referencias.
- Tabla 1.4.** Distancias genéticas entre las tres especies de *Brachidontes* s.l. presentes en las costas de Argentina y Uruguay, basadas en el gen COI. La distancia genética media entre los grupos está por debajo de la diagonal y los valores de  $p$  por encima de la diagonal.
- Tabla 1.5.** Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los genes COI, 28S e ITS1 ADNr para tres especies de *Brachidontes* presentes en las costas de Argentina y Uruguay (\*  $p < 0,05$ ).
- Tabla 2.1.** Iniciadores utilizados en este estudio para el gen 18S ADNr (los iniciadores del gen COI y 28S se detallan en el Capítulo 1, Tabla 1.2).
- Tabla 2.2.** Sitios de muestreo de mejillines utilizados en este capítulo, incluyendo los sitios de las muestras de *Perumytilus* del Capítulo 1.
- Tabla 2.3.** Secuencias de ADN utilizadas en este capítulo.
- Tabla 2.4.** Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de las poblaciones de *Perumytilus*. (\*): Diferencias estadísticamente significativas.
- Tabla 2.5.** Índices de diversidad genética de *Perumytilus* basados en secuencias de ADNmt (COI). N: números de especímenes analizados; S: número de sitios polimórficos; k: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica;  $\Pi$ : número medio de diferencias nucleotídicas y DS: desviación estándar.
- Tabla 2.6.** *Perumytilus*, Clado Norte. Comparaciones entre los  $\Phi_{ST}$  pareados (debajo de la diagonal) y la distancia aproximada entre las poblaciones, en kilómetros (por encima de la diagonal). En el caso de los  $\Phi_{ST}$  pareados, a la izquierda de la barra se indican los valores de  $p$  sin corregir y a la derecha los valores con la corrección de Bonferroni-Holm. (\*): diferencias estadísticamente significativas ( $p$  inferior a su valor corregido).
- Tabla 2.7.** *Perumytilus*, Clado Sur. Comparaciones entre los  $\Phi_{ST}$  pareados (debajo de la diagonal) y la distancia aproximada entre las poblaciones, en kilómetros (por encima de la diagonal). En el caso de los  $\Phi_{ST}$  pareados, a la izquierda de la barra se indican los valores de  $p$  sin corregir y a la derecha los valores con la corrección de Bonferroni-Holm (\*): diferencias estadísticamente significativas ( $p$  inferior a su valor corregido).
- Tabla 2.8.** *Perumytilus*: test de neutralidad por localidad y por clado. (\*) Diferencias estadísticamente significativas.  $F_s$  es considerado significativo cuando  $p < 0,02$ ; en los otros test son consideradas significativas cuando  $p < 0,05$ .
- Tabla 3.1.** Sitios de muestreo de las especies de *Brachidontes* s.s. de las costas de Brasil (BR), Uruguay (UY) y Perú (PE). En los análisis de estas especies se agregaron, a modo de

comparación, las muestras de las localidades de Argentina y Uruguay analizadas en el Capítulo 1 (Tabla 1.1) indicadas con (\*).

**Tabla 3.2.** Sitios de colecta de las muestras de *Brachidontes* depositadas en el “Museo Oceanográfico Eliezer Ríos” (MOFURG) y en el “Museo de Historia Natural de Montevideo” (MHNM).

**Tabla 3.3.** Secuencias de ADN de *Brachidontes* utilizadas en este capítulo junto con su código de acceso a Genbank (el resto de las secuencias utilizadas se detallan en la Tabla 2.2), o el número de identificación del laboratorio en el caso de no haber sido publicadas.

**Tabla 3.4.** Distancias genéticas calculadas con el método “*p-distance*” entre y dentro *Brachidontes solisianus*, *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”*, basadas en datos de secuencias mitocondriales. Las estimaciones del error estándar (ES) se obtuvieron mediante “*bootstrap*” (1000 réplicas).

**Tabla 3.5.** Análisis molecular de la varianza (AMOVA) del gen mitocondrial COI para *B. solisianus*, *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”* (\*  $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.6.** Índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad por localidad y por especie basados en secuencias de ADNmt (COI) de las especies de *Brachidontes*. N: número de muestras analizadas; S: número de sitios polimórficos; k: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica;  $\Pi$ : número medio de diferencias nucleotídicas y DS: desviación estándar. (\*) Diferencias estadísticamente significativas. *F<sub>s</sub>* se considera significativo cuando  $p < 0,02$ ; mientras que D de Tajima se considera significativa cuando  $p < 0,05$ .

**Tabla 3.7.** Comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$  (debajo de la diagonal) y distancia aproximada entre las poblaciones de *B. solisianus* en km (arriba de la diagonal). En el caso de las comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$ , los valores de  $p$  sin corregir se muestran a la izquierda de la barra y después de las correcciones de Holm-Bonferroni a la derecha de la barra. (\*): Diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p$  inferior a su valor corregido).

**Tabla 3.8.** Comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$  (debajo de la diagonal) y distancia aproximada entre las poblaciones de *B. darwinianus* en km (arriba de la diagonal). (\*): Diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p < 0,05$ ). Los valores de  $p$  fueron todos iguales a 0.0000001 por lo que la corrección de Holm-Bonferroni no pudo ser calculada.

**Tabla 3.9.** Comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$  (debajo de la diagonal) y distancia aproximada entre las poblaciones de *B. rodriguezii* en km (arriba de la diagonal). En el caso de las comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$ , los valores de  $p$  sin corregir se muestran a la izquierda de la barra y después de las correcciones de Holm-Bonferroni a la derecha de la barra. (\*): Diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p$  inferior a su valor corregido).

**Tabla 4.1.** Especies de mejillines utilizadas en este estudio y sus sitios de muestreo.

**Tabla 4.2.** Material fósil de la Formación Paraná (depositado en el Museo Argentino de Ciencias Naturales).

**Tabla 4.3.** Secuencias del gen nuclear 28S ADNr obtenidas en este estudio y utilizadas en este capítulo.

**Tabla 4.4.** Análisis de componentes principales. Se muestran sólo los cuatro primeros componentes que explican más del 5% de varianza total. Los autovalores son la proporción de la variabilidad total explicada por cada componente.

**Tabla 4.5.** Análisis discriminante Canónico (variables canónicas= número de grupos -1).

**Tabla 4.6.** Tabla de clasificación cruzada.

**Tabla 4.7.** Distancias de Mahalanobis (debajo de la diagonal) entre grupos y valores de p (sobre la diagonal).

## AGRADECIMIENTOS

**Discusión Académica:** Ana Parma (CENPAT), Enrique Lessa (Universidad de la República), Federico Márquez (CENPAT), Wolfgang Stotz (Universidad Católica del Norte, Chile), Fernando Dincao (FURG), Mariana Morando (CENPAT), Marco Méndez y Christian Ibañez (Universidad de Chile), Guy Baele (Ghent University, Bélgica).

**Muestras:** Lobo Orensanz, Ana Parma, Ana Cinti y Gaspar Soria (CENPAT), Andrea Gavio (U.Nac. de Mar del Plata), Claudia del Río y Daniel Grau (MACN), César Lodeiros (Universidad de Oriente, Venezuela), Wolfgang Stotz (Universidad Católica del Norte, Chile), Carlos Jara (Universidad de Santiago de Chile), Melina Barrionuevo (Centro de Investigaciones Pto. Deseado), Paul Brickle (Falkland Islands Shallow Marine Surveys Group), Gustavo Lovrich (CADIC), Cristma Pinteiro y André (FURG), Fabrizio Scarabino (DINARA, Uruguay), Jorge Trovant y Graciela Giolito, Luciana Lotto (Universidad Federal Fluminense), Romina Palacios y Ricky Amoroso (CENPAT), Billy Ernst (U. de Concepción, Chile), Simon Grove (Tasmanian Museum), Steve Gaines, Carolle Blanchette y Avrey Parsons (University of California), Gray Williams (University of Hong Kong), Craig Mundy (University of Tasmania) e Hiroshi Wada (University of Tsukuba).

**Acceso a colección de Museos y material fotográfico:** Rebecca Machin (Museo de Manchester), Harry Taylor (NHMUK Photographic Unit), Andreia Salvador (British Natural History Museum), Claudia del Río (MACN), Taewan Lee (Universidad de Michigan), Paula Spotorno de Oliveira (Museo Oceanográfico Eliezer Ríos), Fabrizio Scarabino (Museo de Historia Natural de Montevideo).

**Ayuda técnica - asistencia en el laboratorio:** Tylor Zemplak, Gregory McCracken, Abby vanderJagt e Ian Paterson (Universidad de Dalhousie); Liza Martinazzo y Luciano Real (CENPAT); Ivanna Tomasco, Carolina Amato y Nicolás Boullosa (Universidad de la República), Noela Sánchez (CENPAT), Annie Machordom (MNCN, España), María Cristina da Silva Cortinhas (FURG, Brasil).

**Financiamiento:** Este estudio fue financiado por el Proyecto PICT / RAICES 1839 (FONCYT, Argentina) y una beca tipo II del CONICET. Una beca del Ministerio de Asuntos Exteriores y Comercio Internacional (DFAIT) del Gobierno de Canadá financió mi visita a la Universidad de Dalhousie y una beca de AUIP de movilidad, me permitió viajar a realizar una pasantía a la Universidad de la República.

Quería agradecerles a Daniel, Néstor y Lobo por acompañarme durante estos cinco años, bancarme, guiarme y apoyarme tanto en lo académico como en lo personal. Realmente la pasé muy bien y aprendí mucho, así que les agradezco de corazón a los tres, esperando que también ellos lo hayan disfrutado. Quiero agradecerle a mi familia: mi mamá, mi hermana Melina, mis sobrinos, a Lobo y Ana, a mis hermanos Lau y Manu, mi papá, mi abuelo y pipa por todo su apoyo y cariño y, a mis amigos que de distintas maneras y en distintos momentos a lo largo de este doctorado me acompañaron y me ayudaron a pasarla lo mejor posible, sin ellos no hubiese podido hacerlo: Patricia Vilanova, Guillermo Acusse, Claudia Serrago, Nuria Vázquez, Paula Raffo, Colo Cumplido, Diego Pérez, Soledad Leonardi, Rodrigo René-Cura, Matías Chávez, Emilia Diez, Marcela Sepúlveda, Pedro Fiorda, Verónica Savoya, Santi Fiorda, Celia Beloso, Andrea Marin, Romina Llanos, Victor López, Leonardo Cotichelli, Cecilia Villanueva, Jorgelina Frías, Luciana Pozzi, Laura Bianucci, Diego Sorrentino, Susan Heaslip, Vicky Yaroshewski, Christine Crowe, Cintia Sacco, Sebastián Arteta, José y Marta.

## RESUMEN

### Presentación del problema

Muchas comunidades intermareales de las costas rocosas de Sudamérica están dominadas por “mejillines” (Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae). Dada su condición de bioingenieros, los mejillines tienen un efecto significativo sobre la biodiversidad regional. Los mejillines de Sudamérica austral incluirían seis especies nominales: *Brachidontes purpuratus* (Lamarck, 1819), *B. rodriguezii* (d'Orbigny, 1842), *B. darwinianus* (d'Orbigny, 1842), *B. solisianus* (d'Orbigny, 1842), *B. granulatus* (Hanley, 1843) y *B. blakeanus* (Melvill y Standen, 1914). A pesar de su importancia ecológica, el status de estas especies permanece sin clarificar. Los estudios taxonómicos se han basado principalmente en la morfología de la valva, pero su gran variabilidad fenotípica es motivo de confusión. Un estudio morfogeométrico sugirió que *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* serían sinónimos de *B. purpuratus*. El status genérico de *B. purpuratus* es incierto; algunos autores lo ubican en el género monotípico *Perumytilus*. *Brachidontes darwinianus* es considerado por algunos autores como sinónimo de *B. exustus*, la cual es en realidad un complejo de cinco especies crípticas distribuidas en el Caribe y el golfo de México. *Brachidontes solisianus* ha sido ubicado por algunos autores en el género *Mytilaster*. El registro para el litoral patagónico de *B. granulatus*, especie típica de la provincia biogeográfica Chileno-Peruana, no ha sido debidamente validado. La descripción original de *B. blakeanus*, basada en material de las Islas Malvinas, crea dudas acerca de su identidad y de los registros para el litoral patagónico. No existiendo estudios basados en información molecular, el status taxonómico y las relaciones filogenéticas de estas especies permanece irresuelto. El primer objetivo de esta tesis es elucidar esas relaciones.

La información existente sobre la distribución geográfica de los braquidontinos de Sudamérica austral y sus relaciones putativas con especies de otras regiones sugieren que este grupo constituye un modelo filogeográfico promisorio. *Brachidontes purpuratus*, el único Brachidontinae presente en aguas templado-frías, se asemeja mucho en aspecto a la especie australiana *Austromytilus rostratus*. *Brachidontes solisianus*, distribuida en las costas de Brasil, ha sido citada también para el Gran Caribe, en tanto que el fenotipo de *B. darwinianus* es lo bastante parecido al de *B. exustus* (golfo de México y Caribe) como para que muchos autores lo consideren un sinónimo junior de esa especie nominal. Estos dos últimos son casos potenciales de distribución antitropical, con un rango interrumpido en la región tropical. Finalmente, una forma presente en la formación Paraniana (Mioceno), *B. lepida*, ha sido considerada como una subespecie de *B. rodriguezii* por algunos autores.

### Objetivo e hipótesis

El objetivo principal de este trabajo es evaluar tres hipótesis filogeográficas motivadas por esos patrones:

[i] La especie sudamericana *B. purpuratus* y la australiana *Austromytilus rostratus* tienen un ancestro común y divergieron luego de un episodio de dispersión trans-Pacífica.

[ii] *Brachidontes darwinianus* y *B. solisianus* son miembros de pares antitropicales, con contrapartes en el Caribe y golfo de México pertenecientes al “complejo *exustus*”.

[iii] *Brachidontes rodriguezii* evolucionó en la región a partir de formas ancestrales del Mioceno tardío representados en la provincia Paraniana.

## Materiales y Métodos

Para llevar a cabo este estudio se obtuvieron muestras de 24 localidades a lo largo de las costas de Brasil, Uruguay, Argentina, Chile y Perú; se dispuso además, de materiales de Brachidontinae de Tasmania, Hong Kong, Japón, California y Venezuela. Sobre estas muestras se realizaron análisis moleculares utilizando un gen mitocondrial (COI) y tres genes nucleares (28S, ITS1 y 18S). En los casos en que no se pudieron utilizar herramientas moleculares, se realizaron análisis morfogeométricos, así como observaciones de caracteres morfológicos sobre materiales de museo.

## Resultados y conclusiones

La reconstrucción filogenética indica que los Brachidontinae son monofiléticos e incluyen tres clados: [i] *Austromytilus* + *Mytilisepta* (generalmente considerado como un miembro de los Septiferinae) + *Perumytilus*; [ii] *Brachidontes* s.l. (incluyendo a *Hormomya*) + *Mytilaster*, y [iii] *Ischadium* + *Geukensia*. Los miembros del primer clado se distribuyen a lo largo de las costas templadas del Océano Pacífico e incluyen a *P. purpuratus*, *Austromytilus rostratus* (Dunker, 1857), *Mytilisepta virgata* (Wiegmann, 1837) y *M. bifurcata auct.* La inclusión de *P. purpuratus* en el clado [ii] es evidencia para la retención de *Perumytilus* como género válido. *Brachidontes blakeanus*, la especie descrita para las Islas Malvinas, es transferida al género *Phylobrya* (Phylobriidae).

La divergencia entre *Perumytilus* (Sudamérica) y *Austromytilus* (Australia) estaría ligada a un hipotético evento de dispersión en un escenario temprano de la Deriva de los vientos occidentales (West Wind Drift, WWD) durante el Oligoceno tardío o Mioceno temprano, posterior a los eventos de fragmentación de Gondwana. *Perumytilus* incluye dos clados genéticamente distinguibles, uno confinado a la provincia Chileno-Peruana (templado-cálida) y el otro a la provincia Magallánica (templado-fría). Se hipotetiza que la divergencia de estos clados habría resultado de diferenciación peripátrica seguida de aislamiento durante las glaciaciones cuaternarias y, posteriormente, el establecimiento de una zona de contacto secundario en el centro-sur de Chile.

El segundo clado incluye a *B. darwinianus*, *B. solisianus*, y *B. rodriguezii*, distribuidas en el Atlántico sudoccidental, y *B. granulatus* en el Pacífico Oriental. A pesar de la similitud fenotípica de *B. darwinianus* (Uruguay y Brasil) con el “complejo *exustus*” (golfo de México y el Caribe), no se observó una relación cercana entre ellas, quitando soporte a la hipótesis de un patrón de distribución antitropical. Por el contrario, *Brachidontes solisianus* (Brasil) y *B. “exustus I”* (golfo de México y Caribe) son especies hermanas distribuidas respectivamente al sur y al norte de una discontinuidad que incluye la desembocadura del Río Amazonas, que podría estar actuando como una barrera. Los análisis morfogeométricos no proveen soporte a una relación estrecha entre *B. rodriguezii* y *B. lepida* (Mioceno), que deben ser consideradas especies distintas. Se discute la posibilidad de que el mar Enterriense y una hipotética vía trans-amazónica que conectó el Atlántico con la región Caribe durante el Mioceno haya sido el escenario donde se originaron *B. rodriguezii* y *B. darwinianus*.

A pesar de que las poblaciones de mejillines del sur de Sudamérica son ecológicamente similares en apariencia, su ensamble<sup>1</sup> involucra componentes claramente diferenciados en su historia biogeográfica y relaciones filogenéticas.

---

<sup>1</sup> Ensamble es entendido como un conjunto de organismos que co-ocurren en algún ambiente particular sin implicancias funcionales usualmente asignadas a las comunidades.

## ABSTRACT

### Presentation of the problem

Many intertidal rocky shores of South America are dominated by small brachidontin mussels (*Brachidontes* and its relatives). Given their status as bioengineers, these bivalves have a significant effect on regional biodiversity. Six nominal species have been reported for southern South America: *Brachidontes purpuratus* (Lamarck, 1819), *B. rodriguezii* (d'Orbigny, 1842), *B. darwinianus* (d'Orbigny, 1842), *B. solisianus* (d'Orbigny, 1842), *B. granulatus* (Hanley, 1843) and *B. blakeanus* (Melvill and Standen, 1914). Despite their ecological importance, the status of these species remains unclear. Taxonomic studies have been based mainly on the morphology of the valve, but high phenotypic variability is a source of confusion. The generic status of *B. purpuratus* is uncertain; some authors place it in the monotypic genus *Perumytilus*. *Brachidontes darwinianus* is considered by some authors as a synonym of *B. exustus*, actually a complex of five cryptic species distributed in the Caribbean and the Gulf of Mexico. *Brachidontes solisianus* has been placed by some authors in the genus *Mytilaster*. Patagonic records of *B. granulatus*, a species typical of the Chilean-Peruvian biogeographic province, have not been adequately validated. The original description of *B. blakeanus*, based on material from the Malvinas Islands, raises doubts about its identity.

In the absence of information based on molecular studies, the taxonomic status and phylogenetic relationships of these species remains unresolved. The first objective of this thesis is to elucidate their distinctness and phylogeny.

Available information on the geographical distribution of the brachidontins from southern South America and their putative relationship with species from other regions suggests that this group is a promising phylogeographic model. *Brachidontes purpuratus*, the only Brachidontinae present in cool temperate waters, is very similar in appearance to the Australian species *Austromytilus rostratus*. *Brachidontes solisianus* distributed along the coast of Brazil, has been cited also for the Grand Caribbean, while the phenotype of *B. darwinianus* is so similar to *B. "exustus"* that many authors consider it a junior synonym of the latter nominal species. These are potential cases of antitropicality, distribution ranges with an interruption in the tropical region. Finally, a fossil present in the Paranaian formation (Miocene), *B. r. lepida*, has been considered as a subspecies of *B. rodriguezii* by some authors.

### Objectives

The main objective of this study was to evaluate phylogeographic hypotheses motivated by the patterns introduced above:

[i] The South American species *B. purpuratus* and the Australian *Austromytilus rostratus* have a common ancestor, and diverged following trans-Pacific dispersal.

[ii] *Brachidontes darwinianus* and *B. solisianus* are members of antitropical pairs, with counterparts in the Caribbean and the Gulf of Mexico belonging to the “*exustus* complex”.

[iii] *Brachidontes rodriguezii* is closely related to fossil forms of late Miocene age represented in the Paranaian Province.

## Materials and Methods

Samples were collected at 24 locations along the coasts of Brazil, Uruguay, Argentina, Chile and Peru; also available were brachidontin materials from Tasmania, Hong Kong, Japan, California and Venezuela. Sequences were obtained for the mitochondrial gene (COI) and three nuclear genes (28S, 18S and ITS1). In the case of comparisons involving fossil forms, in which case molecular information was not available, morphogeometrical methods and morphological observations on museum materials were conducted.

## Results

The inferred phylogenies suggest that the subfamily Brachidontinae is monophyletic and includes three clades: [i] *Austromytilus* + *Mytilisepta* (generally regarded as a member of Septiferinae) + *Perumytilus*; [ii] *Brachidontes* s.l. (including *Hormomya*) + *Mytilaster*, and [iii] *Geukensia* + *Ischadium*. Members of the first clade are distributed throughout the temperate Pacific and include '*B. purpuratus*', *Austromytilus rostratus* (Dunker, 1857), *Mytilisepta virgata* (Wiegmann, 1837) and *M. bifurcata* auct. Including *P. purpuratus* in clade [ii] provides support for retaining *Perumytilus* as a valid genus. *Brachidontes blakeanus*, described for the Malvinas Island, is transferred to the genus *Phylobrya* (Phylobriidae).

The divergence between *Perumytilus* (South America) and *Austromytilus* (Australia) is associated with a hypothetical dispersal event in an early stage of the West Wind Drift, during the late Oligocene or early Miocene, following the fragmentation of Gondwana. *Perumytilus* includes two genetically distinct clades, one confined to the Chilean-Peruvian province (warm temperate) and the other to the Magellanic Province (cold-temperate). It is hypothesized that the divergence of these clades was the result of peripatric differentiation followed by isolation during the Quaternary glaciations, and, later, the establishment of a secondary contact zone in south-central Chile.

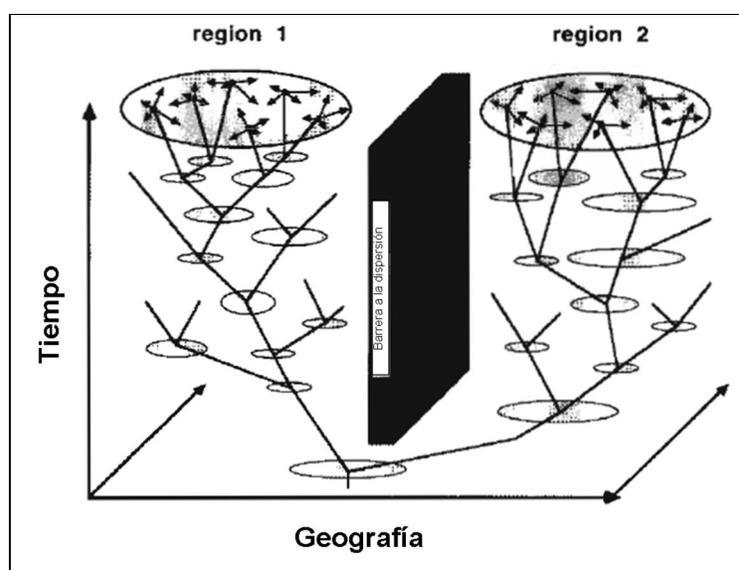
The second clade includes *B. darwinianus*, *B. solisianus* and *B. rodriguezii*, distributed in the southwest Atlantic, and *B. granulatus* in the Eastern Pacific. Despite the phenotypic similarity of *B. darwinianus* (Uruguay and Brazil) with members of the "*exustus* complex" (Gulf of Mexico and the Caribbean), no close relationship between them was found. Thus, the hypothesis of an antitropical pattern of distribution is rejected. By contrast, *Brachidontes solisianus* (Brazil) and *B. "exustus I"* (Gulf of Mexico and Caribbean) are sister species distributed respectively south and north of a discontinuity that includes the mouth of the Amazon River, which could be acting as a barrier. Morphogeometrical analyses do not support a close relationship between *B. rodriguezii* (extant) and *B. lepida* (Miocene), which should not be considered conspecific.

Although mussel beds along the coast of southern South America are ecologically similar in appearance, their assembly involves components with different biogeographic histories and phylogenetic relationships.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### Marco teórico

El objetivo principal de la filogeografía es comprender como los eventos históricos han contribuido a dar forma a la distribución geográfica actual de los genes, poblaciones y especies (Freeland et al., 2011). El término fue introducido por Avise (1987) que la definió como “el campo de estudio que se ocupa de los principios y procesos que gobiernan las distribuciones geográficas de los linajes de genes, especialmente dentro y entre especies cercanamente relacionadas”. Comparando las relaciones evolutivas de los linajes genéticos con sus distribuciones geográficas, en el contexto de la historia geológica, es posible inferir acerca de los procesos que han tenido mayor influencia en la distribución de la variación genética. La filogeografía reúne componentes temporales (relaciones evolutivas) y aspectos espaciales (distribuciones geográficas) (Avise, 2000; Fig. IG1).



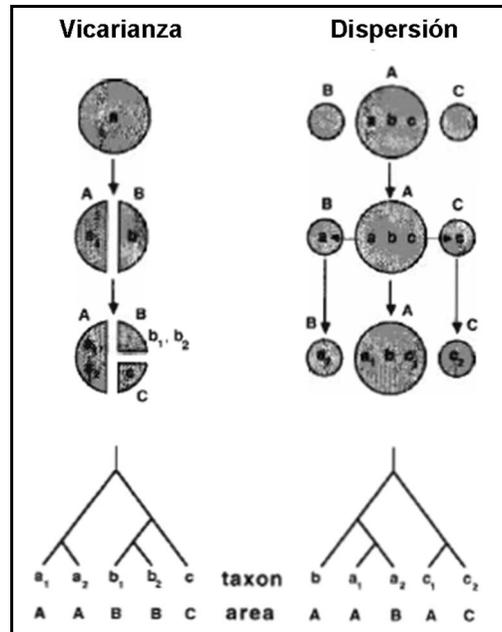
**Figura IG1.** Genealogías hipotéticas de genes para una especie con flujo génico restringido entre dos poblaciones físicamente separadas. Los óvalos sombreados representan rangos geográficos de linajes particulares y las flechas sobre las poblaciones actuales (arriba) denotan magnitudes de dispersión contemporánea de individuos desde los sitios de origen (modificado de Avise, 2000).

El marco conceptual de la filogeografía es la teoría de la coalescencia, orientada a dilucidar retrospectivamente los orígenes de la variación genética. Dos alelos de una población, en ausencia de selección, tienen una historia que lleva a un ancestro común, en el que coalescen. Eventualmente todos los alelos coalescen en un mismo y único alelo (Avise, 2009). El objetivo es inferir las condiciones y tiempo del proceso. Los métodos genealógicos

son utilizados para estimar los parámetros del proceso que genera cada árbol. El proceso de coalescencia es una herramienta analítica poderosa que puede ser utilizada para estimar parámetros poblacionales tales como tasas de mutación o migración (Rosenberg y Nordborg, 2002; Hickerson et al., 2010).

Los patrones disyuntos de distribución que exhiben taxones estrechamente relacionados han sido una fuente de motivación para la investigación filogeográfica. Los factores históricos invocados con más frecuencia para explicar esos patrones son la extinción, la vicarianza y la dispersión (Avice, 2000; Crisci et al., 2000) (Fig. IG2). Bajo la hipótesis de vicarianza, poblaciones o taxones filogenéticamente relacionados con distribuciones más o menos continuas, son separadas por barreras que surgen de cambios en la geología o el paisaje, el clima y el hábitat (e.g. la separación de los continentes o la subdivisión física de un cuerpo de agua, como la creada por la formación del istmo de Panamá), mientras que bajo la hipótesis de dispersión, la distribución actual de una población es explicada por una colonización activa o pasiva a partir de centros de origen ancestrales, sorteando barreras preexistentes. En la hipótesis de vicarianza se asume que la colonización ocurrió antes de que se formara la barrera, mientras que en un escenario de dispersión la colonización ocurre después de la formación de barrera (Futuyma, 2005). El énfasis en los fenómenos invocados para explicar la distribución de los taxones ha cambiando a lo largo de la historia.

Durante mucho tiempo la dispersión fue la explicación dominante para explicar la distribución de los organismos, bajo el supuesto de la estabilidad geológica de los continentes. La biogeografía dispersalista se desarrolló a mediados y fines del siglo XIX a partir de las ideas de Darwin y Wallace, enfatizando la dispersión a partir de centros de origen para explicar la distribución de los seres vivos (Morrone, 2004). A mediados del siglo XX, con el desarrollo de la teoría sobre la deriva continental y la tectónica de placas, la vicarianza surgió como una explicación alternativa a la dispersión (Croizat, et al., 1974; Nelson y Platnick, 1981). En las últimas décadas, la mayoría de los debates en el campo de la biogeografía histórica siguen centrados en la confrontación de los modelos de vicarianza (en sentido amplio, e.g., Heads, 2005) y dispersión (e.g., Waters, 2008), aunque en general ambos fenómenos son admitidos como plausibles (Crisci et al., 2000; Futuyma, 2005).



**Figura IG2.** Relaciones filogenéticas de poblaciones o especies con distribución disjunta bajo escenarios de vicarianza y dispersión. Las letras en minúscula representan taxones; las letras en mayúscula, áreas geográficas. Bajo vicarianza, la filogenia de los taxones refleja la separación de las áreas, mientras que bajo dispersión, las áreas y los taxones pueden reflejar relaciones históricas más variadas. Todos los resultados son afectados por factores adicionales como la historia demográfica poblacional, tiempos evolutivos de los eventos de vicarianza o dispersión y el poder de resolución del análisis molecular u otro tipo de análisis (modificado de Avise, 2000).

En América, las principales contingencias históricas que pueden haber modulado la distribuciones de la biota actual y el ensamblado de las comunidades marinas son (Fig. IG3): la fragmentación de Gondwana (Sanmartín y Ronquist, 2004), el levantamiento de los Andes desde el Cretácico superior (Isacks, 1988; Gregory-Wodzicki, 2000; Compagnucci, 2011; Folguera et al., 2011), la apertura del Pasaje de Drake durante el Eoceno medio (Scher y Martin, 2006), la apertura del canal de Tasmania en el Eoceno superior (Nelson y Cooke, 2001) el establecimiento de la circulación circumpolar antártica completa (*West Wind Drift*, WWD) durante el Oligoceno. Intercaladas con estos procesos globales, tuvo lugar una serie de transgresiones marinas del Atlántico (Malumián y Náñez, 2011). Más recientemente, otros procesos importantes fueron la formación del Istmo Panamá en el Plioceno (Lessios, 2008) y las glaciaciones del Cuaternario (Fraser et al., 2012). Todos estos eventos históricos han dejado huellas que, en mayor o menor medida, se pueden observar en la distribución actual y en el genoma de los organismos.

Un aspecto fundamental de la ecología evolutiva y de la biología de la conservación es la medida en que los patrones actuales de diversidad biológica reflejan la acción de estos eventos o contingencias históricas vs procesos ecológicos contemporáneos. Este es el campo emergente de la ecofilogenética, que atiende a “la incorporación de la evolución y las contingencias históricas en la agenda de investigación ecológica a través del uso generalizado de datos filogenéticos” (Mouquet et al., 2012). Diversos estudios proporcionan evidencia sintética y convincente de la importancia de la integración de los procesos ecológicos y evolutivos para entender las causas, el mantenimiento y las consecuencias de la diversidad (Beaulieu et al., 2012; Cavender-Bares et al., 2012). La reconstrucción de las relaciones filogenéticas acompañadas de calibraciones de tiempo que permitan ligarlas a paleoclimas y a la historia geológica, y las implicancias de esa síntesis para la contextualización de las respuestas de los organismos al cambio global, imponen retos tan substanciales como relevantes.

El objetivo principal de esta investigación es asociar factores históricos y, en los casos en que sea posible, factores ecológicos, a los patrones de distribución geográfica actual de los linajes de genes de un grupo particular de invertebrados marinos de Sudamérica austral, los mejillines del género *Brachidontes* y formas relacionadas.

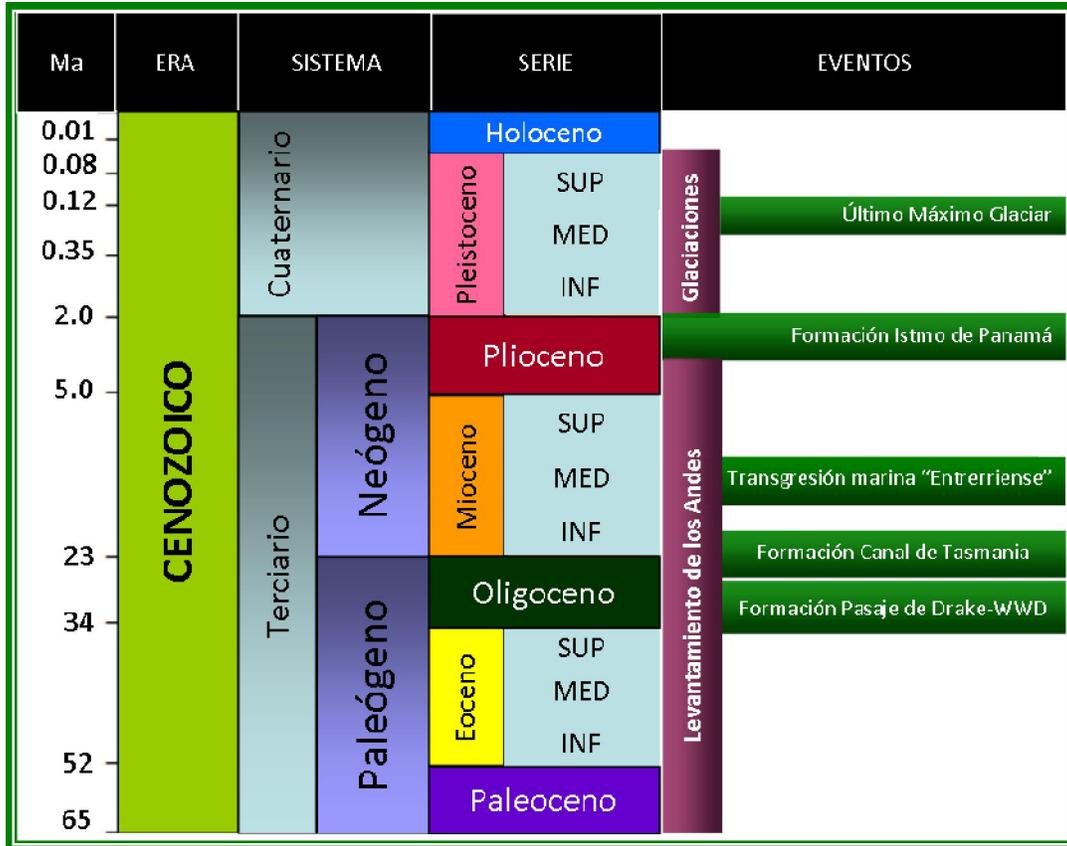


Figura IG3. Principales eventos históricos que ocurrieron en América durante el Cenozoico.

## Sistema de estudio

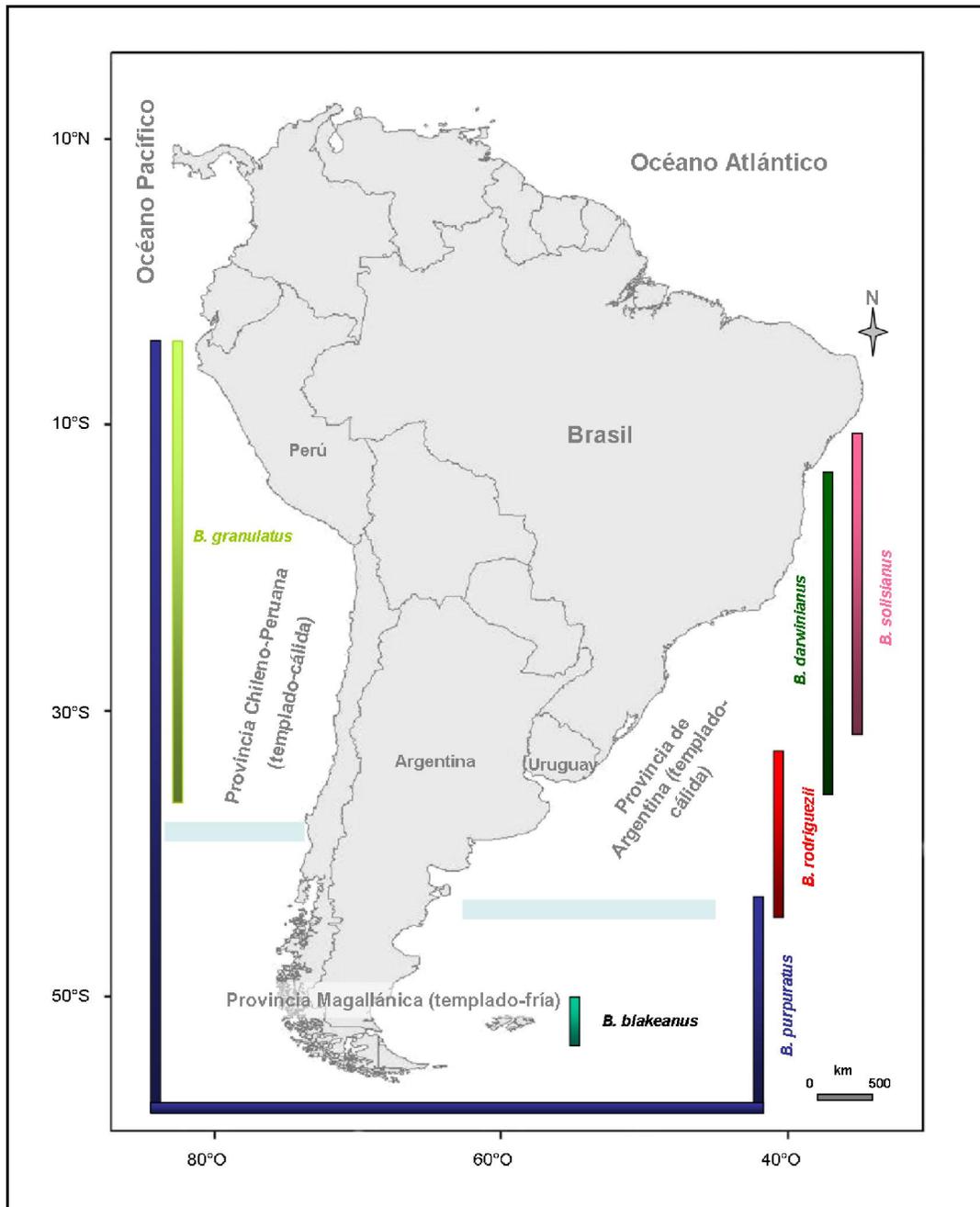
Las comunidades que caracterizan el intermareal rocoso de ambas costas de Sudamérica están a menudo dominadas por densas poblaciones de pequeños mitílicos, “mejillines”, pertenecientes al género *Brachidontes* Swainson y formas relacionadas (Mytilidae: Brachidontinae) (Tanaka y Magalhães, 2002; Silliman et al., 2011). Este grupo incluye entre 25 y 35 especies válidas (dependiendo de las sinonimias aceptadas; Huber, 2010) distribuidas a lo largo de las costas cálidas y templado-cálidas de todo el mundo. La única excepción es *Perumytilus purpuratus* (Lamarck), cuyo rango de distribución se extiende a aguas templado-frías (Fig. IG4).

Los mejillinares de Sudamérica austral están dominados por seis especies que se reemplazan latitudinalmente (Fig. IG4). En la costa templado-cálida del océano Atlántico, al norte de Santa Catarina (Brasil) los mejillinares están compuestos por dos especies: *B. darwinianus* (d'Orbigny), una especie estuarial, y *B. solisianus* (d'Orbigny), una especie marina (Tanaka y Magalhães, 1999). El límite sur de la distribución de *B. darwinianus* no está bien establecido. d'Orbigny (1842) basó la descripción original en materiales coleccionados en Bahía Rosas (norte del golfo San Matías, Argentina), Maldonado (Uruguay) y Río de Janeiro (Brasil), pero no hay registros ulteriores consistentes para las costas argentinas. *Brachidontes solisianus*, ubicado por algunos autores (e.g. Huber, 2010, seguida por WoRMS <http://www.marinespecies.org/>; Scarabino, 2003) en el género *Mytilaster* Monterosato, fue originariamente descrito en base a ejemplares coleccionados en Maldonado y Río de Janeiro. Nunca se lo volvió a citar para aguas uruguayas, en tanto existen numerosos registros para el litoral de Brasil (Ríos, 1994).

Una tercera especie, *B. rodriguezii* (d'Orbigny), está presente en las costas templado-cálidas del Atlántico Sur desde Río Grande do Sul (Brasil, ~32° S) hasta los golfos norpatagónicos (~43° S) (Scarabino et al., 2006; Trovant et al., 2013), rango que corresponde a la Provincia Biogeográfica Argentina (Balech y Ehrlich, 2008). Entre los 41° y 43° S se encuentra una zona de transición entre esta especie y *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) (Scarabino, 1977; Adami et al., 2013). Esta última, se distribuye desde el golfo San Matías hasta Tierra del Fuego en el Atlántico, y en el Pacífico, a lo largo de las costas de Chile y Perú (Bernard, 1983), abarcando las provincias biogeográficas Chileno-Peruana y Magallánica (Briggs y Bowen, 2012; su Fig. 1). Ha sido citada también para el sur de Ecuador y las Islas Galápagos, pero esos registros no están validados.

Una quinta especie muy distintiva, *B. granulatus* (Hanley), cuya distribución está bien establecida para la provincia biogeográfica Chileno-Peruana (templado-cálida), ha sido mencionada para el litoral patagónico argentino (Kelaher et al., 2007). Finalmente, *B. blakeanus* Melvill y Standen, fue descripta originalmente para las Islas Malvinas y citada ulteriormente en algunos estudios ecológicos para el litoral patagónico (Kelaher et al., 2007), pero su status es incierto.

Por lo general, los estudios taxonómicos de estas especies se han basado en la morfología de la valva, pero el alto grado de variabilidad fenotípica que presentan, arroja dudas sobre su utilidad como carácter de valor taxonómico. En base a un estudio morfogeométrico, Aguirre et al. (2006a) han sugerido que *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* serían sinónimos de *P. purpuratus*. Las diferencias diagnósticas propuestas para distinguirlos reflejarían simplemente variación clinal latitudinal. Algunos autores brasileños (e.g. Ríos, 1994), por su parte, consideran a *B. darwinianus* como sinónimo de la especie caribeña *B. exustus* (Linnaeus). Lee y Ó Foighil (2005), utilizando datos moleculares, encontraron que esta última especie nominal es en realidad un complejo de cinco especies crípticas distribuidas en el Caribe y el golfo de México, más dos especies geminadas en el Pacífico. No existiendo análisis genéticos que incluyan las especies nominales de Sudamérica su status permanece incierto.



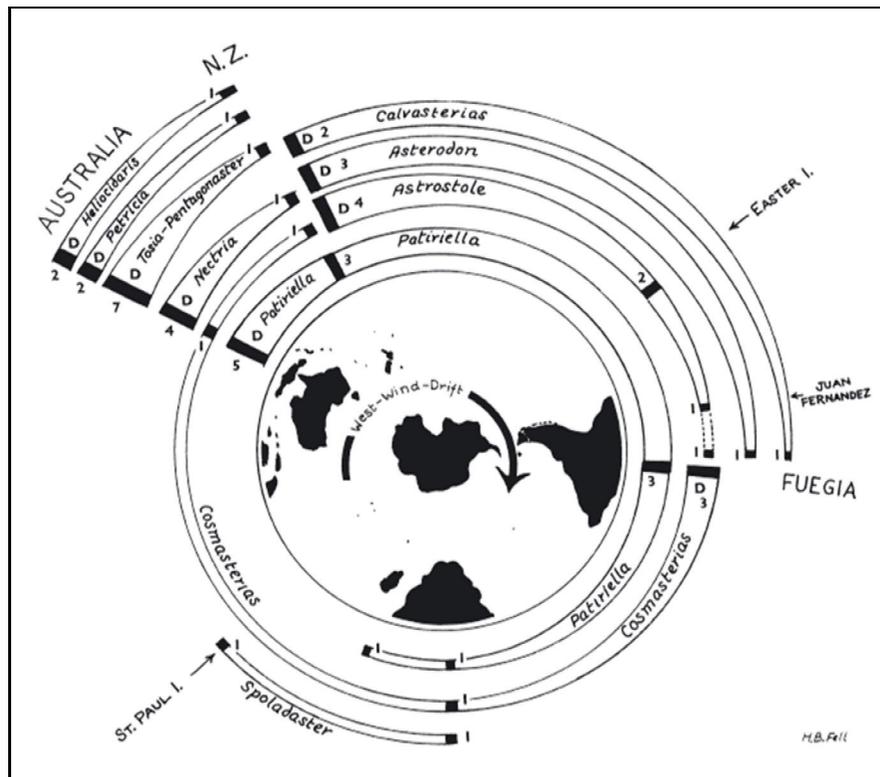
**Figura IG4.** Rango latitudinal de distribución de las especies de *Brachidontes* s.l. citadas en la bibliografía para América del Sur. Los límites de las provincias biogeográficas se indican con barras transversales celestes.

## Patrones y procesos

Los patrones de distribución más frecuentes invocados para explicar la distribución de los organismos marinos del Atlántico sudoccidental (ASO) son (1) dispersión a lo largo de la deriva de los vientos occidentales (*West Wind Drift*, WWD), (2) antitropicalidad, conexión transtropical con la región templado-cálida del Atlántico nor-occidental y (3) ancestría regional, evolución *in situ* a partir de formas ya presentes en la región en el Neógeno.

### *(1) Dispersión a lo largo de la WWD*

En años recientes ha habido una revitalización de las hipótesis dispersalistas para explicar patrones observados en la distribución de organismos marinos. El sistema que ha recibido mayor atención en este contexto es la WWD, que conecta una serie de sectores discontinuos en las regiones subantárticas y templadas del hemisferio sur (Waters, 2007; Fraser et al., 2013) (Fig. IG5). En tanto existe buena evidencia para esta hipótesis en el caso de organismos con gran capacidad dispersiva, como es el caso de algas que flotan a la deriva (e.g. *Macrocystis pirifera*, Macaya y Sucarello, 2010; *Durvillaea antarctica*, Fraser et al., 2010) y su fauna asociada (e.g. *Nacella* spp., González-Wevar et al., 2010), los mecanismos posibles son menos claros en otros casos. *Perumytilus purpuratus* es un candidato potencial para investigar esta hipótesis debido a que se asemeja en aspecto a *Austromytilus rostratus* de las costas de Tasmania y sur de Australia.



**Figura IG5.** Hipótesis de dispersión mediada por la deriva de los vientos occidentales (“*West Wind Drift*”) de equinodermos. Los números indican taxones descritos para la región y D representa el punto de origen de cada linaje (modificado de Waters, 2007).

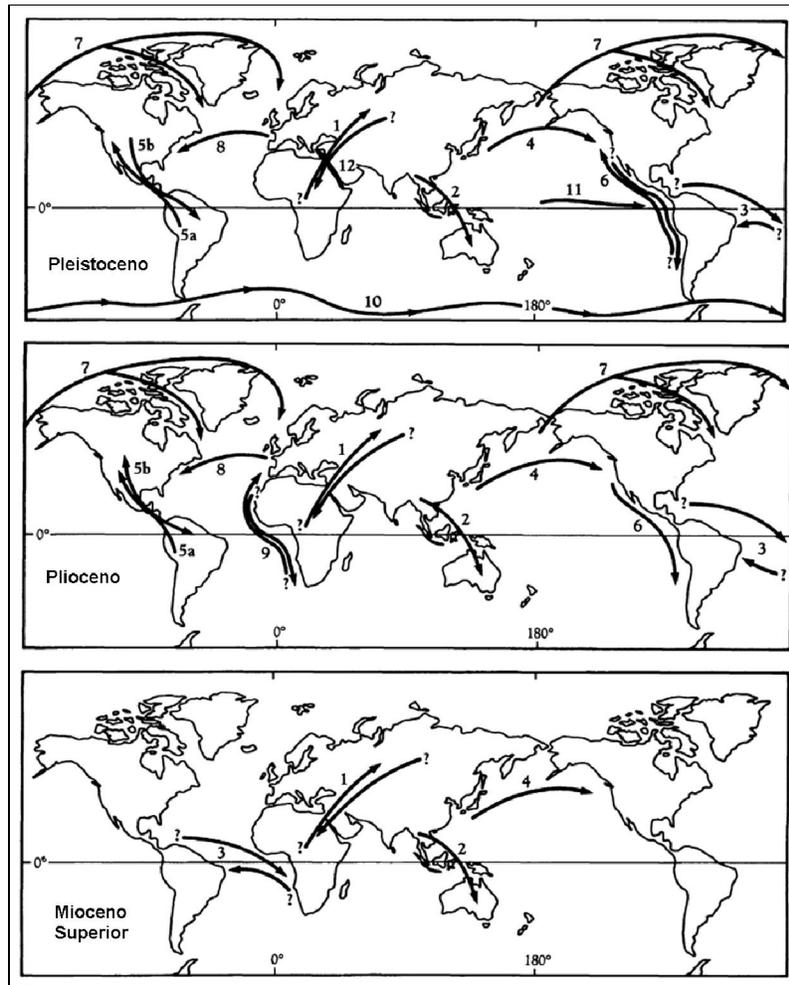
## (2) Antitropicalidad

Muchas especies marinas, o pares de especies estrechamente relacionadas entre sí, exhiben un patrón de distribución “antitropical” (Hubbs, 1952), discontinuidad latitudinal, con una interrupción centrada en la zona intertropical. Este es uno de los tipos más frecuentes de distribución geográfica disyunta (Lindberg, 1991) y ha sido objeto de gran interés para los biogeógrafos marinos.

Este tipo de distribución ha sido documentado en un gran número de taxones, incluyendo peces pelágicos y costeros (Stepien y Rosenblatt, 1996; Burridge y White, 2000; Leslie, 2001; Burridge, 2002; Mabuchi et al., 2004; Grant y Grant y Bowen, 2006; Halvorsen et al., 2012), moluscos (Jozefowicz y Ó Foighil, 1998; Koufopanou et al., 1999; Hilbish et al., 2000; Williams et al., 2003; Shilts et al., 2007), crustáceos (Tam et al., 1996; Santos y

Dincao, 2004; Goetze, 2005), briozoos (Schwaninger, 2008), equinodermos (Naughton et al., 2014), cnidarios (Vianna et al., 2003; Herrera et al., 2012) y elasmobranquios (Verisissimo et al., 2010). De todos estos, muy pocos fueron registrados en el océano Atlántico (Tam et al., 1996; Jozefowicz y Ó Foighil, 1998; Hilbish et al., 2000; Vianna et al., 2003; Santos y Dincao, 2004; Verisissimo et al., 2010). Vermeij (1991, Fig. IG6), por ejemplo, no menciona ningún intercambio biótico marino trans-tropical en esa región. La razón aparente es que las compilaciones de distribuciones geográficas a lo largo de las costas del Atlántico occidental usualmente ignoran el hiato intertropical. Un patrón típico indicado para muchos moluscos, por ejemplo, es un rango continuo desde Carolina del Norte hasta la Patagonia septentrional. Un examen preliminar de la información primaria utilizando la base de datos SWATL (J. Orensanz, com. pers.), sin embargo, indica que tal patrón es muy raro; prácticamente todos los casos putativos tienen un hiato intertropical. Una parte importante de los componentes de la fauna templado-cálida del Atlántico sud-occidental (la así llamada provincia Argentina, Balech y Ehrlich, 2008) tiene una “contraparte” en la Provincia Caroliniana (Carolina del Norte al golfo de México). Los miembros de un mismo par son a menudo clasificados como especies o subespecies diferentes por unos autores, y como una sola especie por otros. En bivalvos, solo unos pocos casos fueron investigados utilizando información genómica (Jozefowicz y Ó Foighil, 1998; Hilbish et al., 2000; Shilts et al., 2007).

Dos hipótesis generales han sido propuestas para explicar este fenómeno: dispersión y vicarianza (Koufopanou et al., 1999). La evidencia molecular y geológica es en general consistente con la primera, que postula dispersión a través de los trópicos durante los eventos de enfriamiento del Plio-Pleistoceno (Grant y Leslie, 2001; BurrIDGE, 2002). La hipotética dispersión trans-tropical estaría mediada por larvas pelágicas, transporte de microtalos vegetativos (Peters y Breeman, 1992), embalsados de algas flotantes (Thiel y Gutow, 2005), submergencia isotérmica o movimientos individuales.



**Figura IG6.** Mapa mundial donde se muestra los principales eventos de intercambio biótico durante el Mioceno Superior, Plioceno y Pleistoceno-Reciente. Intercambios simétricos son indicados con una flecha doble. Para los intercambios asimétricos, la dirección de invasión predominante es indicada por flechas simples. Los signos de preguntas indican incertezas sobre la direccionalidad del intercambio. Cuando se observan dos flechas y una posee un signo de interrogación en la base: intercambio corroborado solo en una dirección, el otro con incertezas. Cuando se observan dos flechas, ambas con signos de interrogación en la base: intercambio en ambas direcciones con incertezas. Notar que no se señala ningún intercambio marino en el Atlántico occidental (modificado de Vermej, 1991).

El tiempo y modo de los hipotéticos eventos de dispersión trans-tropical que habrían generado patrones antitropicales en el Atlántico occidental permanecen virtualmente inexplorados. Las especies de *Brachidontes* del Atlántico sudoccidental ofrecen al menos dos casos potenciales de antitropicalidad:

(1) El fenotipo de *B. darwinianus* (SE Brasil a Uruguay) se asemeja mucho al de *B. exustus* (Linnaeus) del golfo de México y el Caribe, al punto que algunos autores (e.g. Ríos,

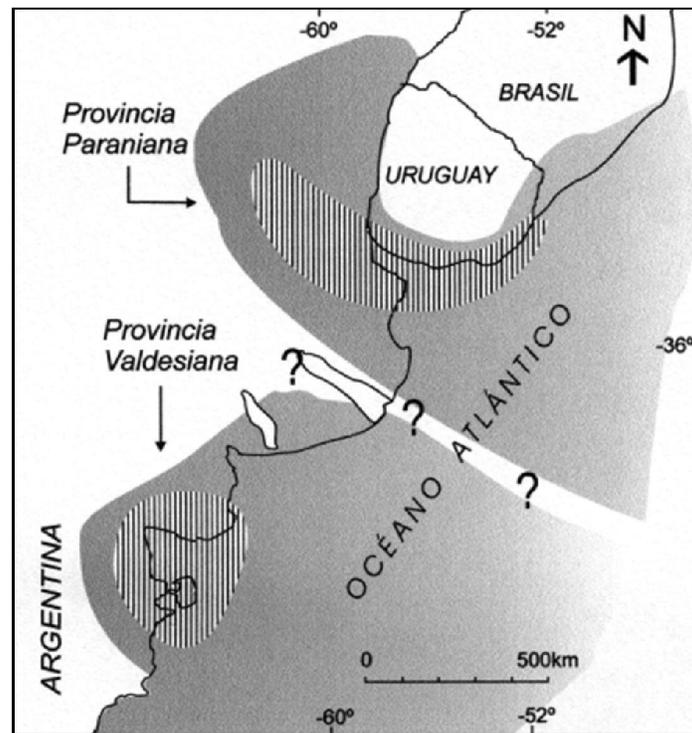
1994) los consideran sinónimos. Un estudio genético reciente de *B. exustus* mostró que esta “especie” es en realidad un complejo monofilético de cinco especies crípticas distribuidas en el Caribe y el golfo de México, mas dos vicariantes del Pacífico (Lee y Ó Foighil, 2005). No habiendo estudios genómicos sobre *B. darwinianus*, su relación con el “complejo *exustus*” (al que corresponde su fenotipo) no está resuelta.

(2) *B. solisianus* ha sido citada también para localidades ubicadas al norte de la zona intertropical (Ríos, 1994), aunque el status de esos registros requiere mayor escrutinio. De confirmarse, este patrón constituiría un caso de antitropicalidad.

La reconstrucción filogenética permitirá inferir acerca de las relaciones entre los pares y estimar, cuando correspondiera, el tiempo de divergencia entre ambos, el cual permitirá dar soporte a distintas hipótesis, incluyéndose la dispersión a través de los trópicos durante los eventos de enfriamiento del Plio-Pleistoceno (Grant y Leslie, 2001; Burridge, 2002).

### **(3) Ancestría regional**

Al menos algunas especies recientes podrían haber evolucionado regionalmente a partir de las faunas del Neógeno. Más particularmente ello podría aplicarse a especies templado-cálidas relacionadas con formas presentes en las provincias Paraniana y Valdesiana (Mioceno) (Fig. IG7). El caso más representativo es el de las vieras del género *Aequipecten* Fischer, 1887. *Aequipecten tehuelchus* (d’Orbigny, 1846) está presente desde el Mioceno (Provincia Valdesiana, Formación Puerto Madryn) con representantes actuales distribuidos desde Río de Janeiro hasta el área del golfo Nuevo en Patagonia (del Río, 1991; Pérez et al., 2011). Este patrón podría estar representado por la especie *Brachidontes rodriguezii* de la provincia Biogeográfica Argentina, la cual estaría estrechamente emparentada con fósiles de la Provincia Paraniana, tanto que estos fueron clasificados como subespecie, *B. lepida* (Philippi).



**Figura IG7.** Provincias de Moluscos durante el Mioceno tardío en el Atlántico Sudoccidental. Rayado: extensión corroborada en el campo. Gris: extensión hipotética (modificado de Martínez y del Río, 2002a).

### Relaciones filogenéticas de los Brachidontinae (Mytilidae)

Existe buen acuerdo acerca de la monofilia de los Mytilidae (Matsumoto, 2003; Plazzi et al., 2011). Sin embargo, si bien la filogenia de los mitílidos ha sido tratada en varias contribuciones recientes (Distel, 2000; Owada y Hoeksema, 2011), está lejos de ser resuelta. A partir de análisis moleculares han sido propuestas, con soporte variable, distintas particiones de la familia. Huber (2010) reconoció diez subfamilias, siendo Brachidontinae Nordsieck una de ellas. Esta subfamilia incluye siete géneros nominales retenidos como válidos por al menos algunos autores contemporáneos: *Brachidontes* Swainson, *Hormomya* Morch, *Mytilaster* Monterosato, *Perumytilus* Olsson, *Austromytilus* Laseron, *Geukensia* van de Poel e *Ischadium* Jukes-Browne. Los estudios basados en información molecular (Lee y Ó Foighil, 2005; Goto et al., 2011) han demostrado una estrecha relación entre *Ischadium* y *Geukensia* (este último conservado entre los Brachidontinae por Huber, 2010).

La evaluación de hipótesis filogeográficas utilizando las especies de *Brachidontes* s.l. requiere una revisión previa de las relaciones entre los géneros de los Brachidontinae.

### **Objetivo general**

Contribuir a documentar los patrones filogeográficos en el Atlántico occidental utilizando como caso de estudio los mejillines del género *Brachidontes* s.l.

### **Objetivos específicos**

- (a) Resolver el status de las especies del complejo *Brachidontes* s.l. del sur de Sudamérica (Brasil, Uruguay, Argentina y Chile).
- (b) Investigar los patrones filogeográficos considerados más importantes en el Atlántico sudoccidental (dispersión a lo largo de la WWD, antitropicalidad y ancestría regional) utilizando a los mejillines (Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae) como caso de estudio, en base a técnicas moleculares y morfométricas.
- (c) Asociado con del objetivo anterior, resolver la filogenia de los Brachidontinae (Mytilidae) utilizando información molecular.

### **Hipótesis**

- (i) *Perumytilus purpuratus* (Sudamérica) y *Austromytilus rostratus* (Australia) son especies hermanas, sugiriendo un patrón de dispersión a lo largo de la WWD.
- (ii) *Brachidontes darwinianus* (Brasil y Uruguay) y *B. solisianus* (Brasil) forman un clado con el “complejo *exustus*” (*sensu* Lee y Ó Foighil, 2005) (golfo de México y el Caribe), constituyendo un patrón antitropical.
- (iii) *Brachidontes rodriguezii* (Reciente, Provincia Biogeográfica Argentina) está estrechamente relacionada con *B. lepida* (Mioceno Medio-Superior, Provincia Paraniana), a partir de la que evolucionó en la región.

## Descripción del contenido de los capítulos

**Capítulo 1<sup>2</sup>.** En este capítulo, se investiga el status de las especies de la costa atlántica de Argentina y Uruguay, *B. darwinianus*, *B. rodriguezii*, *B. purpuratus*<sup>3</sup> y *B. blakeanus*, esclareciendo la confusión existente en la literatura, basada exclusivamente en caracteres morfológicos de la valva, los cuales poseen gran plasticidad fenotípica. Asimismo, se estudia la diversidad genética y relaciones filogenéticas de estas especies.

**Capítulo 2<sup>4</sup>.** En este capítulo, se investigan las relaciones filogenéticas y filogeografía de *Perumytilus purpuratus* en la costa de Argentina y Chile, así como también, la historia demográfica y la diversidad genética de esta especie.

- ¿Se diferencian las poblaciones de la costa Pacífica y de la costa Atlántica?
- Los resultados indican una separación temprana entre *P. purpuratus* y el resto de las especies de *Brachidontes* s.s., tal vez justificando su separación en el género *Perumytilus* Olsson. ¿Cuáles son los grupos filogenéticamente relacionados con *Perumytilus*?

**Capítulo 3.** En este capítulo, se estudian las relaciones filogenéticas de las especies de la costa templado-cálida del Atlántico Sudoccidental, sus historias demográficas y diversidad genética, así como también los procesos históricos y/o ecológicos que originaron la presente distribución de estas especies.

**Capítulo 4.** En este último capítulo, se analiza la relación de la especie *B. rodriguezii* con formas fósiles afines observadas en la región utilizando técnicas de morfometría geométrica.

- ¿Hasta que punto los fósiles de mejillines citados para la región están relacionados con *Brachidontes rodriguezii*?

**Aclaraciones:** (i) La metodología que se repite entre capítulos se detalla sólo en el primero que aparece y luego, es remitida a la sección correspondiente; (ii) la bibliografía de todos los capítulos se lista al final de la tesis.

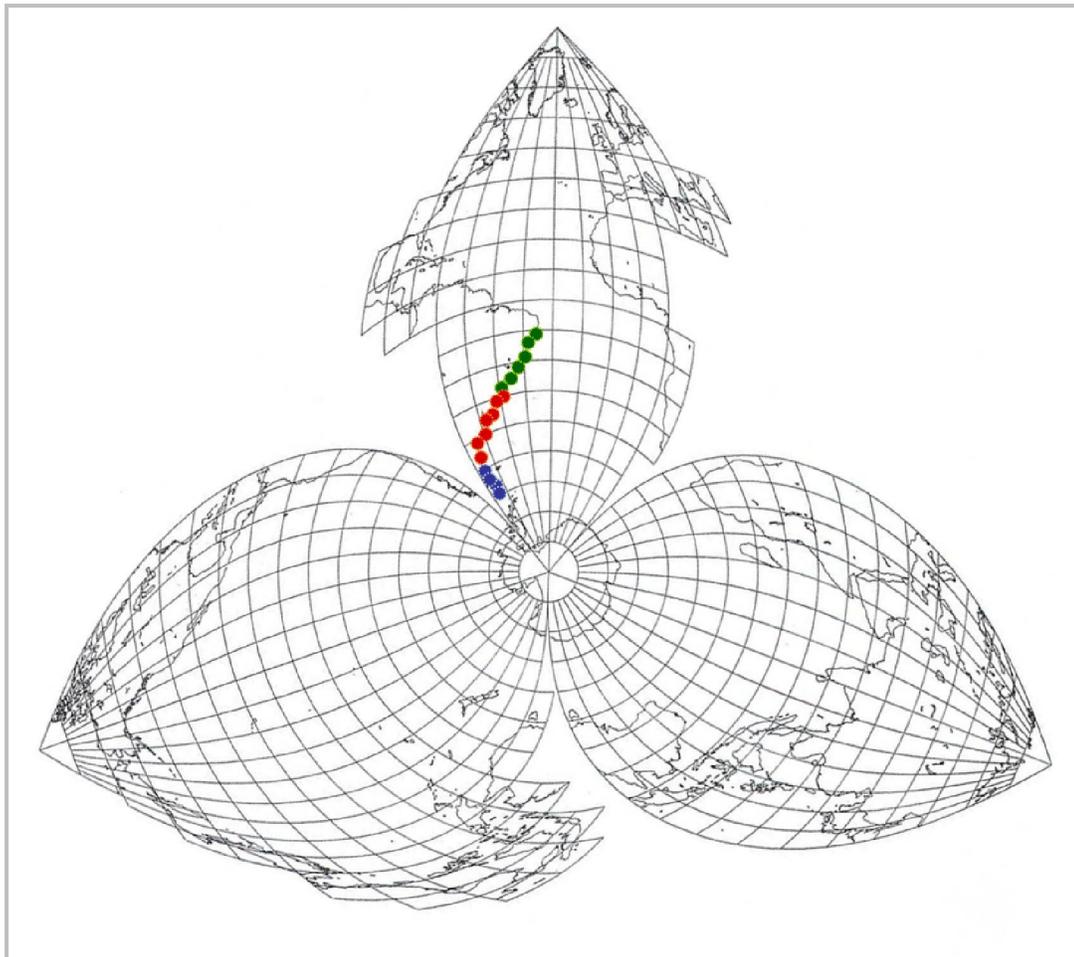
---

<sup>2</sup> Publicado: Trovant, B., Ruzzante, D.E., Basso, N.G., Orensanz, J.M., 2013. Distinctness, phylogenetic relations and biogeography of intertidal mussels (*Brachidontes*, Mytilidae) from the south-western Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 1843–1855.

<sup>3</sup> En el primer capítulo se utilizó *Brachidontes purpuratus* siguiendo a Adami et al. (2013). Posteriormente, a partir de los resultados obtenidos, se consideró *Perumytilus* como género válido.

<sup>4</sup> Publicado: Trovant, B., Orensanz, J.M., Ruzzante, D.E., Stotz, W., Basso, N.E., 2015 (online 2014). Scorched mussels (Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae) from the temperate coasts of South America: Phylogenetic relationships, trans-Pacific connections and the footprints of Quaternary glaciations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82, 60-74.

**CAPÍTULO 1.** Diversidad, filogenia y biogeografía de mejillines  
(Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae) de la costa de Argentina y  
Uruguay\*



\* El contenido de este capítulo ha sido publicado como: Trovant, B., Ruzzante, D.E., Basso, N.G., Orensanz, J.M., 2013. Distinctness, phylogenetic relations and biogeography of intertidal mussels (*Brachidontes*, Mytilidae) from the south-western Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 1843–1855.

---

**RESUMEN**

Las comunidades intermareales de las áreas rocosas a lo largo de las costas templado-cálidas y templado-frías del Atlántico sudoccidental están con frecuencia dominadas por pequeños “mejillines” del género *Brachidontes* s.l. (Mytilidae). A pesar de su significancia ecológica, el status de las especies presentes en la región permanece sin clarificar. Los estudios taxonómicos se han basado principalmente en la morfología de la valva, pero la gran variabilidad fenotípica ha llevado a mucha confusión. Utilizando genes mitocondriales y nucleares (COI ADNmt, 28S y ITS1 ADNr) de muestras provenientes de 9 localidades distribuidas en Uruguay y Argentina, se confirmó la presencia de tres especies en el Atlántico sudoccidental: *Brachidontes darwinianus* y *B. rodriguezii* en el sector templado-cálido y *B. purpuratus*<sup>5</sup> en el sector templado-frío. Las dos últimas especies coexisten en el intermareal a lo largo de la zona de transición (41° - 43° S). Las filogenias basadas en los genes mitocondriales y nucleares indican una divergencia temprana de *B. purpuratus*. En el caso de *B. rodriguezii*, la diferenciación genética intraespecífica, un registro fósil de formas fenotípicamente relacionadas que se remonta al Mioceno superior y una posición basal en la filogenia del gen mitocondrial COI, sugieren la hipótesis de que esta especie deriva de una población local con una larga historia de presencia en la región templado-cálida del Atlántico sudoccidental. El status del resto de las especies reportadas para la región es cuestionable; *Brachidontes blakeanus* fue reclasificada como *Philobrya blakeana* (Melvill y Standen, 1914) *comb. nov.* (Familia Philobryidae) y los registros de *B. granulatus* de la Patagonia argentina presumiblemente corresponden a otra especie de mitílido. Mientras que las poblaciones de mejillines intermareales del Atlántico sudoccidental son ecológicamente similares en apariencia, su ensamblaje involucra componentes claramente diferenciados en función de su biogeografía histórica y filogenia.

---

<sup>5</sup> Siguiendo a Huber (2010) y Adami et al. (2013) en este capítulo se ubica a *Modiola purpurata* Lamarck 1819 en el género *Brachidontes*. La posición genérica de esta especie es reconsiderada en el Capítulo 2, en el contexto de la filogenia de los Brachidontinae.

## INTRODUCCIÓN

A lo largo de las costas rocosas del Atlántico Sudoccidental, las poblaciones de mejillines están caracterizados por su apariencia uniforme a pesar de los cambios en las especies dominantes. Seis especies de mejillines han sido citadas para el Atlántico sudoccidental. *Brachidontes darwinianus* (d'Orbigny, 1842) fue descrita a partir de ejemplares colectados en Río de Janeiro (~ 22° 56' S, Brasil), Maldonado (~ 34° 55' S, Uruguay) y Bahía Rosas (= Ensenada de Ros, 41° 09' S, norte de la Patagonia Argentina). *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1842), descrita inicialmente sobre la base de especímenes colectados por Alcide d'Orbigny (1842, 1846) en Bahía San Blas (norte de la Patagonia Argentina, ~ 40° 26' S), se distribuye desde Río Grande (sur de Brasil, 32° 10' S) hasta golfo Nuevo, 43° S). En su extremo sur de su distribución, esta especie coexiste con *Brachidontes purpuratus* (Lamarck, 1819), cuya distribución se extiende a lo largo de dos provincias biogeográficas: la Provincia Magallánica, templado-fría (sur de Sudamérica), y la Provincia Chileno-Peruana, templado-cálida, siendo la única especie del género que se extiende en aguas templado-frías.

Además de estas tres especies, otras han sido reportadas para la región de interés: *B. solisianus* (d'Orbigny, 1842), *B. blakeanus* Melvill y Standen 1914, y *B. granulatus* (Hanley, 1843). El status de *B. solisianus* es considerado en el capítulo 3. *Brachidontes blakeanus*, una especie de status dudoso, fue descrita en base a muestras colectadas en el submareal de Roy Cove (Islas Malvinas), y más tarde reportada en algunos estudios ecológicos (Ríos et al., 2003; Kelaher et al., 2007). En cuanto a *B. granulatus*, una especie típica de la provincia Chileno-Peruana, un reporte para el intermareal rocoso de Patagonia (Kelaher et al., 2007) no ha sido debidamente validado.

En el pasado estas especies han sido separadas únicamente sobre la base de los caracteres de la valva. La alta variabilidad fenotípica y la homoplasia han dado lugar a una gran confusión. Estudios moleculares recientes clarificaron la sistemática y filogeografía de las especies de *Brachidontes* del Caribe, el golfo de México y el litoral Pacífico tropical de Panamá y México. Lee y Ó Foighil (2004, 2005) encontraron que lo que se consideraba generalmente una sola especie, *B. exustus* (Linnaeus, 1758), es en realidad un complejo de cinco especies en el golfo de México y el Mar Caribe, más dos especies geminadas (*sensu* Jordan, 1908) en la costa Pacífica de América Central. En el caso de las especies del Atlántico sudoccidental las opiniones son contradictorias. Aguirre et al. (2006a), basados en la

aplicación de técnicas morfométricas utilizando proyecciones planas del contorno de la valva, llegaron a la conclusión de que las tres especies son indistinguibles; en consecuencia, *B. rodriguezii* y *B. darwinianus* serían sinónimos de *B. purpuratus*. Sin embargo, estudios morfológicos más recientes pusieron de relieve caracteres que aparentemente permiten la diferenciación de *B. rodriguezii* y *B. purpuratus* (van der Molen et al., 2012, Adami et al., 2013). Ríos (1994) y otros autores brasileros después de él, han considerado a *B. darwinianus* como un sinónimo menor de *B. exustus* que, como se mencionó anteriormente, es un complejo de especies crípticas. Aunque muchos autores (e.g., Coan y Valentich-Scott, 2012) ubican a *B. purpuratus* en el género monotípico *Perumytilus* Olsson, 1961, otros lo conservan en *Brachidontes* s.l. (e.g., Zelaya 2009; Huber, 2010; Adami et al., 2013). En este capítulo se mantiene el segundo de esos criterios; las relaciones filogenéticas entre *Brachidontes* y géneros nominales relacionados son abordadas en el capítulo 2.

A lo largo de la costa del Atlántico sudoccidental, existe evidencia de reemplazos entre especies nominales de *Brachidontes* asociados a gradientes ambientales (Fig. 1.1). En primer lugar, hay una sustitución gradual latitudinal de *B. purpuratus* (Lamarck, 1819), por *B. rodriguezii* (d'Orbigny, 1842) entre 43° y 41° S (norte de la Patagonia Argentina) (Scarabino, 1977). En segundo lugar, *B. rodriguezii* es reemplazada por la especie estuarina *B. darwinianus* (d'Orbigny, 1842) a lo largo de la costa norte del estuario del Río de la Plata, de este a oeste, probablemente en relación con el gradiente de salinidad (Scarabino et al., 2006).

El objetivo de este capítulo es resolver el status de tres especies nominales de *Brachidontes* del Atlántico sudoccidental. La hipótesis planteada es que *Brachidontes darwinianus*, *B. rodriguezii* y *B. purpuratus* son especies distinguibles, y se utiliza información molecular para validarla. En base a esos resultados, se discuten sus patrones de distribución a la luz de las ideas actuales sobre la biogeografía de la región. Finalmente, se consideran el status de *B. blakeanus* y los registros de *B. granulatus* para las costas patagónicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

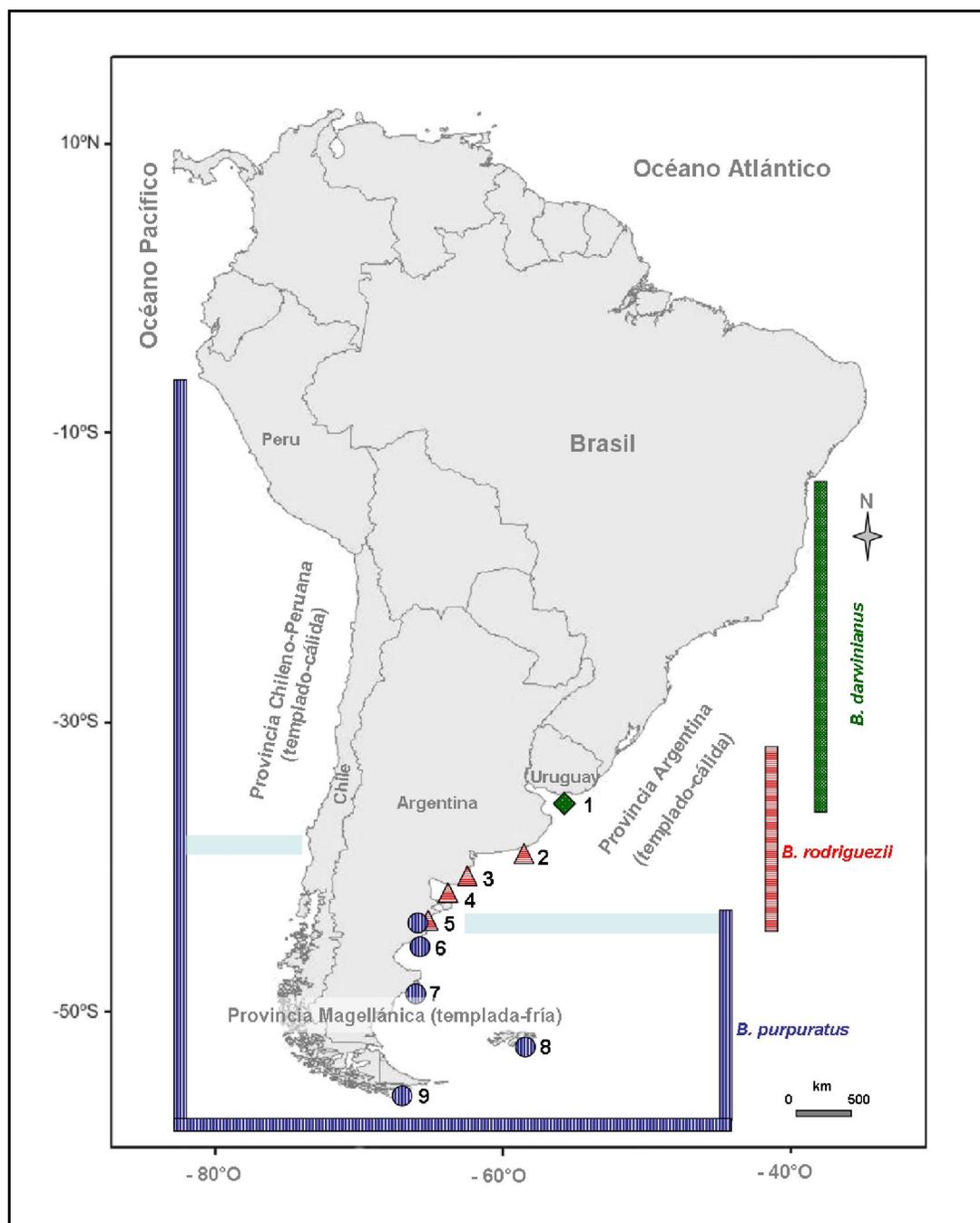
### Muestras

Se colectaron especímenes atribuibles a las especies nominales *B. darwinianus*, *B. rodriguezii* y *B. purpuratus* en 9 localidades del Atlántico Sudoccidental, desde Montevideo (Uruguay) hasta el Canal de Beagle (Tierra del Fuego) y las Islas Malvinas (Tabla 1.1). Las muestras fueron preservadas en etanol 95%. Las localidades de muestreo de Punta Canario (~34° 55' S, Uruguay, Fig. 1.1) y de Bahía San Blas (40° 32' S, Argentina, Fig. 1.1) son cercanas a las localidades tipo de *B. darwinianus* y *B. rodriguezii*, respectivamente.

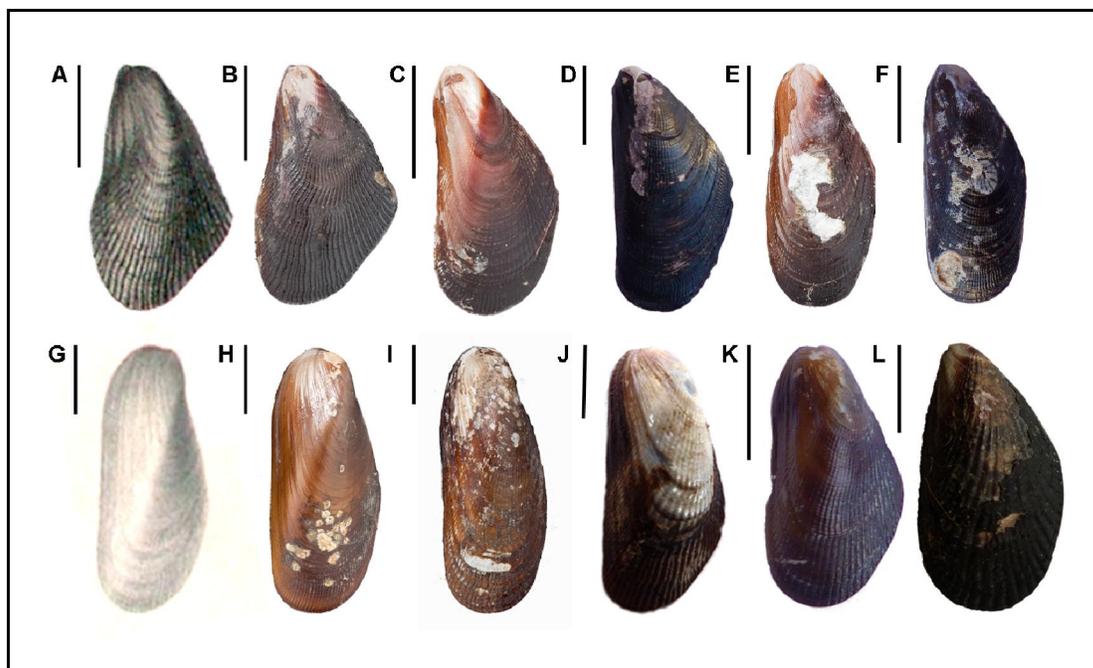
Con el fin de respaldar la asignación basada en caracteres fenotípicos de la valva de los especímenes utilizados en nuestro estudio genético sobre las especies nominales, se requirieron imágenes de alta calidad de los materiales tipo de *B. darwinianus*, *B. rodriguezii* (Fig. 1.2) y *B. solisianus*, depositados en el Museo Británico de Historia Natural, y de *B. blakeanus*, depositado en las colecciones del Museo de Manchester (Fig. 1.7). El material tipo de *B. purpuratus* parece haberse perdido (Dr. Guido Pastorino, comunicación personal). La separación de *B. rodriguezii* y *B. purpuratus* fue respaldada, además, con los resultados de recientes estudios morfológicos y morfométricos (van der Molen et al., 2012; Adami et al., 2013). Las muestras seleccionadas para la secuenciación incluyeron juveniles de *B. rodriguezii* de Bahía Rosas (41° 01' S, Fig. 1.2), que se asemejan superficialmente a los adultos de *B. darwinianus*; d'Orbigny indicó la presencia de esta última en Bahía Rosas. Se secuenciaron también especímenes provenientes de la región en la que las distribuciones de *B. purpuratus* y *B. rodriguezii* se solapan, que poseyeran valvas erosionadas o con formas atípicas, candidatos obvios a ser erróneamente clasificados.

**Tabla 1.1.** Sitios de muestreo, temperatura media mensual mínima y máxima superficial del agua de mar (TSM, mín - máx), y número de muestras secuenciadas por gen. AR: Argentina, UY: Uruguay.

Especies Nominales	Localidad	Latitud S	Longitud O	TSM (°C) mín-máx	Secuencias		
					COI ADNmt	28S rADNr	ITS1 ADNr
<i>Brachidontes darwinianus</i>	1 Punta Canario (Montevideo, UY)	34° 55'	56° 09'	10,5 - 23,6	8	2	1
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	2 Santa Clara del Mar (AR)	37° 50'	57° 30'	9,3 - 21,3	6	2	2
	3 Bahía San Blas (AR)	40° 32'	62° 15'	7,5 - 22,6	8	5	2
	4 Bahía Rosas (AR)	41° 01'	64° 06'	8,7 - 19,7	9	2	1
	5 Puerto Madryn (AR)	42° 46'	65° 00'	8,7 - 17,9	8	2	2
<i>Brachidontes purpuratus</i>	5 Puerto Madryn (AR)	42° 46'	65° 00'	8,7 - 17,9	4	4	2
	6 Caleta Carolina (AR)	44° 47'	65° 43'	7,3 - 16,6	9	7	2
	7 Puerto Deseado (AR)	47° 44'	65° 53'	3,8 - 14,4	8	1	2
	8 Surfer Bay, Islas Malvinas (AR)	51° 41'	57° 46'	2,4 - 8,0	10	2	2
	9 Bahía Ensenada (Canal de Beagle, Tierra del Fuego, AR)	54° 49'	68° 15'	2,6 - 10,8	8	1	2
				<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>28</b>	<b>18</b>



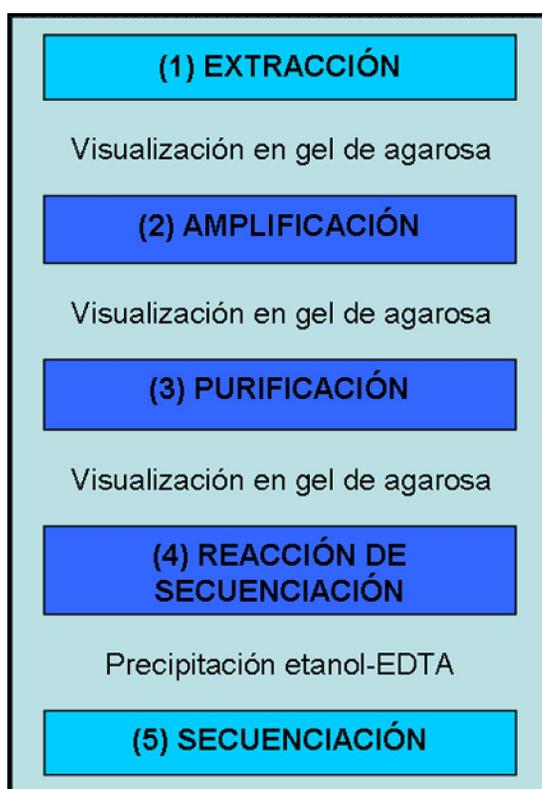
**Figura 1.1.** Rango latitudinal de distribución de las especies de *Brachidontes* s.l. del Atlántico sudoccidental estudiadas en este capítulo (barras) y sitios de muestreo (símbolos); (◆) *B. darwinianus*, (▲) *B. rodriguezii*, (●) *B. purpuratus*. Los números indican las localidades: 1: Punta Canario, 2: Santa Clara del Mar, 3: Bahía San Blas, 4: Bahía Rosas, 5: Puerto Madryn, 6: Caleta Carolina, 7: Puerto Deseado, 8: Surfer Bay, 9: Bahía Ensenada (ver Tabla 1.1 para más información).



**Figura 1.2.** Ejemplares secuenciados y materiales tipo. (A-F): *B. darwinianus*; (A, B) sintipo ilustrado por d'Orbigny (1842): ilustración original (A) y presumiblemente el mismo ejemplar conservado en el Museo Británico (B); (C, E) sintipos, (D, F) ejemplares secuenciados de Punta Canario (Montevideo, Uruguay). (G-K) *B. rodriguezii*; (G) ilustración de d'Orbigny (1842), (H) presumiblemente el mismo individuo, designado como lectotipo, (I) paralectotipo; (J-K) ejemplares secuenciados, (J) Bahía San Blas (localidad tipo), (K) Bahía Rosas; (L) *B. purpuratus*, ejemplar secuenciado de Puerto Deseado. Barra: 1 cm.

## Obtención de ADN: Extracción, amplificación, secuenciación y alineamiento

La secuencia de pasos para la obtención de ADN incluyó las siguientes etapas: extracción del ADN genómico y posteriormente, amplificación, purificación y secuenciación del fragmento de interés (Fig. 1.3).



**Figura 1.3.** Pasos para la obtención de ADN.

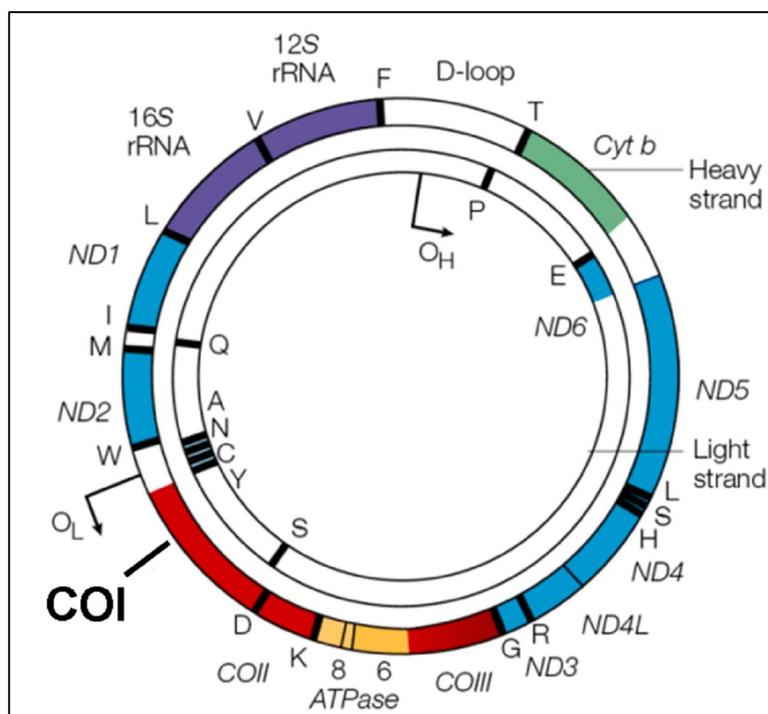
La extracción de ADN se realizó a partir del músculo aductor posterior utilizando principalmente el protocolo de fenol-cloroformo (modificado a partir de Sambrook et al., 1989) y el protocolo de sales (Aljanabi y Martínez, 1997) en los casos en los que el primero no diera buenos resultados.

Los pasos de extracción se detallan a continuación:

- 1- Colocar un pequeño fragmento de tejido en un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
- 2- Agregar 500  $\mu$ l de buffer de lisis + 10-15  $\mu$ l de proteinasa K (1 mg/ml).
- 3- Incubar a 56° C toda la noche.
- 4- Centrifugar 15 min a 15000 rpm.
- 5- Tomar 500  $\mu$ l del sobrenadante y poner en nuevo Eppendorf.
- 6- Método de extracción con fenol-cloroformo.** Agregar 250  $\mu$ l de fenol y 250  $\mu$ l de cloroformo-isoamílico, mezclar suavemente.
- 6- Método de extracción salina.** Agregar 300  $\mu$ l de NaCl (5M), agitar.
- 7- Centrifugar a 15 min a 15000 rpm.
- 8 - Tomar sobrenadante (500-600  $\mu$ l) y poner en nuevo Eppendorf.
- 9- Agregar igual volumen de isopropanol absoluto a - 20°C.
- 10- Mezclar suavemente por inversión.
- 11- Colocar a -20°C como mínimo por 2 hs.
- 12- Centrifugar 15 min a 15000 rpm y descartar sobrenadante.
- 13- Agregar 500  $\mu$ l de etanol 70% y dejar 5 min.
- 14- Centrifugar 15 min a 15000 rpm y descartar sobrenadante.
- 15- Para remover las trazas de alcohol, secar 20-30 min en estufa a 37°C.
- 16- Dependiendo de la cantidad de pelet observada, resuspender desde 30-50  $\mu$ l de buffer TE.
- 17- Conservar a 4°C durante 12 hs para resuspender el ADN.

Se amplificaron y secuenciaron tres genes de los taxa bajo estudio, uno mitocondrial y dos nucleares (COI ADNmt, 28S e ITS1 ADNr). La razón por la cual se eligieron estos genes fue que se disponía de gran cantidad de secuencias de especies del género en la base de datos de GenBank, provenientes de estudios previos realizados en el golfo de México, el Caribe y las costas pacíficas de México y Panamá (Lee y Ó Foighil, 2004, 2005). Por otra parte, la forma más adecuada de probar si una genealogía de ADNmt refleja correctamente la historia, es evaluando su concordancia con genealogías inferidas con regiones de ADN nuclear (Vázquez-Domínguez et al., 2009).

Entre las características moleculares que hacen especial al ADN mitocondrial están que es una molécula circular covalentemente cerrada, de tamaño pequeño (*ca.* 16-20 kilobases, Fig. 1.4), conformada por un total de 37 genes (13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia) (Brown, 1985). Tiene una alta tasa de evolución (sustitución) a nivel de secuencias de nucleótidos, nula recombinación, gran variación intraespecífica y, lo más importante, su herencia estrictamente materna con algunas excepciones. Dentro de estas excepciones, se encuentran algunos bivalvos mitílidos, los cuales presentan una forma única de herencia mitocondrial, también conocida como “doble herencia uniparental” (DUI, sus siglas en inglés) (Zouros et al., 1992; Skibinski et al., 1994). En este caso, el genoma mitocondrial de herencia materna está presente en los óvulos y en los tejidos somáticos de los individuos de ambos sexos, mientras que el genoma mitocondrial heredado del padre aparece en la línea germinal masculina (Rawson y Hilbish, 1995). El ADNmt paterno se replica preferentemente en la gónada (Skibinski et al., 1994b), aunque existen algunas excepciones (Garrido-Ramos et al., 1998; Kyriakou et al., 2010). Este fenómeno se ha encontrado en algunas especies de *Brachidontes*, pero no en otras (Lee y Ó Foighil, 2004; Terranova et al., 2007). Tomando ADN del músculo se espera que la infiltración por tejido germinal sea poco probable, por lo que el ADN estaría dominado por mitocondrias de herencia materna, minimizándose así los posibles problemas asociados con la heteroplasmia, independientemente del sexo del mejillín muestreado, que a veces es difícil de determinar (Lee y Ó Foighil, 2004).



**Figura 1.4.** Esquema del ADN mitocondrial donde se indica la ubicación del gen utilizado, la citocromo oxidasa I, COI (modificado de Taylor et al., 2005).

El ADN ribosómico (ADNr) es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas que codifica ARN ribosómico. Estas secuencias regulan la transcripción y copia del ADN. Las unidades de transcripción del ARN ribosómico se agrupan en tándem (Fig. 1.5). El bajo nivel de polimorfismo en la unidad de transcripción de ADNr permite la caracterización de las especies usando sólo unos pocos ejemplares y hace que este ADN sea útil para la comparación interespecífica. Además, las repeticiones de las diferentes regiones de codificación del ADNr muestran distintas tasas de evolución. Como resultado de ello, este ADN puede proporcionar información sobre casi cualquier nivel sistemático (Hillis y Dixon, 1991).

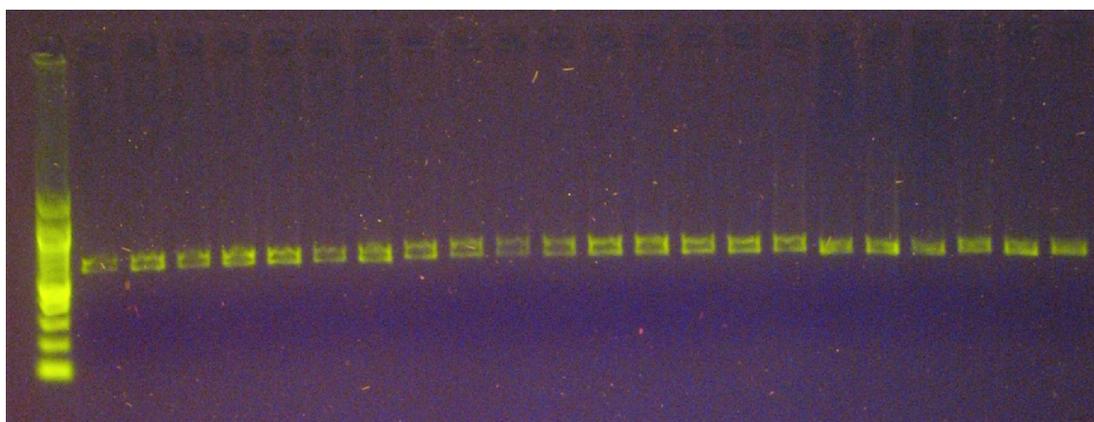


**Figura 1.5.** Esquema del complejo de genes ribosomales nucleares donde se indica la ubicación de los genes utilizados, el espaciador interno de transcripción nuclear ribosomal (ITS1) y el dominio D1-D3 de la subunidad grande 28S (LSU, sus siglas en inglés).

La subunidad I de la citocromo oxidasa c (COI, Fig. 1.4) se amplificó utilizando iniciadores (“*primers*”) tomados de la bibliografía, así como también algunos diseñados como parte de este estudio (para más detalle ver Tabla 1.2 y sección Diseño de iniciadores), y se obtuvo una porción de 560 nucleótidos (nt) (largo de la matriz alineada). Además, se amplificaron dos segmentos del grupo de genes ribosomales nucleares (Fig. 1.5); [i] la subunidad nuclear grande (28S ADN<sub>r</sub>), que abarca el dominio 2 y parte del dominio 3, utilizando los iniciadores D23F y D6R (Park y Ó Foighil, 2000, Tabla 1.2); y [ii] el espaciador interno de transcripción nuclear ribosomal I (ITS1 ADN<sub>r</sub>), utilizando los iniciadores que se unen a las regiones flanqueantes 18S y 5.8S (White et al., 1996, Tabla 1.2), obteniéndose fragmentos de 709 nt y 563 nt (largo de la matriz alineada), respectivamente. Para amplificar los genes se utilizó Tag polimerasa (Bio Básica Inc., Canadá). El protocolo utilizado incluyó una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C durante 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 45 seg, una temperatura de unión (“*annealing*”) de los iniciadores de 45°C durante 1 min para el COI y 52°C para el 28S e ITS1 ADN<sub>r</sub>, 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C durante 10 min. Luego de la extracción y la amplificación, el ADN se visualizó mediante transiluminación UV en geles de agarosa al 1 % teñidos con gel verde (“*gel green*”, BIOTUM) (Fig. 1.6). Las extracciones y amplificaciones de ADN de las muestras se realizaron en el laboratorio *Gene Probe* de la Universidad de Dalhousie (Nueva Escocia, Canadá) y en el Laboratorio de Biología Molecular (LABSA, CENPAT), mientras que la purificación de productos de PCR y la secuenciación de ambas cadenas de ADN se llevaron a cabo en Macrogen Inc. (Maryland, EE.UU.) y en el laboratorio de Biología Molecular del CENPAT utilizando los mismos iniciadores que en la amplificación. En este último, la purificación se llevó a cabo por medio de un sistema de Millipore Multiscreen y la secuenciación en un Analizador Genético ABI 3130 (Applied Biosystems).

**Tabla 1.2.** Lista de Iniciadores utilizados en este estudio para los genes COI ADNmt, 28S e ITS1 ADNr.

Gen	Nombre	Secuencia 5'--3'	Referencia
COI	LCO1490	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	Folmer et al., 1994
	HCO2198	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	Folmer et al., 1994
	LepF1	ATT CAA CCA ATC ATA AAG ATA TTG G	Hajibabaei et al., 2006
	LepR1	TAA ACT TCT GGA TGT CCA AAA AAT CA	Hajibabaei et al., 2006
	COFa	AAT GTT TGG TAT ATG AAG	Diseñados en este estudio
	CORa	ATC TCC GCC TCC TAT WGG ATC	Diseñados en este estudio
28S	D23F	GAG AGT TCA AGA GTA CGT G	Park y Ó Foighil, 2000
	D6R	CCA GCT ATC CTG AGG GAA ACT TCG	Park y Ó Foighil, 2000
ITS1	ITS1F	TAA CAA GGT TTC CGT AGG TG	White et al., 1990
	ITS1R	AGC TRG CTG CGT TCT TCA TCG A	White et al., 1990

**Figura 1.6.** Gel de agarosa donde se observa una amplificación de ADN. En la primera calle se ve el marcador de tamaño molecular ("ladder") de 100 -1000 pb.

Cuando fue posible se secuenciaron diez especímenes por localidad para el gen mitocondrial COI y dos por localidad para los genes nucleares 28S e ITS1 ADNr. Las secuencias de ADN fueron editadas con CodonCode Aligner v.2.0.4 (CodonCode Dedham, MA) y alineadas utilizando los parámetros por defecto con Clustal X (Thompson et al., 1997), y luego ajustado manualmente cuando fue necesario. No se detectaron indeles o codones de parada en las secuencias. A partir del marcador mitocondrial (COI) y los dos marcadores nucleares (28S e ITS1 DNAr) se obtuvo un total de 124 secuencias de las especies nominales *B. darwinianus*, *B. rodriguezii* y *B. purpuratus*. Estas secuencias fueron depositadas en GenBank bajo los números de acceso: KC844362-KC844484.

## Diseño de iniciadores COI

Debido a que no se pudo amplificar con éxito el gen mitocondrial de todas las localidades y/o especies, se procedió al diseño de iniciadores más específicos para nuestras especies. El primer paso fue alinear el genoma mitocondrial completo de un taxón cercano (*Mytilus edulis*), secuencias del gen de otros mitilidos y géneros cercanos filogenéticamente tomados de GenBank, junto con algunas secuencias ya amplificadas de nuestras especies. Luego, se alinearon los iniciadores de Folmer et al. (1994) con el objetivo de buscar alguna otra región conservada. Una vez localizada la región, se intentó respetar las siguientes condiciones en el diseño: (1) longitud de los iniciadores entre 18-24 bases; (2) composición de bases balanceada; (3) temperatura de unión de los iniciadores similar para ambos; (4) contenido de G:C (Guanina:Citosina) entre 40 y 60 %, lo cual da como resultado temperaturas de annealing o unión en el rango de 56-62° permitiendo una unión eficiente; (5) como la terminación 3' es la más crítica, se procuró finalizar en una primera o segunda posición del codón; y (6) evitar regiones con potencialidad para formar estructuras secundarias internas (palindrómicas) (Dieffenbach, et al., 1993). Las regiones fueron diseñadas y analizadas, a partir del alineamiento y también utilizando el software Primer3 (Koressaar y Remm, 2007). Primer3 es una aplicación que permite especificar las características mínimas de los iniciadores deseados, como Tm, porcentaje de G:C, y otros parámetros. Se especificó que el tamaño estuviera entre 18 y 27 pb y que el contenido de G:C estuviera entre 20 y 80%. Los iniciadores que se seleccionaron son internos a los diseñados por Folmer et al. (1994) y están ubicados en la posición 46 y 650 (CO1aF/CO1aR) del marcador mitocondrial (Tabla 1.2).

## Estructura genética intra-específica

Los niveles de **diferenciación genética**  $\Phi_{ST}$  (análogo de  $F_{ST}$ ; Excoffier et al., 1992) entre las poblaciones se estimaron con Arlequin versión 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) y se visualizaron con un análisis de componentes principales (PCA) implementado en Infostat 2011 (Di Rienzo et al., 2011).  $\Phi_{ST}$  es definido como:  $\Phi_{ST} = (\pi_T - \text{mean of } \pi_S) / \pi_T$ , donde  $\pi_T$  es la diversidad nucleotídica de la población total y  $\pi_S$  es el promedio de la diversidad nucleotídica dentro de las subpoblaciones.  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  miden la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones, y por tanto la diferenciación genética entre ellas. Se relacionan con la migración de la siguiente manera: la tasa a la que un alelo se fija en una población es inversamente proporcional al tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ). Esta tasa de fijación puede ser contrarrestada por el flujo génico que llega de otras poblaciones a una tasa  $m$ . Estos

factores llegan a un equilibrio en donde  $\Phi_{st} \approx 1 / (2 Nm + 1)$  para genomas haploides (Wright, 1951). De ello se desprende que cuanto mayor es el flujo génico, menor es la diferenciación entre las poblaciones.

Las **distancias genéticas** se calcularon con MEGA 4 (Tamura et al., 2007). El método más sencillo para medir la divergencia entre dos secuencias de ADN es contar el número de sitios en los que difieren. La proporción de diferentes sitios homólogos, denominada distancia observada ("*p-distance*"), busca estimar el número de mutaciones que a nivel nucleotídico se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia (Lemey et al., 2009).

Las **redes de haplotipos** del COI se construyeron de forma individual para cada especie utilizando el método de máxima parsimonia y el algoritmo *median joining* (Bandelt et al., 1999) en Network 4.6.1 (Polzin y Daneschmand, 2003), con los parámetros por defecto. En estudios filogeográficos las redes de haplotipos se utilizan con gran frecuencia como métodos de reconstrucción filogenética que consideran la coalescencia. Así, a diferencia de los árboles bifurcados tradicionales, estos métodos permiten describir las relaciones evolutivas en forma de árboles multibifurcantes, en los cuales un único haplotipo puede dar origen a muchos haplotipos, creando lo que se conoce como 'redes', particularmente como redes mínimas de haplotipos (conexiones entre haplotipos dadas por el mínimo número posible de mutaciones entre ellos) (Vázquez-Domínguez et al., 2009). Templeton et al. (1992) propusieron un método conocido como parsimonia estadística. El resultado final es una red que muestra las relaciones entre todos los haplotipos con base en el número mínimo de mutaciones. Las conexiones entre los haplotipos representan eventos coalescentes, por lo que a partir de la red de parsimonia y con base en los principios de coalescencia, pueden hacerse las siguientes predicciones (Clement et al., 2000): i) los haplotipos con mayor frecuencia tienen alta probabilidad de ser alelos ancestrales, ii) los haplotipos que tienen múltiples conexiones muy probablemente son ancestrales, iii) dentro de la red, los haplotipos ancestrales son interiores y los haplotipos nuevos tienen mayor probabilidad de ser periféricos, iv) se espera que los haplotipos ancestrales tengan una amplia distribución geográfica (básicamente porque los individuos que tienen esos haplotipos han tenido mucho tiempo para dispersarse), y v) los haplotipos con una única conexión se prevé estén unidos a haplotipos de la misma población (dado que han evolucionado recientemente y por lo tanto no han tenido tiempo para dispersarse).

---

## Estructura genética inter-específica

Para calcular las distancias genéticas entre y dentro de los taxones se utilizó el método “*p-distance*” en MEGA 4. Para determinar la partición que maximiza las diferencias entre los grupos se realizó un análisis molecular de la varianza (AMOVA; Excoffier et al., 1992) implementado en Arlequin. Este análisis incorpora información de divergencia haplotípica en forma de análisis de la varianza, a partir de una matriz de distancia genética entre todos los pares de haplotipos de la muestra. Se estiman los componentes de la varianza y los  $\Phi_{ST}$ , reflejando la correlación entre la diversidad haplotípica y los diferentes niveles de estructura genética: (1)  $\Phi_{ST}$ : variación dentro de las poblaciones, (2)  $\Phi_{SC}$ : variación entre poblaciones dentro de los grupos, y (3)  $\Phi_{CT}$ : variación entre los grupos de poblaciones. El AMOVA se realizó sobre la base de una matriz de distancia de las diferencias pareadas y su significancia se calculó utilizando procedimientos de permutación no paramétricos con 10000 iteraciones.

El patrón geográfico de la estructura genética se visualizó con Gengis v 1.08 (Parks et al., 2009), una aplicación bioinformática que proporciona una interfaz gráfica para la fusión de información sobre la diversidad molecular (secuencias de ADN) con la ubicación geográfica de donde se recogieron los especímenes secuenciados.

## Análisis filogenético

El propósito de la reconstrucción filogenética es inferir las relaciones evolutivas entre haplotipos o alelos basándose en los principios de coalescencia. Los métodos que utilizan estos principios tratan de modelar el pasado utilizando un proceso estocástico basado en el concepto de que los alelos en una población pueden ser rastreados hacia atrás en el tiempo hasta el punto en el que coalescen en un alelo ancestral común (Avice, 2000). Los métodos de estimación de filogenias se clasifican en los que están basados en distancias (e.g., UPGMA, neighbor joining), los cuales construyen árboles convirtiendo las secuencias alineadas en una matriz de distancias de diferencias pareadas (desechando los datos reales), y los basados en caracteres (máxima parsimonia, máxima verosimilitud y análisis bayesiano), los cuales buscan árboles comparando directamente caracteres por sitio del alineamiento múltiple. Los métodos de **máxima parsimonia** buscan el árbol con menor cantidad de cambios (mutaciones) derivados que son compartidos; a menudo hay más de un árbol con el mismo número mínimo de cambios de estado de carácter, en cuyo caso no es posible inferir un único árbol. El **método de máxima verosimilitud** busca el valor del parámetro que maximiza la probabilidad de observar los datos (estados de carácter), dada una hipótesis (topología de árbol) y bajo un modelo de sustitución. Los **métodos bayesianos** están cercanamente emparentados con los de máxima verosimilitud, pero tienen algunas diferencias. Una de ellas es que el análisis bayesiano no busca un único mejor árbol, sino que asigna probabilidades a las distintas hipótesis (topologías de árboles), dado los datos y bajo un modelo de sustitución (Lemey et al., 2009). En los dos casos se suponen modelos de sustituciones fijos, cuyos parámetros varían en sus valores de manera aleatoria. En el caso del método bayesiano también se requiere que el investigador especifique información previa, conocida como distribución previa ("*prior distribution*") sobre los parámetros del modelo, es decir, los parámetros del modelo de sustitución, las longitudes de rama y la topología de árbol. La actualización de la información previa se evalúa con la evidencia relativa presente en los datos.

En este estudio, los métodos de distancias solo fueron utilizados a nivel exploratorio. Para la estimación definitiva de las filogenias se utilizaron los métodos basados en caracteres (máxima verosimilitud y análisis bayesiano). Se construyeron dos filogenias globales de *Brachidontes* s.l. basadas en secuencias de COI y de 28S obtenidas en este estudio y de la base de datos GenBank (Tabla 1.2). Como grupos externos se utilizaron las especies

---

*Ischadium recurvum* y *Geukensia granosissima*; las cuales también fueron utilizadas por Lee y Ó Foighil (2005).

Para evaluar la congruencia entre los grupos de datos del COI y del 28S DNAr se realizó una prueba de partición de homogeneidad (100 repeticiones al azar) utilizando PAUP\*4.0b10 (Farris et al., 1995; Swofford, 2003). La filogenia del gen ITS1 no se incluyó debido al bajo número de secuencias disponibles en comparación con el número de secuencias de los otros dos genes. Los datos se analizaron combinados y no fueron significativamente incongruentes ( $p = 0,08$ ). El conjunto de datos combinados arrojó la misma topología general que la del árbol del COI.

Se realizó un análisis bayesiano en cada conjunto de datos utilizando MrBayes 3 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) bajo el modelo de sustitución con mejor ajuste, determinado con los criterios de información bayesiano (BIC) aplicados en jModelTest 2.1.5 (Darriba et al., 2012). El modelo seleccionado fue HKY85+G+I para el COI y HKY85+G para el 28S DNAr (Hasegawa et al., 1985; G: gamma, I: sitios invariantes). Mientras que G permite que la tasa de sustitución pueda variar entre sitios, I permite que algunos sitios no cambien, mientras que el resto de los sitios lo hacen a la misma tasa. Los parámetros del modelo fueron tratados como desconocidos y se estimaron para cada análisis bayesiano, los cuales comprendieron cuatro cadenas muestreadas cada 10000 generaciones en un total de 10 millones de generaciones; el porcentaje de árboles que fueron descartados del período inicial (“*burn-in*”) fue de 25%. Se realizaron análisis de máxima verosimilitud (ML) utilizando PAUP, con una búsqueda heurística. Para determinar el soporte de cada nodo se llevó a cabo un análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985) con 1000 repeticiones y 10 muestreos al azar por cada repetición. La edición de los árboles se realizó utilizando Dendroscope 2.7.4. (Huson et al., 2007).

**Tabla 1.3.** Secuencias del gen COI y del 28S ADNr de las especies de *Brachidontes* y de otros mitílidos de diferentes estudios utilizados para la reconstrucción filogenética, indicando los lugares de origen, los números de acceso a GenBank y sus referencias.

Taxones	Localidad	GenBank ID		Referencias
		COI	28S DNAr	
<i>Brachidontes semistriatus</i>	Kwazulu-Natal, Sudáfrica	-	AY825099.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes mutabilis</i>	Japan	-	AB103124.1	Hashimoto y Matsumoto, resultados no publicados
<i>Brachidontes sp.1</i>	Darwin Harbor, Australia	-	AY825081.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes sp. 2</i>	Darwin Harbor, Australia	-	AY825080.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes semilaevis</i>	Chumical, Panamá	AY825117.1	AY825089.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes adamsianus</i>	Pto.Vallarta / Isla Jicarón, Panamá	AY825170.1	AY825091.1-100.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes exustus I</i>	Veracruz, México	AY825216.1	AY825104.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes exustus II</i>	Panacea, Florida, USA	AY621900.1	AY621999.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes exustus III</i>	Boca Chica Key, Florida, USA	-	AY621993.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes variabilis</i>	Hong Kong	DQ836021.1-20.1	AY825101.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes modiolus</i>	Key Biscayne, Florida, USA	AY621916.1	AY622002.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes puniceus</i>	Cabo Verde	HM999789.1	-	Cunha et al., resultados no publicados
<i>Brachidontes sp. 1</i>	Islas Palau	AB465560.1	-	Goto et al., 2011
<i>Brachidontes sp. 2</i>	Islas Palau	AB465574.1	-	Goto et al., 2011
<i>Brachidontes sp. 3</i>	Islas Palau	AB465568.1	-	Goto et al., 2011
<i>Brachidontes pharaonis</i>	Océano Índico	DQ836013.1	-	Terranova et al., 2007
<i>Geukensia granosissima</i>	Marco, Florida, USA	AY621927.1	AY622006.1	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Ischadium recurvum</i>	Panacea, Florida, USA	AY621933.1	AY622009.1	Lee y Ó Foighil, 2005

## RESULTADOS

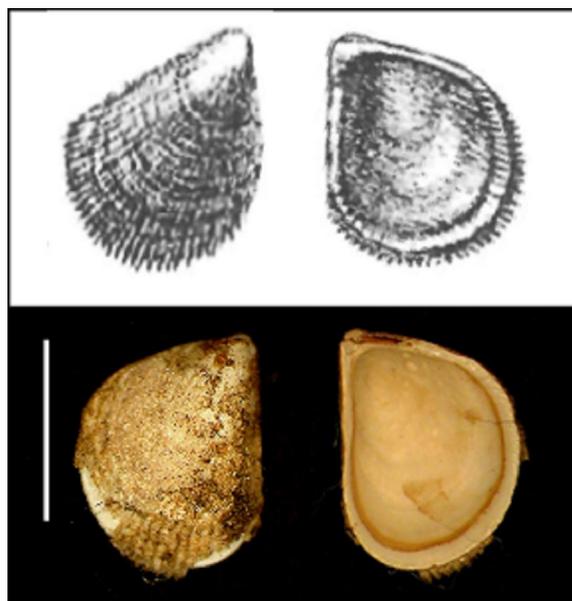
### Observaciones sobre materiales de referencia

Los ejemplares utilizados para la secuenciación fueron asignados a una de las tres especies nominales en base a la morfología de la valva: *B. darwinianus* (Fig. 1.2A-F), *B. rodriguezii* (Fig. 1.2G-K) y *B. purpuratus* (Fig. 1.2L). Los ejemplares de *B. rodriguezii* recolectados en la localidad tipo (Bahía San Blas) (Fig. 1.2J-K) comparten los caracteres fenotípicos diagnósticos de la especie, definida por Adami et al. (2013), observable en la serie tipo (BMNH 1854-12-4-809, 6 especímenes con ambas valvas, dos de ellas se muestran en la Fig. 1.2H-I). El ejemplar presumiblemente utilizado por d'Orbigny (1842) para su ilustración (Fig. 1.2G) es fácilmente identificable en la serie (Fig. 1.2H; BMNH 1854.12.4.809/1), y fue seleccionado como lectotipo por Aguirre (1994). Las costillas de la valva son relativamente delgadas en comparación con otras muestras (Fig. 1.2I-J), pero los caracteres diagnósticos (Adami et al., 2013) son fácilmente observables. La localidad de origen de los especímenes de *B. darwinianus* depositados en el Museo Británico (BMNH 1854-12-4-799 (6 valvas completas), -800 (4 ejemplares) y -801 (5 valvas completas más 3 valvas individuales)) no está claramente identificada. d'Orbigny (1842) indicó tres localidades, bahía Rosas (pcia. de Río Negro, Argentina), Maldonado (Uruguay) y Río de Janeiro (Brasil). Los especímenes recolectados en Punta Canario (Montevideo) caen dentro del rango de variación fenotípica de la serie tipo (comparar Fig. 1.2C, E, con la Fig. 1.2D, F). No se pudo confirmar la presencia de esta especie en el norte de la Patagonia argentina. En los muestreos realizados en Bahía Rosas (= Ensenada de Ros, uno de los tres lugares indicados por d'Orbigny) se obtuvieron pequeños especímenes de *B. rodriguezii* (Fig. 1.2K) con una morfología de la valva que recuerda al espécimen de *B. darwinianus* ilustrado por d'Orbigny (Figs. 1.2A, B).

Kelahr et al. (2007) reportaron *B. granulatus* para la zona intermareal de la Patagonia argentina, pero su presencia en esta región se considera poco probable. No parece existir material de referencia de ese estudio (Prof. J.C. Castilla, comunicación personal). Numerosos estudios llevados a cabo en la misma región y hábitats no han confirmado su presencia (Liuzzi y López-Gappa, 2008).

El holotipo de *B. blakeanus*, depositado en el Museo de Manchester (Catálogo # EE.7674, Fig. 1.7) no corresponde a un mitílido, sino que pertenece al género *Philobrya* Carpenter (Family Phyllobryidae; Tevesz, 1977), que incluye muchas especies reportadas para la región (Zelaya, 2005). En conclusión, se reclasifica a esta especie como *Philobrya*

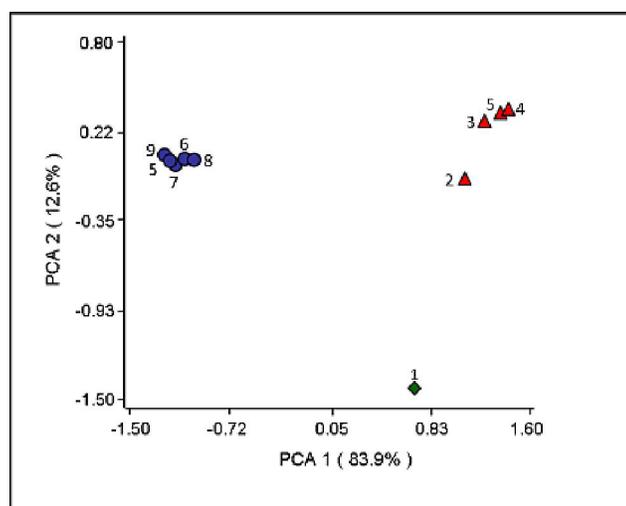
*blakeana* (Melvill y Standen, 1914) *comb. nov.* (Familia Phylobryidae). Por otra parte, no existe material de referencia de los ejemplares de "*B. blakeanus*" citados por Kelaher et al. (2007) para la Patagonia argentina (Prof. J.C. Castilla, comunicación personal). Los registros de *B. blakeanus* en la literatura ecológica (Ríos et al., 2003; Kelaher et al., 2007) requieren revisión.



**Figura 1.7.** *Philobrya blakeana* (Melvill y Standen, 1914) *comb. nov.*, vista de la superficie interior y exterior de la valva. Arriba: ilustraciones de Melvill y Standen (1914), su lámina VII: Figs. 4 y 4a. Abajo: imágenes del holotipo (valvas secas), depositado en el Museo de Manchester (Catálogo # EE.7674; cortesía de Rebecca Machin, curadora). Barra: 5 mm.

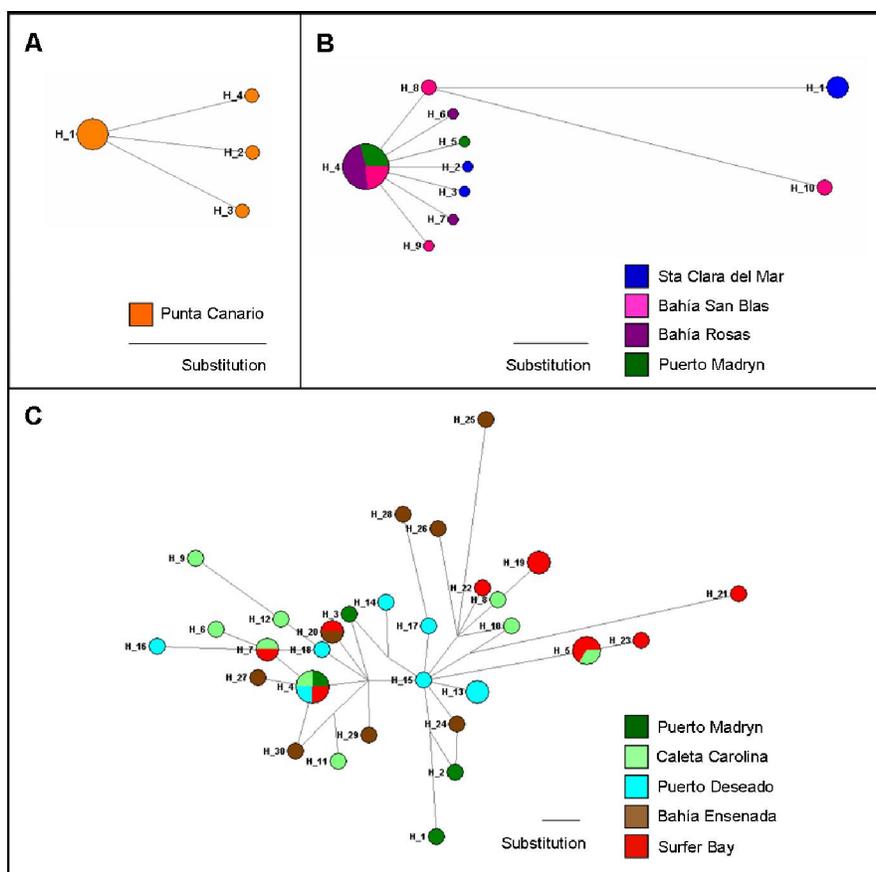
### Estructura genética intra-específica

Los valores de  $\Phi_{ST}$  pareados dentro de *B. rodriguezii* indican que las muestras de Santa Clara del Mar se diferencian de las otras localidades (0,32-0,60) (Fig. 1.8). Por otro lado, los valores de  $\Phi_{ST}$  dentro de *B. purpuratus* indican una falta de diferenciación genética entre las poblaciones (Fig. 1.8). Los  $\Phi_{ST}$  pareados no fueron estimados para *B. darwinianus* debido a que todos los haplotipos se obtuvieron de una única localidad.



**Figura 1.8.** Análisis de componentes principales (PCA) de los  $\Phi_{ST}$  obtenidos a partir del gen mitocondrial COI. (◆) *B. darwinianus*, (▲) *B. rodriguezii* y (●) *B. purpuratus*. Los números indican localidades: 1: Punta Canario, 2: Santa Clara del Mar, 3: Bahía San Blas, 4: Bahía Rosas, 5: Puerto Madryn, 6: Caleta Carolina, 7: Puerto Deseado, 8: Surfer Bay, 9: Bahía Ensenada (ver Tabla 1.1 para más información).

Las redes de haplotipos individuales resultaron en una genealogía en forma de estrella en *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* (Figs. 1.9A, B) y, en una genealogía más expandida y reticulada en *B. purpuratus* (Fig. 1.9C). Ningún haplotipo es compartido entre las tres especies nominales. En la red de haplotipos de *B. darwinianus*, el haplotipo 1 tiene la frecuencia más alta y muchas conexiones (Fig. 1.9A), mientras que en la red de *B. rodriguezii* (Fig. 1.9B) el haplotipo 4 es el más frecuente y posee una amplia distribución geográfica. Los ejemplares de *B. rodriguezii* de Santa Clara del Mar no comparten haplotipos con otras localidades más al sur, un resultado consistente con la fuerte diferenciación genética revelada por el análisis de  $\Phi_{ST}$  pareados que se mencionó anteriormente. *Brachidontes purpuratus* mostró una genealogía compleja (Fig. 1.9C), con bajo nivel de diferenciación genética entre las poblaciones.



**Figura 1.9.** Redes de haplotipos basadas en el gen mitocondrial COI (A) *Brachidontes darwinianus*, (B) *B. rodriguezii* y (C) *B. purpuratus*. Cada haplotipo es representado por un círculo, y su tamaño es proporcional a su frecuencia; los colores indican localidad de origen. La información de latitud y longitud de cada localidad está indicada en la Tabla 1.1.

## Estructura genética inter-específica

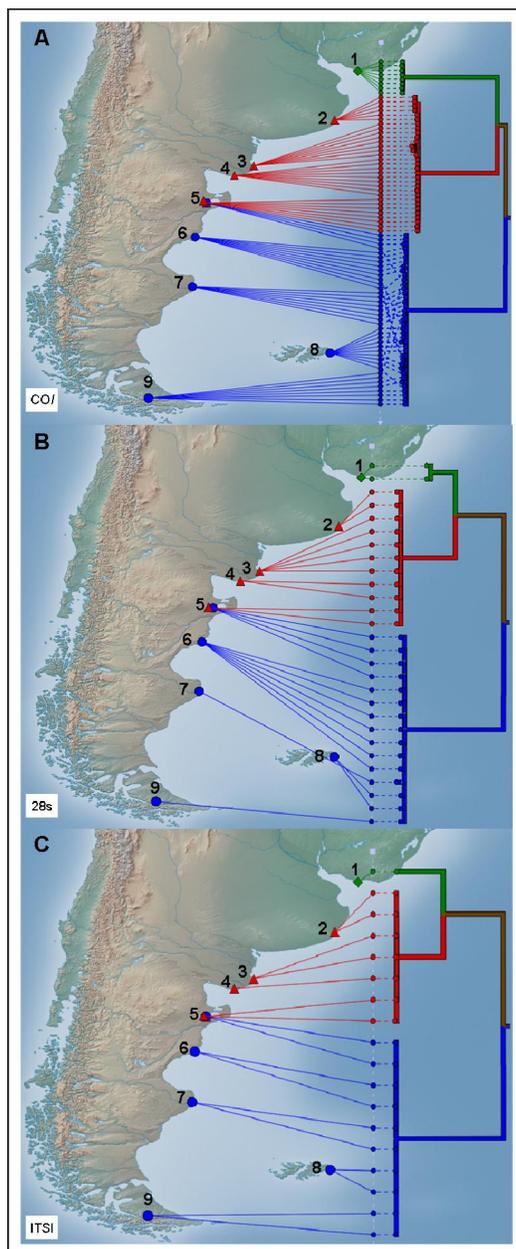
Los valores de los  $\Phi_{ST}$  pareados obtenidos a partir del gen mitocondrial COI entre las tres especies nominales señalan una diferenciación genética significativa (0,95-0,99; Fig. 1.8). Por otro lado, las distancias genéticas dentro de cada especie oscilaron entre el 0,1% y el 1,1%, mientras que, las distancias genéticas entre especies osciló entre 20% y 21% (Tabla 1.4). La hipótesis de panmixia, puesta a prueba con un análisis molecular de la varianza donde se consideró a las localidades de las tres especies como un solo pool génico, fue rechazada ( $p < 0,05$ ). Se encontró que la variación entre los grupos fenotípicamente definidos ("*darwinianus*", "*rodriguezii*" y "*purpuratus*"; Tabla 1.5) explicó el 96,61%, 99,79%, y 99,87% de la varianza genética en el COI, el 28S e ITS1 ADNr, respectivamente. La gran diferenciación genética es consistente con la divergencia genética detectada por los tres marcadores moleculares observados en los filogramas (Figs. 1.10A-C). En todos los árboles recuperados, *B. rodriguezii* y *B. darwinianus* aparecen más estrechamente relacionados entre sí que con *B. purpuratus*.

**Tabla 1.4.** Distancias genéticas entre las tres especies de *Brachidontes* s.l. presentes en las costas de Argentina y Uruguay, basadas en el gen COI. La distancia genética media entre los grupos está por debajo de la diagonal y los valores de  $p$  por encima de la diagonal.

	<i>B. darwinianus</i>	<i>B. rodriguezii</i>	<i>B. purpuratus</i>
<i>B. darwinianus</i>	-	0,016	0,016
<i>B. rodriguezii</i>	0,21	-	0,017
<i>B. purpuratus</i>	0,20	0,20	-

**Tabla 1.5.** Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los genes COI, 28S e ITS1 ADNr para tres especies de *Brachidontes* presentes en las costas de Argentina y Uruguay (\*  $p < 0,05$ ).

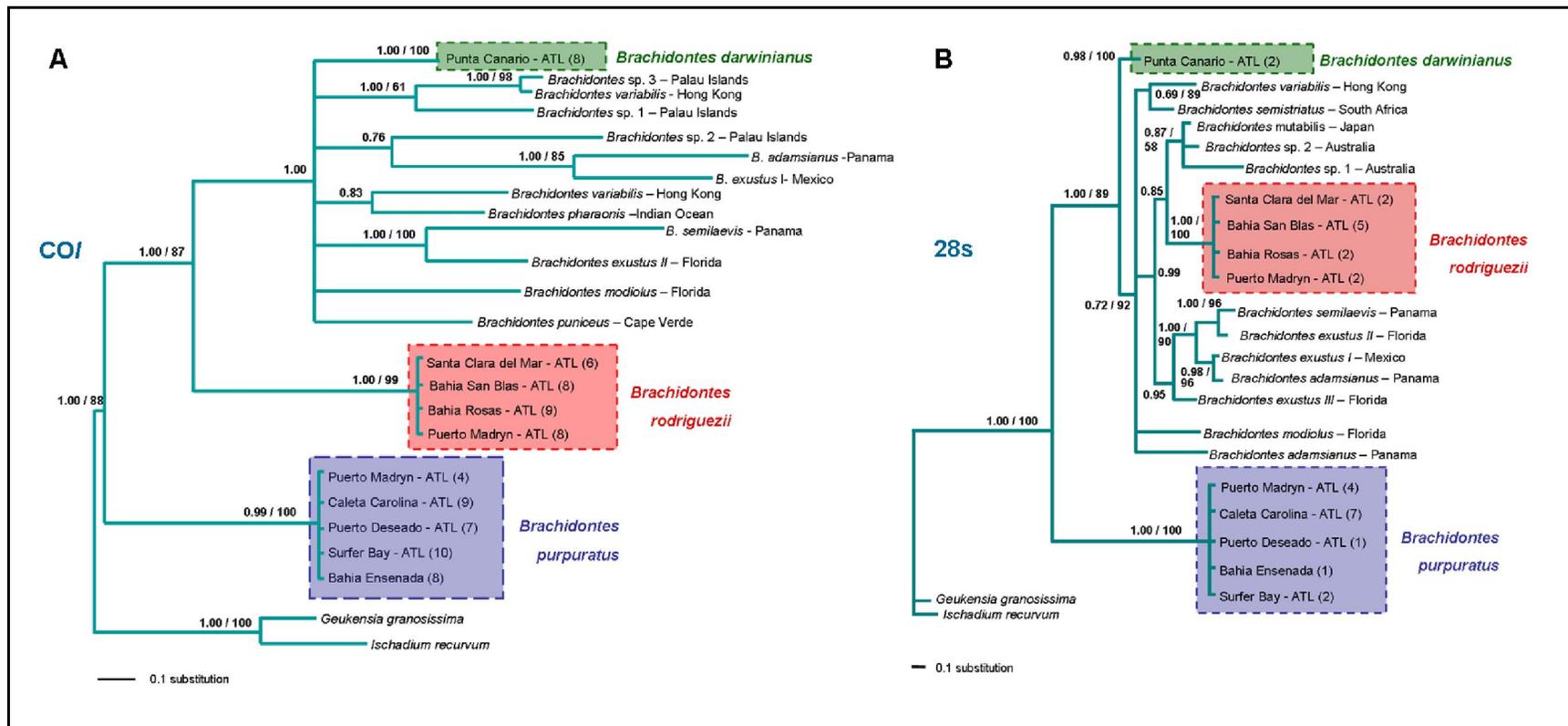
Gen	Fuente de variación	gl	Índices de fijación	% de variación
COI ADNmt	Entre grupos	2	$\Phi_{CT}$ : 0,97*	96,61
	<i>darwinianus</i> vs <i>rodriguezii</i> vs <i>purpuratus</i>			
	Entre poblaciones	7	$\Phi_{ST}$ : 0,97*	0,50
	Entre individuos	68	$\Phi_{SC}$ : 0,15*	2,89
28S ADNr	Entre grupos	2	$\Phi_{CT}$ : 0,99*	99,79
	<i>darwinianus</i> vs <i>rodriguezii</i> vs <i>purpuratus</i>			
	Entre poblaciones	7	$\Phi_{ST}$ : 1,00 *	0,21
	Entre individuos	18	$\Phi_{SC}$ : 1,00 *	0,00
ITS1 ADNr	Entre grupos	2	$\Phi_{CT}$ : 0,99*	99,87
	<i>darwinianus</i> vs <i>rodriguezii</i> vs <i>purpuratus</i>			
	Entre poblaciones	7	$\Phi_{ST}$ : 0,99*	-0,01
	Entre individuos	8	$\Phi_{SC}$ : -0,08*	0,14



**Figura 1.10.** Asociación entre las relaciones filogenéticas de las especies *Brachidontes* y su distribución geográfica en la región de interés, basada en los genes (A) COI ADNmt, (B) 28S ADNr, y (C) ITS1 ADNr. (◆) *B. darwinianus*, (▲) *B. rodriguezii* y (●) *B. purpuratus*. Los números indican localidades: 1: Punta Canario, 2: Santa Clara del Mar, 3: Bahía San Blas, 4: Bahía Rosas, 5: Puerto Madryn, 6: Caleta Carolina, 7: Puerto Deseado, 8: Surfer Bay, 9: Bahía Ensenada (ver Tabla 1.1 para más información).

## **Análisis filogenético**

Las filogenias de *Brachidontes* s.l. construidas a partir del gen mitocondrial COI y del gen nuclear 28S ADNr se muestran en la Figura 1.11. Tanto el análisis de máxima verosimilitud como el análisis bayesiano en ambas filogenias (nuclear/mitocondrial) revelaron la presencia, con alto soporte, de dos clados. Uno está formado por *B. purpuratus* y el otro incluye todas las otras especies de *Brachidontes* s.l. analizadas. Dentro de este último, *B. rodriguezii* y *B. darwinianus* forman clados bien definidos y separados con un alto valor de soporte. Se observaron diferencias en la posición de *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* entre la filogenia obtenida a partir del gen mitocondrial COI y la obtenida a partir del gen nuclear 28S ADNr. En el árbol mitocondrial, *B. rodriguezii* aparece como grupo hermano de una politomía que incluye a *B. darwinianus* y a las otras especies de *Brachidontes* estudiadas (Fig. 1.11A). En el árbol de genes nucleares *B. darwinianus* es basal respecto del resto de las especies (Fig. 1.11B).



**Figura 1.11.** Árboles bayesianos de *Brachidontes* s.l. basados en (A) el gen mitocondrial COI y (B) el gen nuclear 28S ADNr, incluyendo especies secuenciadas en este estudio y en estudios anteriores, utilizando a *Ischadium recurvum* y *Geukensia granosissima* (Mytilinae) como grupos externos. Los números por encima de las ramas representan los valores de las probabilidades posteriores bayesianas / ML “bootstraps” (> 60) como soporte a los nodos. Los números que siguen a los sitios de muestreo indican el número de individuos por localidad.

## DISCUSIÓN

### Status de las especies de *Brachidontes* de Argentina y Uruguay

Las secuencias de ADN mitocondrial y nuclear revelaron tres linajes diferentes de *Brachidontes* s.l. en el Atlántico sudoccidental. Estas unidades cumplen con el concepto de especie filogenética (Nixon y Wheeler, 1990) y corresponden a *B. darwinianus*, *B. rodriguezii* y *B. purpuratus*. El AMOVA para los tres genes, los  $\Phi_{ST}$  pareados y la distancia genética indican consistentemente un alto nivel de divergencia genética entre los tres linajes. Una variedad de especies de metazoos exhiben lo que se conoce como “*barcoding gap*”, una diferencia en la distancia genética en el gen mitocondrial COI del ADN ampliamente utilizado para diferenciar especies. Las divergencias intraespecíficas son típicamente  $< 3\%$ , mientras que las divergencias interespecíficas oscilan entre  $10\%$  y  $25\%$  (Hebert et al., 2003; Bucklin et al., 2011). Las distancias genéticas estimadas entre los tres linajes de *Brachidontes* en nuestro estudio ( $20\text{-}21\%$ ) sugieren que estos grupos son, en efecto, tres especies diferentes. A partir de estos resultados, se rechazan las hipótesis que postulan que *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* son sinónimos menores de *B. purpuratus* (Aguirre et al., 2006a, 2008), y que *B. darwinianus* es un sinónimo menor de *B. exustus* (Ríos, 1994). Esto es consistente con los resultados del mapeo cromosómico de varios genes en *B. purpuratus* y *B. rodriguezii* (Pérez-García et al., 2010 a,b).

En el Atlántico sudoccidental, *B. purpuratus* se limita a la región templado-fría (Provincia Biogeográfica Magallánica), mientras que *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* se encuentran en la región templado-cálida (Provincia Biogeográfica Argentina) (Fig. 1.1). Nuestros resultados confirman que *B. rodriguezii* y *B. purpuratus* coexisten en los mismos bancos a lo largo de la zona de transición ( $41^\circ$  a  $43^\circ$  S), representados en nuestro estudio por las muestras de Puerto Madryn. La presencia de *B. darwinianus* en la zona de Montevideo (estuario del Río de la Plata) es consistente con estudios anteriores que indican que se trata de una especie estuarial (Avelar y Narchi, 1983; Scarabino et al., 2006).

El status del resto de las especies reportadas para la región es cuestionable. *Brachidontes solisianus* es considerada en el capítulo 3. *Brachidontes blakeanus*, originalmente descrita para las Islas Malvinas, no es un mitilido y debe ser transferida al género *Philobrya* (Philobryidae). Los registros de *B. blakeanus* y *B. granulatus* de la Patagonia argentina presumiblemente corresponden a otras especies.

## Estructura genética intra-específica e implicancias filogeográficas

*Brachidontes purpuratus* es la única especie de *Brachidontes* s.l. cuya distribución se extiende a aguas templado-frías, abarcando dos provincias biogeográficas completas: la provincia Magallánica (templado-fría) y la provincia Chileno-Peruana (templado-cálida). Entre estas dos provincias existe una gran zona de transición, que se extiende aproximadamente entre 32° y 42° S (Fernández et al., 2000). *A priori*, parece poco probable que la baja diferenciación genética encontrada en el Atlántico sudoccidental se repita en el Pacífico sudoriental. De hecho, Pérez et al. (2008) observaron diferenciación genética significativa (utilizando microsátélites) entre las poblaciones de Chile central (Tralca, 32° 26'S, región templado-cálida) y la Patagonia argentina (Puerto Lobos, 41° 42'S, región templado-fría); esta última localidad se halla cerca del rango límite norte de la especie en el Atlántico sudoccidental. La diversidad genética relacionada con un quiebre biogeográfico en el Pacífico sudoriental ha sido reportado anteriormente para otros organismos marinos (Fraser et al., 2010; Macaya y Zuccarello, 2010). Este problema es tratado en el Capítulo 2.

En contraste con el bajo nivel de diferenciación genética observada en *B. purpuratus*, los valores de  $\Phi_{ST}$  pareados en *B. rodriguezii* indican que las muestras de la localidad más al norte donde se tomaron muestras, Santa Clara del Mar, se diferencian de las de otras localidades ubicadas más al sur. Entre Santa Clara del Mar y las otras localidades hacia el sur (Bahía San Blas, Bahía Rosas, Puerto Madryn) hay cientos de kilómetros de costa que consisten en playas expuestas arenosas y planos de marea areno-fangosos (SEGEMAR, 2000), hábitats no ocupados por especies de *Brachidontes*. Este escenario crea una barrera sustancial a la dispersión por medio de larvas pelágicas. Por el contrario, las tres localidades del norte de la Patagonia están conectados por un continuo de hábitats intermareales de sustrato duro (SEGEMAR, 2000).

Se han recuperado valvas fósiles de *B. rodriguezii* de testigos sedimentarios obtenidos a 68 m de profundidad fuera de Mar del Plata, presumiblemente del Pleistoceno (Richards y Craig, 1963), cerca de uno de los sitios de muestreo de este estudio, lo cual confirma una larga presencia de la especie en la que región durante el Cuaternario. Algunos fósiles de *Brachidontes* del Mioceno tardío, *B. lepida* (Philippi, 1893) de la Formación Madryn y Parania (del Río y Martínez, 1998) son fenotípicamente lo suficientemente parecidos a *B. rodriguezii* como para haber sido clasificados como una subespecie. La diferenciación genética intraespecífica, una larga historia de presencia en la región, y la posición filogenética de *B. rodriguezii* dentro del clado principal de *Brachidontes* en la filogenia basada en el COI

(explicado más adelante), proveen soporte a la hipótesis de que *B. rodriguezii* deriva de una población local, con una larga historia de presencia en las aguas templado-cálidas del Atlántico sudoccidental (Mioceno). La evaluación de esta hipótesis requiere la concatenación de datos moleculares, paleontológicos y morfométricos, lo cual es abordado en el Capítulo 4.

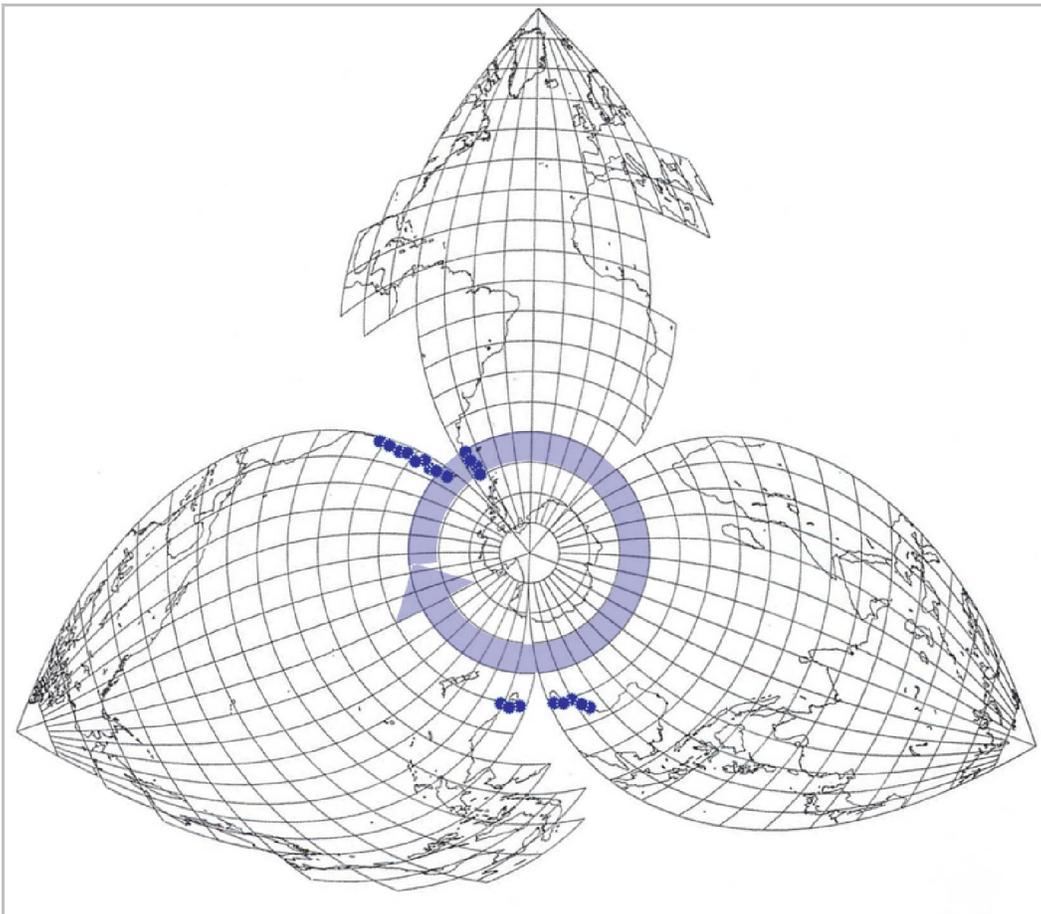
### **Relaciones filogenéticas de *Brachidontes* s.l.**

La familia Mytilidae ha sido clasificada en un número variable de subfamilias (ver Huber, 2010, para una visión general). Varios estudios basados en datos genéticos (Distel, 2000; Matsumoto, 2003; Owada y Hoeksema, 2011) han contribuido substancialmente a la clarificación de las relaciones entre los géneros. Huber (2010) resume la información disponible y subdivide a los Mytilidae en 10 subfamilias. *Brachidontes* s.l. (incluyendo a *Hormomya* Mørch, *Austromytilus* Laseron y *Perumytilus* Olsson) fue ubicado dentro de los Brachidontinae Nordsieck, junto con *Mytilaster* Monterosato, y con el género modioliforme *Geukensia* Van de Poel, conforme a los resultados genéticos presentados por Distel (2000). Los resultados de este estudio apoyan con alto soporte una divergencia temprana de *B. purpuratus* respecto de las otras especies de *Brachidontes* s.l. El status genérico de esta especie y sus relaciones filogenéticas dentro de los Brachidontinae son re-considerados en el Capítulo 2.

En contraste con *B. purpuratus*, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* forman parte de un clado que contiene a todas las otras especies *Brachidontes* de las cuales se dispone de secuencias para los genes que se utilizaron en este estudio. En un contexto filogenético, la discordancia entre filogenias basadas en genes diferentes, como es el caso de la ubicación de *B. rodriguezii*, es frecuente. Muy a menudo, este hecho se ha atribuido a la introgresión o hibridación, pero también puede ser explicado por diferencias en las tasas de mutación entre los tipos de marcadores, sensibilidad al tamaño efectivo de la población, clasificación incompleta de los linajes, o modo de herencia (Ballard y Whitlock, 2004). Una causa genérica potencial de la incongruencia parcial entre los árboles basados en ADN nuclear y mitocondrial es una señal filogenética débil, que puede resultar en una pobre resolución filogenética o en árboles inexactos de genes como un artefacto de la reconstrucción filogenética (Funk y Omland, 2003). Se necesitan otros estudios, incluyendo más especies de *Brachidontes* s.l. y géneros afines, así como muestras de otras regiones del mundo para resolver la filogenia completa del grupo.

Aunque los mejillines (*Brachidontes* s.l.) que dominan muchas comunidades intermareales a lo largo de las costas rocosas del Atlántico sudoccidental, comparten sus características intrínsecas y extrínsecas (*sensu* Webb et al., 2002), pertenecen a diferentes linajes. Definir si esto refleja convergencia evolutiva o, alternativamente, obedece a la conservación de rasgos ancestrales, requerirá una mejor resolución de la filogenia de los mitílidos.

## CAPÍTULO 2. Mejillines de la costa templado-fría de América del Sur: relaciones filogenéticas, conexión transpacífica y huellas de las glaciaciones del Cuaternario\*



\* El contenido de este capítulo ha sido publicado como: Trovant, B., Orensanz, J.M., Ruzzante, D.E., Stotz, W., Basso, N.E., 2015 (online 2014). Scorched mussels (Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae) from the temperate coasts of South America: Phylogenetic relationships, trans-Pacific connections and the footprints of Quaternary glaciations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 82, 60-74.

## RESUMEN

Este capítulo aborda aspectos de la filogenia y filogeografía de los mejillines (Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae) del sur de Sudamérica (Argentina y Chile), y sus implicaciones ecofilogenéticas. Las relaciones filogenéticas fueron inferidas a partir de análisis bayesianos y de máxima verosimilitud utilizando secuencias de dos genes nucleares (28S y 18S) y de un gen mitocondrial (COI). Los resultados indican que los Brachidontinae son monofiléticos e incluyen tres clados con alto grado de soporte: [i] *Brachidontes* Swainson (= *Hormomya* Mørch *Mytilaster* Monterosato, [ii] *Ischadium* Jukes -Browne + *Geukensia* van de Poel, y [iii] *Austromytilus* Laseron + *Mytilisepta* Habe (generalmente considerado como un miembro de los Septiferinae) + *Perumytilus* Olsson. Las especies del clado [iii] se distribuyen a lo largo de las costas templadas del Océano Pacífico. La evidencia disponible apoya la divergencia entre *Austromytilus* (Australia) y *Perumytilus* (Sudamericana) tras la ruptura de las conexiones entre Australia, Antártida y Sudamérica. En el sur de Sudamérica hay cuatro especies de brachidontinos: *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny), *B. granulatus* (Hanley), y dos clados genéticamente distintos de *Perumytilus*. Estos últimos se distribuyen en las Provincias biogeográficas Chileno-Peruana (Clado Norte) y Magallánica (Clado Sur), respectivamente templado-cálida y templado-fría. A pesar de su gran distribución geográfica el Clado Sur no exhibió estructura genética, mientras que en un área geográfica mucho más reducida, el Clado Norte mostró evidencias de estructuración genética. Las poblaciones de las regiones templado-cálidas, como es el caso del Clado Norte, tienen mayor estructuración genética probablemente debido a que no estuvieron expuestas a las glaciaciones, funcionando como un refugio para muchos taxones marinos. En base al marcador mitocondrial, el Clado Sur presentó baja diferenciación genética y diversidad nucleotídica, una alta diversidad de haplotipos, falta de correlación entre distancia genética y geográfica, rechazo de la hipótesis de neutralidad, sin evidencias de que la selección esté actuando sobre este marcador, sugiriendo que este Clado se encuentra en expansión poblacional. El Clado Sur es el único brachidontino restringido a aguas templado-frías. Consideraciones biogeográficas y el registro fósil conducen a proponer la hipótesis de que el Clado Sur se originó del Clado Norte por diferenciación peripátrica incipiente, seguido de aislamiento durante las glaciaciones del Cuaternario, diferenciación genética en las costas no glaciadas de la Patagonia este, una nueva expansión hacia el sur de Chile tras el Último Máximo Glacial (UMG), y el desarrollo de una zona de contacto secundario entre los dos clados en el centro-sur de Chile. La evidencia de una expansión del Clado Sur durante el Pleistoceno Superior se observó también en otros

organismos que han colonizado los ecosistemas costeros del este de la Patagonia, aparentemente ocupando un espacio ecológico vacío. Se destaca que el ensamblado de las comunidades no puede ser explicado únicamente en términos de factores ambientales: la historia también es importante.

## INTRODUCCIÓN

Un tema fundamental de la biología evolutiva y de la conservación se refiere al grado en que los patrones actuales de biodiversidad reflejan la acción de los procesos ecológicos contemporáneos o contingencias históricas. Este es el dominio del campo emergente de la ecofilogenética, focalizado en "la incorporación de la evolución y de las contingencias históricas en la agenda de la investigación ecológica, a través del uso generalizado de datos filogenéticos" (Mouquet et al., 2012). En este capítulo se investiga la diversidad filogenética de los "mejillines" de Sudamérica austral, pertenecientes al género *Brachidontes* y a géneros relacionados. Los mejillines son especies dominantes en la zona intermareal media de sustratos rocosos a lo largo de las costas templadas de Sudamérica austral, tanto en el Pacífico como en el Atlántico (Tanaka y Magalhães, 2002; Thiel y Ullrich, 2002; Silliman et al., 2011). Aunque similares en apariencia, estas comunidades dominada por mejillines varían significativamente en su estructura y organización. La depredación por invertebrados bentónicos (por ejemplo estrellas de mar, caracoles) es un factor estructurante principal en el Pacífico (Navarrete y Castilla, 2003), pero parece ser de poca importancia en el Atlántico (Olivier et al., 1966a; Bertness et al., 2006), donde el rigor ambiental sería la hipótesis para explicar la baja tasa de depredación. Asimismo, es interesante el hecho de que los bancos de bivalvos se componen de especies diferentes que, cuando se mezclan, pueden ser difíciles de separar teniendo solo en cuenta caracteres fenotípicos (van der Mollen et al., 2012; Adami et al., 2013), aun perteneciendo a linajes con una larga historia de divergencia (Trovant et al., 2013). La uniformidad en la apariencia de estas comunidades puede dar lugar a una idea engañosa ocultando una diversidad de interacciones entre factores ecológicos e históricos.

Las tres especies de mejillines que se distribuyen a lo largo de las costas del sur de Sudamérica (Argentina y Chile; Fig. 2.1) pertenecen a dos géneros nominales: *Brachidontes* Swainson (dos especies) y *Perumytilus* Olsson (una especie). El género *Brachidontes* incluye muchas especies, todas distribuidas en mares cálidos y templado-cálidos alrededor del mundo (Lee y Ó Foighil, 2005; Trovant et al., 2013). *Perumytilus*, originalmente creado sobre la base de caracteres morfológicos de la valva mal definidos (Adami et al., 2013), ha sido retenido como válido (e.g., Coan y Valentich Scott, 2012, y muchos estudios ecológicos) o considerado como un sinónimo de *Brachidontes* s.l. (e.g., Huber, 2010; Trovant et al., 2013).

Las dos especies de *Brachidontes* s.s. que se distribuyen en el sur de Sudamérica se limitan a regiones templado-cálidas (Fig. 2.1): *B. rodriguezii* (d'Orbigny) en el Atlántico (32°

a 43° S; Scarabino et al., 2006; Trovant et al., 2013) y *B. granulatus* (Hanley) en el Pacífico (9° a 43° S; Bernard, 1983). La tercer especie de mejillín fue considerada en el primer capítulo como *Brachidontes purpuratus* siguiendo a Huber (2010) y a Adami et al. (2013). Para este capítulo conté con muestras de otros representantes de los Brachidontinae que no estuvieron disponibles al comienzo de mi tesis. Esto permitió reconsiderar la posición genérica de esta especie, la cual ahora es reconsiderada en el contexto de la filogenia del grupo y ubicada dentro del género *Perumytilus*. El rango de distribución de *Perumytilus purpuratus* (Lamarck), comprende la región templado-fría de ambas costas y la region templado-cálida del Pacífico sudoriental (al sur de los 3° S de latitud), correspondientes respectivamente a las provincias biogeográficas Magallánica y Chileno-Peruana y (Briggs et al., 2013) (Fig. 2.1). Este es el único brachidontino conocido que habita aguas templado-frías. *Brachidontes rodriguezii* y *P. purpuratus* habitan en simpatría entre los 41° y 43° S en el Atlántico sudoccidental, con uno u otro dominando los extensos bancos intermareales hacia el norte y sur de esta banda latitudinal. Al sur de 50° S, donde la temperatura promedio mensual de la superficie del mar cae por debajo de 12° C y 5° C durante el mes más cálido y frío, respectivamente, *Perumytilus* es reemplazado por *Mytilus* como el componente dominante en las comunidades intermareales dominadas por mitílidos (M. Adami y S. Gordillo, com. pers.). *Brachidontes granulatus* y *P. purpuratus* co-ocurren a lo largo de las costas de la provincia Chileno-Peruana, pero ocupan diferentes microhábitats. Mientras que *P. purpuratus* forma bancos densos en la zona media-intermareal sobre gran parte de su área de distribución latitudinal (excepto en los sectores en los que está presumiblemente controlada por los depredadores), *B. granulatus* ocurre típicamente en las zonas intermareal y submareal (hasta 15 m), usualmente en microhábitats crípticos: debajo de las rocas, en grietas o entre los discos de fijación de macroalgas.

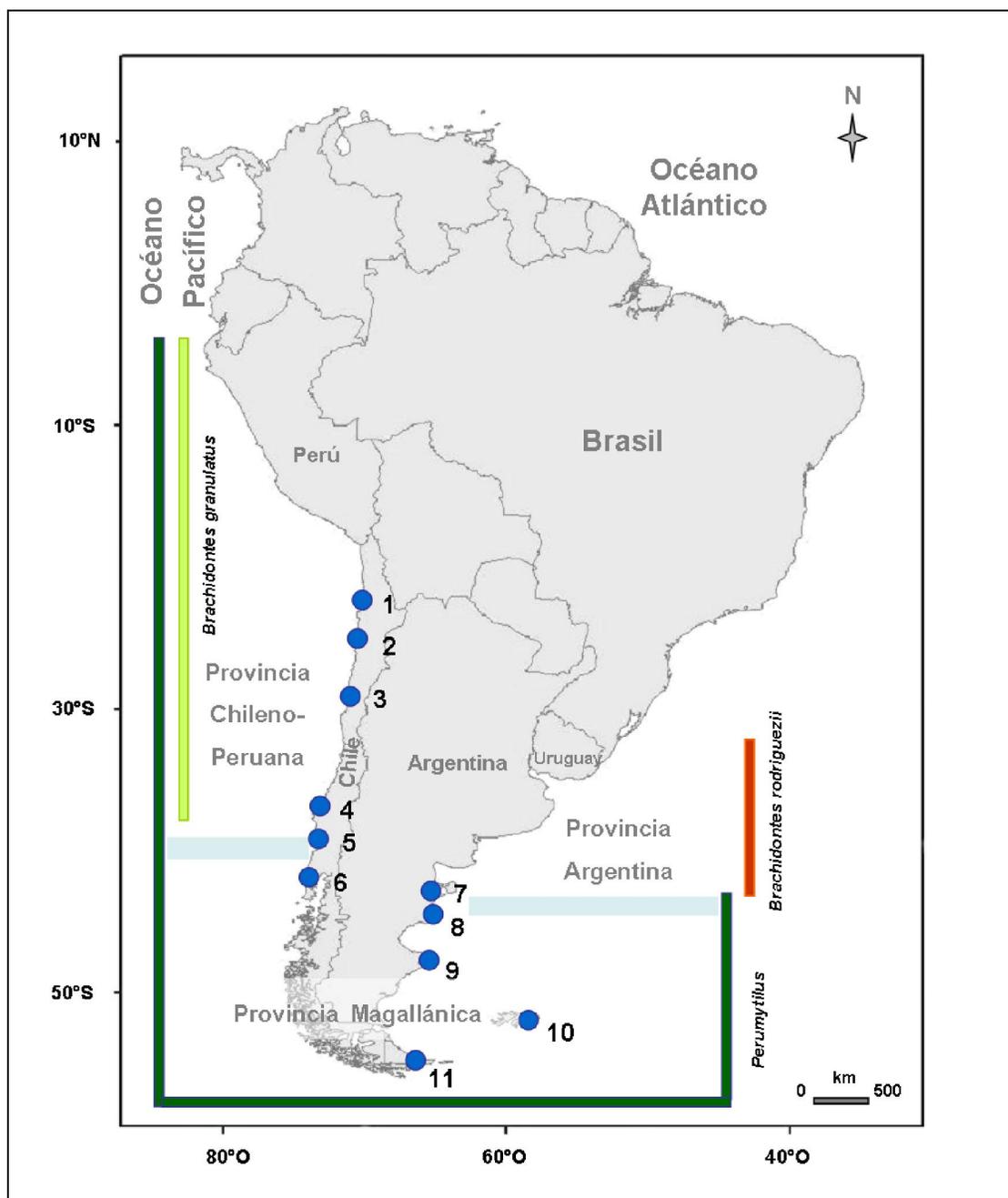
Mientras que el patrón de distribución de *Brachidontes* es consistente con la diversificación hipotética en regiones marinas tropicales (Briggs et al., 2013), las relaciones filogeográficas de *Perumytilus* siguen siendo inciertas. La literatura ecológica indica una notable similitud entre los bancos de bivalvos intermareales dominadas por los géneros monotípicos *Perumytilus* (sudamericano) y *Austromytilus* Laseron (australiano), sugiriendo la hipótesis de una relación filogenética entre los dos linajes. Las relaciones de *Austromytilus*, sin embargo, no se han investigado con métodos moleculares. Las conexiones de la biota Sudamericana han sido influenciadas por grandes contingencias históricas: la separación de Gondwana (Sanmartín y Ronquist, 2004), la apertura del Pasaje de Drake durante el Eoceno

medio (Scher y Martin, 2006), la apertura del canal de Tasmania durante el Eoceno superior (Nelson y Cooke, 2001) y el posterior establecimiento de la circulación-circumpolar antártica durante el Oligoceno, el consecuente enfriamiento del Océano Austral, y las glaciaciones del Cuaternario (Fraser et al., 2012). Esta secuencia de eventos define los escenarios en los que las relaciones filogenéticas y filogeográficas de *Perumytilus* deben ser consideradas. Una relación eventual entre *Perumytilus* y *Austromytilus* podría explicarse por la dispersión temprana de un ancestro común seguido de la separación de las plataformas australes y diferenciación concomitante, o bien mediante dispersión posterior por balseo (“rafting”) sobre algas a la deriva, una vez establecida la circulación circumpolar antártica.

La distribución geográfica de *P. purpuratus* a lo largo del sur de Sudamérica es intrigante por dos razones. En primer lugar, *P. purpuratus* es la única especie entre los Brachidontinae que se distribuye en aguas templado-frías. En segundo lugar, mientras que se extiende sobre las costas templado-cálido del Pacífico sudoriental, este no es el caso en las costas templado-cálido del Atlántico sudoccidental, donde no está presente en la Provincia Biogeográfica Argentina. En el momento del Último Máximo Glacial (UMG, ca. 23-25 cal.) las costas de Chile al sur de aproximadamente 43°S estuvieron cubiertas por masas de hielo (Ruzzante et al., 2008, su Fig. 1). Los glaciares probablemente se extendieron hacia el oeste hasta el borde de la plataforma continental, extirpando muchas poblaciones de organismos de las costas rocosas. Al mismo tiempo, la costa suroeste del Atlántico se encontraba a 200-400 km al este de su posición actual, dependiendo de la latitud (Ponce et al., 2011). Tales contrastes en la historia geológica entre la costa de Chile y Argentina parecen estar reflejados en la filogeografía de los organismos que se distribuyen en ambas regiones (Ceballos et al., 2011; de Aranzamendi et al., 2011; González- Wevar et al., 2011, 2010; Ruzzante et al., 2011), incluyendo *P. purpuratus* (Trovant et al., 2013). Se postula que la presencia de *Perumytilus* en la región templado-fría de la Provincia Magallánica es indicativa de un linaje adaptado a un régimen templado-frío, seguido por la expansión en la Patagonia este y especiación incipiente. Los resultados presentados en el Capítulo 1 sugieren poca diferenciación genética de *P. purpuratus* en el Atlántico sudoccidental (Trovant et al., 2013), tal vez indicando una expansión poblacional durante el Pleistoceno superior, en tanto la posibilidad de que *P. purpuratus* incluya especies crípticas fue insinuada por Briones et al. (2012).

Este estudio se centra principalmente en los factores históricos que subyacen a la aparente uniformidad de los mejillines intermareales que dominan las comunidades en todo el

sur de Sudamérica. Se utilizan un marcador mitocondrial y dos nucleares con el objetivo de evaluar la relación hipotética entre *Austromytilus* y *Perumytilus*, que a su vez exigió el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los Brachidontinae. Luego se consideran hipótesis filogeográficas alternativas para explicar el origen histórico de *Perumytilus*. En tercer lugar, se investiga la paradoja de una especie distribuida en dos provincias biogeográficas a lo largo de la costa del Pacífico de América del Sur, y sólo una en el lado Atlántico. Se presenta evidencia que apoya la hipótesis de la existencia de dos clados genéticamente distintos y su expansión demográfica durante el Cuaternario superior, y se introduce una hipótesis para explicar su origen histórico y distribución actual. Por último, usando nuestro caso de estudio como un ejemplo ilustrativo, se discute la pertinencia de atender a las contingencias históricas en la interpretación de los patrones de distribución ecológica y geográfica.



**Figura 2.1.** Rango latitudinal de los mejillines presentes a lo largo de las costas de Chile y Argentina. Sitios de muestreo: [1] San Marcos, Iquique; [2] La Chimba, Antofagasta; [3] Coquimbo; [4] Coliumo, Concepción; [5] La Misión; [6] Huinay; [7] Puerto Madryn; [8] Caleta Carolina; [9] Puerto Deseado; [10] Surfer Bay; [11] Bahía Ensenada (ver Tabla 2.2 para más información).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Los ejemplares de *Perumytilus* fueron recolectados de once localidades (Fig. 2.1, Tabla 2.2), seis distribuidas a lo largo del Pacífico sudoriental desde el norte de Chile (San Marcos, 20° 12' S) hasta la zona de Chiloé (Huinay, 42° 01' S) y cinco en el Atlántico sudoccidental, desde el Canal Beagle (Bahía Ensenada, 54° 49' S) y las Islas Malvinas (Surfer Bay, 51° 41' S) a Puerto Madryn (42° 46' S, Patagonia Argentina). Ejemplares de las siguientes especies también estuvieron disponibles para la secuenciación y la observación de caracteres fenotípicos de la valva (Tabla 2.1, Anexo A1): *Austromytilus rostratus* (Dunker) (Tasmania), *Brachidontes darwinianus* (d' Orbigny) (Uruguay), *B. erosus* (Lamarck) (Tasmania), *B. "exustus II" sensu* Lee y Ó Foighil (2005) (Venezuela), *B. granulatus* (Hanley) (Chile), *B. rodriguezii* (d' Orbigny) (Argentina), *Mytilisepta virgata* (Wiegmann) (Japón y Hong Kong), y *M. bifurcata* (Conrad) (California). Todas las muestras fueron fijadas en etanol al 95 %. Además, se descargaron de la base de datos de Genbank secuencias de taxones relacionados (Tabla 2.2).

### Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

La metodología de extracción, amplificación y secuenciación de ADN es similar a la detallada en el Capítulo 1, salvo que en este caso se reemplaza el marcador nuclear ITS1 por el 18S ADNr (Fig. 2.2). La razón de este cambio es que la amplificación del ITS1 presentó muchos problemas, obteniéndose en muchas oportunidades un doble pico en el espectrograma, probablemente por la presencia de múltiples copias de este gen en el genoma. La subunidad menor del ADNr (18S), de 1627 pb, se amplificó utilizando los iniciadores 22F/1789R (Medlin et al., 1988; Tabla 2.1) con una temperatura de hibridización de 52° C. Para la secuenciación del 18S ADNr se utilizaron iniciadores adicionales (18S-1F 18S-2F, 18S-3F; 18S-4F; 18S-1R, 18S-2R y 18S-3R; Goto et al., 2011; Tabla 2.1), mientras que, para el COI y el 28S se utilizaron los mismos que en la amplificación (Tabla 1.2). Cuando fue posible se secuenciaron diez ejemplares por localidad para el COI y dos especímenes por localidad para el 28S y el 18S. En total se obtuvieron 88 secuencias (55 del COI, 21 del 28S y 12 del 18S), las cuales fueron depositadas en GenBank bajo los números de acceso KJ453810 - KJ453888 y KJ598044 - KJ598052.



**Figura 2.2.** Representación esquemática de la ubicación del complejo de genes ribosomales utilizados en este capítulo: la subunidad pequeña 18S (SSU, sus siglas en inglés) y el dominio D1-D3 de la subunidad grande 28S (LSU, sus siglas en inglés).

**Tabla 2.1.** Iniciadores utilizados en este estudio para el gen 18S ADNr (los iniciadores del gen COI y 28S se detallan en el Capítulo 1, Tabla 1.2).

Gen	Nombre	Secuencia 5'--3'	Referencia
18S	22F	WAY CTG GTT GAT CCT GCC AGT	Medlin et al., 1988
	1789R	GAT CCT TCY GCA GGT TCA CCT AC	Medlin et al., 1988
	18S-1F	TAA CAA TAC GGG ACT CT	Goto et al., 2011
	18S-2F	GGA TCG CCG TAA GAC GAA CT	Goto et al., 2011
	18S-3F	TAA TTC CGA TAA CGA ACG AG	Goto et al., 2011
	18S-4F	AAG CTC GCG TTG ATT ACG TC	Goto et al., 2011
	18S-1R	GAA AGA GTC CCG TAT TGT TA	Goto et al., 2011
	18S-2R	GTT CGT CTT ACG GCG ATC CA	Goto et al., 2011
	18S-3R	TCG CTC CAC CAA CTA AGA AC	Goto et al., 2011

**Tabla 2.2.** Sitios de muestreo de mejillines utilizados en este capítulo, incluyendo los sitios de las muestras de *Perumytilus* del Capítulo 1.

<b>Especies</b>	<b>Localidad de muestreo</b>	<b>Latitud/Longitud</b>
<i>Brachidontes "exustus II"</i>	Laguna Chacopata, Península de Araya, Venezuela	10° 39' N, 63° 49' O
<i>Brachidontes erosus</i>	Taroona, Tasmania, Australia	42° 56' S, 147° 20' E
<i>Brachidontes granulatus</i>	Coquimbo, Region IV, Chile	29° 57' S, 71° 20' O
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	Santa Clara del Mar, Buenos Aires, Argentina	37° 50' S, 57° 30' O
	Bahía San Blas, Buenos Aires, Argentina	40° 32' S, 62° 15' O
	Bahía Rosas, Río Negro, Argentina	41° 01' S, 64° 06' O
	Puerto Madryn, Chubut, Argentina	42° 46' S, 65° 00' O
<i>Perumytilus purpuratus</i>	San Marcos, Iquique, Region I, Chile	20° 12' S, 70° 09' O
	La Chimba, Antofagasta, Region II, Chile	23° 33' S, 70° 23' O
	Coquimbo, Region IV, Chile	29° 57' S, 71° 20' O
	Coliumo, Concepción, Region VIII, Chile	36° 49' S, 73° 03' O
	La Misión, Valdivia, Región X, Chile	39° 47' S, 73° 23' O
	Huinay, Chiloé, Region X, Chile	42° 01' S, 72° 42' O
	Puerto Madryn, Chubut, Argentina	42° 46' S, 65° 00' O
	Caleta Carolina, Camarones, Chubut, Argentina	44° 47' S, 65° 43' O
	Puerto Deseado, Santa Cruz, Argentina	47° 44' S, 65° 53' O
	Surfer Bay, Islas Malvinas	51° 41' S, 57° 46' O
Bahía Ensenada, Tierra del Fuego, Argentina	54° 49' S, 68° 15' O	
<i>Autromytilus rostratus</i>	Taroona, Tasmania, Australia	42° 56' S, 147° 20' E
<i>Mytilisepta virgata</i>	Shek O, Hong Kong	22° 13' N, 114° 15' E
	Okinawa Prefecture, Japón	26° 38' N, 128° 01' E
<i>Mytilisepta bifurcata</i>	Alegria Beach, Hollister Ranch, California, USA	34° 28' N, 120° 17' O

**Tabla 2.3.** Secuencias de ADN utilizadas en este capítulo.

<b>Especies</b>	<b>CO1</b>	<b>28S rRNA</b>	<b>18S rRNA</b>	<b>Referencias</b>
<i>Atrina pectinata</i>	HM015792	HM015782	EF613241	Xue et al., 2012 (CO1 y 28S); Wang y Gao, datos no publicados
<i>Crassostrea gigas</i>	DQ659371	AB105362	AB064942	Cardoso et al., datos no publicados; Hosoi et al., 2004; Itoh et al., datos no publicados
<i>Austromytilus rostratus</i>	KJ453834, KJ453835	KJ453828- KJ453829	KJ453811- KJ453812	Secuencias obtenidas en este estudio
<i>Brachidontes adamsianus</i>	AY825164	AY825091	-	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes darwinianus</i>	KC844414	KC844370	-	Trovant et al., 2013
<i>Brachidontes dominguensis</i>	-	-	AF117736	Distel, 2000
<i>Brachidontes erosus</i>	-	KJ453827	KJ453810	Secuencias obtenidas en este estudio
<i>Brachidontes exustus</i> I	AY825216	AY825104	-	Lee y Ó Foighil, 2005
II	AY621900	AY825104	-	Lee y Ó Foighil, 2004
III	AY621913	AY621993	KJ453813	Lee y Ó Foighil, 2004; secuencias obtenidas en este estudio
<i>Brachidontes granulatus</i>	KJ453888	KJ453823	-	Secuencias obtenidas en este estudio
<i>Brachidontes modiolus</i>	AY621916	AY622002-	-	Lee y Ó Foighil, 2004
<i>Brachidontes mutabilis</i>	GQ480310	AB103124	AB201233	Liu y Li, datos no publicados; Hashimoto y Matsumoto, datos no publicados; Owada, 2007
<i>Brachidontes pharaonis</i>	DQ836013	-	-	Terranova et al., 2007
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	KC844478, KC844455, KC844463, KC844474	KC844460	DQ640530	Trovant et al., 2013; Santaclara et al., 2006
<i>Brachidontes semilaevis</i>	AY825117	AY825089	-	Lee y Ó Foighil, 2005
<i>Brachidontes variabilis</i>	DQ836021	AY825102	AJ389643	Terranova et al., 2007; Lee y Ó Foighil, 2005; Steiner y Hammer, 2000
<i>Geukensia granosissima</i>	AY621927	-	-	Lee y Ó Foighil, 2004
<i>Geukensia demissa</i>	-	AY622004	L33450	Kennington et al., 1995; Lee y Ó Foighil, 2004
<i>Ischadium recurvum</i>	AY621928	AY622008	-	Lee y Ó Foighil, 2004
<i>Mytilaster minimus</i>	DQ836022	-	-	Terranova et al., 2007
<i>Mytilaster solidus</i>	JF496771	-	-	Plazzi et al., 2011
<i>Mytilisepta bifurcata</i>	-	KJ453830-KJ453831	KJ453814-KJ453815	Secuencias obtenidas en este estudio
<i>Mytilisepta virgata</i>	AB076941	KJ453832-KJ453833	KJ453816-KJ453817	Matsumoto, 2003; secuencias obtenidas en este estudio
<i>Mytilus edulis</i>	AY484747	Z29550	L33448	Boore et al., 2004; Littlewood, 1994; Kennington et al., 1995
<i>Mytilus californianus</i>	GQ902240	-	-	Marko et al., datos no publicados
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	DQ917605	AB105357	L33451	Wood et al., 2007; Hosoi et al., 2004; Kennington et al., 1995
<i>Perumytilus purpuratus</i>	KC844415-KC844453; KJ453836- KJ453887	KC844374-KC844388; KJ453824-KJ453826, KJ598044- KJ598052	KJ453818-KJ453821	Trovant et al., 2013; secuencias obtenidas en este estudio
<i>Septifer bilocularis</i>	-	AJ307535	AF229622	Steiner y Hammer, 2000; Campbell, 2000

Como se señaló en el primer capítulo, algunos mitílidos tienen una forma de herencia mitocondrial conocida como ‘doble herencia uniparental’ (DUI) (Zouros et al., 1992; Skibinski et al., 1994a,b). Este fenómeno ha sido observado en algunos brachidontinos, pero no en otros (Terranova et al., 2007). Vargas Millacheo (2009) no encontró evidencia de DUI en *Perumytilus*. Para el resto de las especies que se secuenciaron en este capítulo, donde no ha sido estudiada la presencia de DUI, siguiendo a Lee y Ó Foighil (2004) se buscó minimizar el riesgo de contaminación por DNA paterno utilizando el músculo aductor posterior para la extracción.

### **Análisis filogenético**

A fin de evaluar la posible saturación de las secuencias mitocondriales se realizó una prueba de saturación de sustituciones (Xia y Lemey, 2009) en DAMBE V5 (Xia, 2013). Posteriormente se construyeron tres filogenias de los Brachidontinae, dos basadas en las secuencias nucleares del 18S y el 28S, y la otra basada en las secuencias mitocondriales del COI. Como grupos externos se utilizaron pteriormorfos no mitílidos (Pteriomorphia) (*Atrina*, Pinnidae, y *Crassostrea*, Ostreidae) y *Mytilus* spp. (Mytilidae: Mytilinae) (Tabla 2.2). Se incluyeron también otros Brachidontinae: dos especies de *Mytilaster*, *Ischadium recurvum* (como Mytilinae en Huber, 2010) y *Geukensia* spp., estos dos últimos utilizados como grupos externos por Lee y Ó Foighil (2005) en su estudio sobre las especies de *Brachidontes* del “complejo *exustus*”.

Se utilizaron dos métodos para la reconstrucción filogenética: máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. El criterio de información de Akaike (AIC), implementado en jModelTest v 2.1.5 (Darriba et al., 2012), se utilizó para seleccionar el modelo de evolución que mejor se ajusta a los datos. El modelo de sustitución que mejor se ajustó a los tres conjuntos de datos fue el modelo “*General time-reversible*” (GTR, Tavaré, 1985) + Gamma (G) + Sitios Invariantes (I). Mientras que G permite que la tasa de sustitución pueda variar entre sitios, I permite que algunos sitios no cambien, mientras que el resto de los sitios lo hacen a la misma tasa. Los análisis de máxima verosimilitud se llevaron a cabo con RAxML 7.4.2 (Stamatakis, 2006), implementado en raxmlGUI 1.3 (Silvestro y Michalak, 2012), utilizando un análisis de bootstrap rápido con 1000 réplicas. El análisis bayesiano se realizó en cada conjunto de datos utilizando BEAST v1.8 (Drummond et al., 2012) a través de una simulación de cadenas de Markov con el método de Monte Carlo (MCMC) por 20 millones

de generaciones para las dos filogenias nucleares y 80 millones para la filogenia mitocondrial; se muestrearon árboles cada 1000 generaciones y el porcentaje de árboles que fueron descartados del período inicial fue del 25%. Como modelo de árbol se seleccionó un modelo simple de Yule, recomendado para filogenias a nivel de especie. Se seleccionó un reloj molecular relajado, que admite tasas de mutación independientes en las diferentes ramas (Drummond et al., 2006). El diagnóstico de convergencia de las corridas se realizó en Tracer v1.5 (Rambaut et al., 2013), controlándose que los valores del SEE fueran confiables (>200). A partir de los árboles resultantes de las corridas MCMC se generaron los árboles de máxima credibilidad en TreeAnnotator v 1.6.1 (Drummond et al., 2012). Por último, la edición de los árboles se llevó a cabo en Figtree V 1.4 (Morariu et al., 2008).

La tasa de substitución y tiempos de divergencia fueron estimados de la matriz de secuencias mitocondriales utilizando BEAST junto con la reconstrucción filogenética. Se utilizaron dos puntos de calibración, la formación del Istmo de Panamá (Lessios, 2008) y el tiempo de divergencia entre el complejo de especies *M. edulis* y *M. californianus* (Ort y Pogson, 2007). Las calibraciones ístmicas suponen que las especies morfológicamente similares "geminadas" que viven actualmente a ambos lados del istmo fueron aisladas geográficamente por las últimas etapas del cierre de la vía marítima (Marko, 2002). Este punto de calibración se aplicó asumiendo que el tiempo de divergencia entre dos linajes geminados, *Brachidontes 'exustus II'* (Lee y Ó Foighil, 2005) y *B. semilaevis*, fue 3,1 a 3,5 Ma [distribución = normal, media = 3,3; Log (DS) = 0,2]. Ort y Pogson (2007) estimaron el tiempo de divergencia entre el complejo *M. edulis* y *M. californianus* en 7,61 Ma para el gen COX3. Con el objetivo de estimar el tiempo de divergencia para el gen COI se siguieron los mismos pasos que Ort y Pogson (2007), pero utilizando secuencias del gen COI disponibles en GenBank. Asumiendo entre *M. trossulus* y *M. edulis/M. galloprovincialis* un tiempo de divergencia (t) de 3,5 millones de años (Wares y Cunningham, 2001) y una distancia genética (d) de 0,125 y utilizando la ecuación  $\mu = (\frac{1}{2} d) / t$ , se estimó la tasa de substitución ( $\mu$ ) para la primera y segunda posición en 0,0178 substituciones por sitio por millón de años. Utilizando la distancia genética entre *M. edulis* y *M. californianus* (d= 0,333) y la tasa de substitución estimada, se calculó un tiempo de divergencia entre el complejo *M. edulis* y *M. californianus* de 9,35 Ma para el COI.

### Estructura y diversidad genética de *Perumytilus*

A fin de representar la distribución espacial de haplotipos mitocondriales se construyó una red con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo “*median joining*” (Bandelt et al., 1999), implementado en Network v 4.6.1 (Polzin y Daneschmand, 2003), con los parámetros por defecto. Una vez obtenidas las redes se editaron con el objetivo de reducir los vectores medios y conexiones innecesarias. A fin de determinar la partición que maximiza las diferencias entre los grupos se realizó un análisis de la variación molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992) implementado en Arlequin v 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). El AMOVA se realizó sobre la base de una matriz de distancia de diferencias pareadas. La significancia de  $\Phi_{ST}$ ,  $\Phi_{SC}$  y  $\Phi_{CT}$ , componentes de covarianza asociada con los diferentes niveles posibles de estructura genética (dentro de las poblaciones, entre las poblaciones, entre grupos), se calculó usando procedimientos de permutación no paramétricos con 10.000 iteraciones.

Luego de la identificación de los linajes utilizando métodos filogenéticos, se estimaron con Arlequin los índices de diversidad estándar para cada población y para cada clado: número de sitios polimórficos (S, número de posiciones en un conjunto de secuencias alineadas, donde se puede observar al menos una mutación), número de haplotipos (k, dos secuencias de ADN diferentes en al menos 1 posición), diversidad de haplotipos ( $H_d$ , medida como la probabilidad de que dos secuencias de ADN tomadas al azar sean diferentes), diversidad nucleotídica ( $\pi$ , calculada como el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias de ADN tomadas al azar), y número medio de diferencias nucleotídicas ( $\Pi$ ). Como los sitios donde se tomaron las muestras están lo suficientemente separados unos de otros, cada sitio fue considerado como una población distinta. Además, para calcular los niveles de diferenciación genética entre poblaciones, se estimaron sobre los datos de ADNmt los  $\Phi_{ST}$  pareados dentro de cada clado con 10.000 permutaciones utilizando Arlequin, y se visualizaron mediante escalamiento multidimensional (EMD) implementado en Infostat (Di Rienzo et al., 2011). La significancia de las comparaciones pareadas entre poblaciones fue calculada aplicando la corrección secuencial de Holm-Bonferroni (Holm, 1979). Por otra parte, las distancias genéticas dentro y entre los grupos se estimaron utilizando el método “*p distance*” en MEGA v5 (Tamura et al., 2011).

### Historia demográfica de *Perumytilus*

La hipótesis de neutralidad fue investigada a partir de tres enfoques:  $F_s$  de  $F_u$  (Fu, 1997),  $R^2$  (Ramos-Onsins y Rozas, 2002) y  $D$  de Tajima (Tajima, 1989). La prueba  $D$  de Tajima detecta diferencias entre los estimadores  $\pi$  ( $\pi_i$ ) y  $\theta$  ( $\theta$ ) y está basada en el modelo de Wright-Fisher, el cual supone poblaciones de tamaño constante, misma probabilidad de dejar descendencia, generaciones no solapantes, genes que no recombinan, y una población haploide o dos subpoblaciones diploides de machos y hembras. Este método fue desarrollado para determinar si el espectro de frecuencias de los polimorfismos encontrados en una matriz de secuencias es explicable bajo la hipótesis nula de evolución puramente neutral (sin selección). Se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$D = \frac{\pi - (S/k)}{\sqrt{V}}$$

$$k = \sum_{i=1}^{n-1} 1/i$$

donde el parámetro ( $\pi$ ) se refiere a la diversidad nucleotídica (Nei y Li, 1979) y el parámetro ( $\theta$ ) es calculado a partir de la expresión  $\theta = 4N_e\mu$  (Kimura, 1968). Sin embargo, es difícil tener la determinación exacta de los parámetros  $N_e$  (tamaño efectivo poblacional) y  $\mu$  (tasa de mutación), por lo que una manera indirecta de estimar  $\theta$  es utilizando  $S$ , el número total de sitios polimórficos en un grupo de secuencias,  $\theta = K/a$ , donde  $K$  es igual al número total de sitios segregativos en una muestra de secuencias dada y  $a = 1 + 1/2 + \dots + 1/n-1$  ( $n$  = número de secuencias en la muestra; Watterson, 1975; Tajima, 1983). Otro parámetro de la ecuación es  $V$ , el cual representa la varianza. En el marco del "modelo neutral" nulo, tanto la diversidad ( $S$ ) de la población como la divergencia pareada ( $\pi$ ) son generadas por el mismo proceso, la deriva genética. Como resultado se espera un  $D$  igual a cero, si se cumplen todos los supuestos del modelo neutral (Tajima, 1983, 1989). Debido a que  $S$  representa el número de sitios polimórficos pero ignora su frecuencia en la población, es sensible a la existencia de variantes raras, de baja frecuencia. Por el contrario,  $\pi$  se ve afectada más por la existencia de variantes de frecuencia intermedia, ya que estos generan diferencias entre más pares de secuencias en la muestra. Por lo tanto, la prueba  $D$  de Tajima resume la distribución de frecuencias de los sitios polimórficos, donde valores negativos indicarían un exceso de

variantes raras y valores positivos reflejarían un exceso de sitios de frecuencia intermedia. Los valores negativos de  $D$  podrían sugerir selección positiva reciente (tipo de selección natural que favorece un solo alelo) o expansión poblacional, mientras que valores positivos de  $D$  podrían significar la presencia de estructura en la población, selección negativa (la cual elimina mutaciones deletéreas de la población, por lo que los organismos con características del rango "promedio" son los que más sobreviven) o una disminución del tamaño poblacional o cuello de botella (Lemey et al., 2009).

Tanto la prueba  $D$  de Tajima como los otros dos enfoques, se calcularon en base a los datos mitocondriales del gen COI utilizando DNAsp v 5.10 (Librado y Rozas, 2009). A pesar de que se observó muy poca estructura entre poblaciones dentro del clado, los índices fueron calculados por población y clado. Los barridos selectivos y la selección en contra de mutaciones levemente deletéreas pueden dar lugar a un patrón de diversidad de haplotipos similar a la producida por una expansión poblacional (Bertorelle y Slatkin, 1995). Dado que estos análisis no pueden diferenciar entre los efectos de los procesos demográficos y la selección natural, se llevó a cabo una prueba de McDonald-Kreitman (McDonald y Kreitman, 1991), que compara la variación dentro de una especie con la divergencia entre especies. Además, para visualizar la expansión poblacional se realizó un análisis de distribución de diferencias pareadas ("*mismatch*") (Rogers y Harpending, 1992), y para cuantificar el ajuste de la distribución observada con respecto a la esperada se calculó el índice de Harpending ("*raggedness*"; Harpending, 1994). En una población que ha estado estable durante mucho tiempo la distribución de secuencias de ADN no recombinante se torna irregular y errática, mientras que una población que ha ido creciendo genera distribuciones regulares y unimodales (Harpending, 1994). En las poblaciones en expansión el valor del índice de Harpending es bajo y no significativo, mientras que por lo general es alto y significativo en poblaciones estacionarias.

La dinámica poblacional de *Perumytilus* a través del tiempo fue investigada utilizando perfiles demográficos bayesianos ("*Bayesian skyline plots*") implementados en BEAST v 1.8.0, bajo el modelo Hasegawa Kishino y Yano 85 (HKY85 + G, Hasegawa et al., 1985) seleccionado por jModelTest utilizando el criterio de información bayesiano (*Bayesian Information Criterion*, BIC). El número de cambios discretos (grupos) permitidos en la historia poblacional fue de 7 y 9 para los clados Norte y Sur, respectivamente, y el modelo elegido fue lineal por partes ("*piecewise-linear*"). El largo de la cadena fue de 80 millones de generaciones y se tomaron muestras cada 8.000 iteraciones. Se seleccionó un modelo de reloj

---

relajado, la tasa de mutación estimada para el clado *Perumytilus* (tasa= 0.19/Ma, ver resultados) y el porcentaje de árboles que fueron descartados del período inicial de 10 %. El diagnóstico de convergencia de las corridas se realizó en Tracer y se controló que los valores del SEE fueran fiables ( $> 200$ ). Además, con el fin de investigar un patrón potencial de aislamiento por distancia (Slatkin, 1993), se llevó a cabo una prueba de Mantel (Mantel, 1967) para cada clado usando el software XLSTAT v 2013.4 (Addinsoft, 2013). Esta prueba determina si existe una relación lineal significativa entre el flujo génico y la distancia geográfica de las poblaciones. Se utilizaron los valores pareados de  $\Phi_{ST}$  para estimar la tasa de migración, calculada como  $Nm = (1 - \Phi_{ST}) / (2 \Phi_{ST})$  y correlacionarla con la distancia geográfica entre poblaciones.

### **Gradientes latitudinales de temperatura superficial del mar**

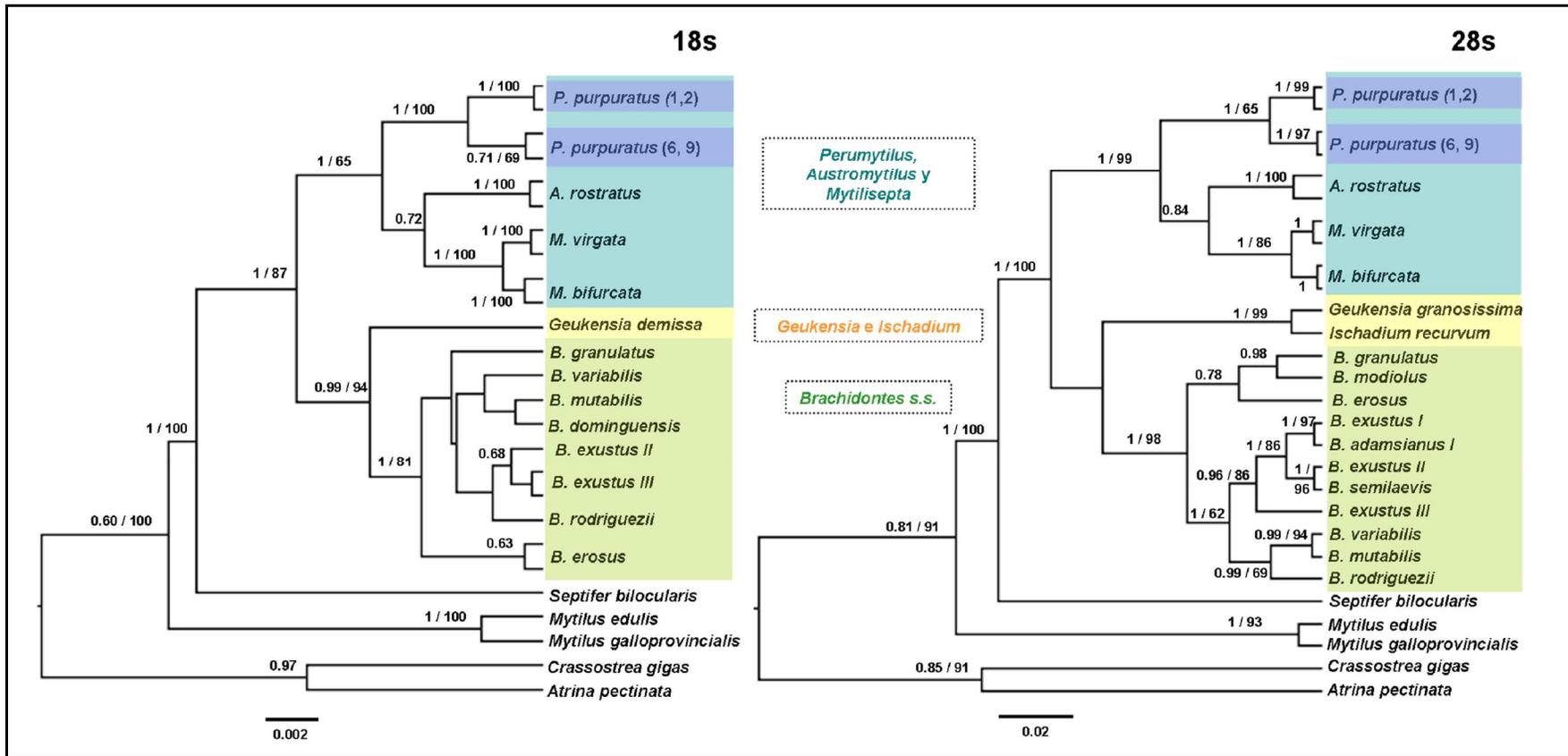
Se confeccionaron perfiles latitudinales de temperatura superficial del mar (TSM) para ambas costas del sur de Sudamérica, desde los 56° S (Cabo de Hornos) a los 20° S con la herramienta en línea PO.DAAC Ocean ESIP (POET). Los registros de TSM fueron tomados a una distancia aproximada de 3,5 a 5 Km de la costa. El promedio mensual de temperatura SST se calculó para los meses más cálidos y más fríos (respectivamente febrero y agosto) de 2008 a 2010. Las dos medias mensuales extremas se denotan, respectivamente, como SSTmax y SSTmin.

---

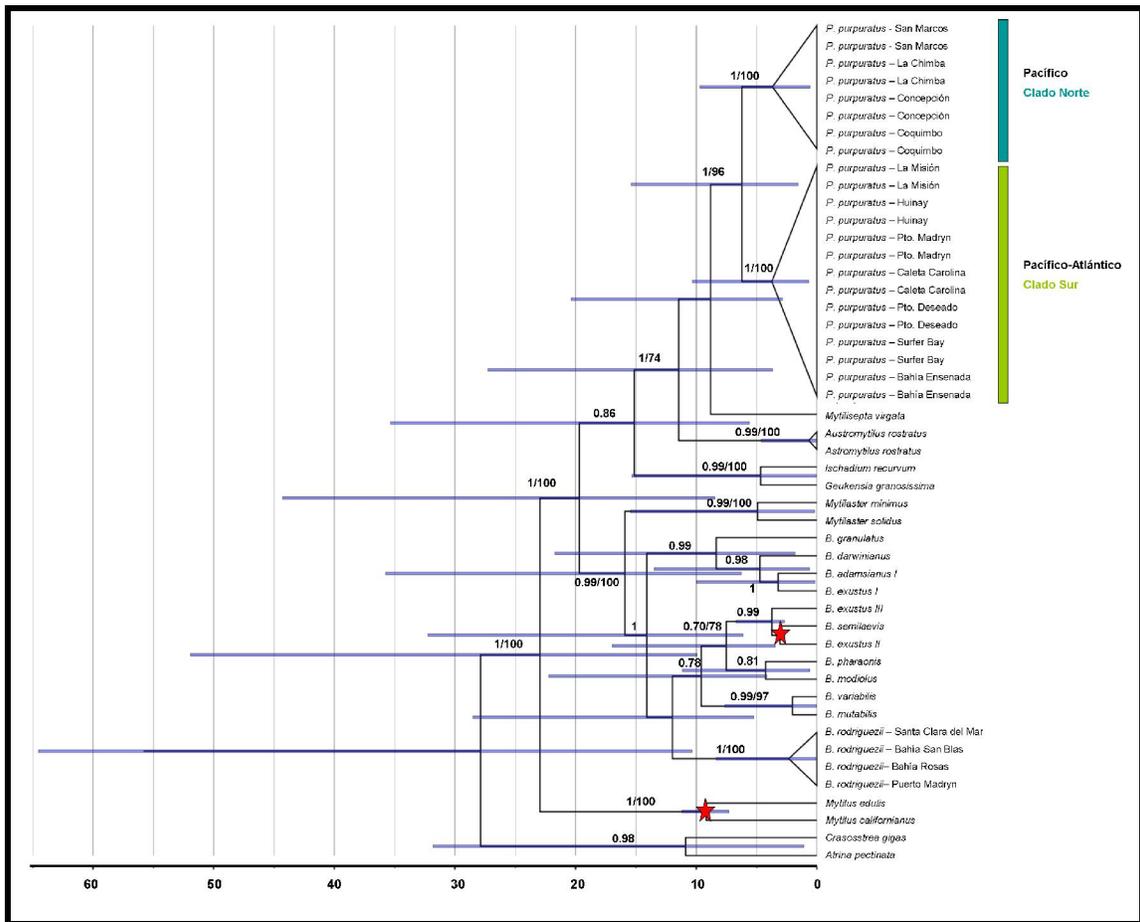
## RESULTADOS

### Filogenia de los Brachidontinae

Los árboles obtenidos con los métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana en base a los genes nucleares 18S y 28S y el gen mitocondrial COI muestran tres clados con alto soporte (Figs. 2.3 y 2.4): [i] *Austromytilus* + *Mytilisepta* + *Perumytilus* (“clado AMP”), [ii] *Geukensia* + *Ischadium* y [iii] *Brachidontes* s.l. (incluyendo a *Hormomya*) + *Mytilaster*. Mientras que la separación de los tres géneros en el clado AMP tiene un alto soporte, no hay grupos claros a nivel de género dentro de *Brachidontes* s.l. Al momento de completarse este estudio no había disponibles secuencias de 28S y 18S ADNr de *Mytilaster* disponibles en GenBank y las especies nominales no están representadas en nuestra región de estudio. El tiempo de divergencia estimada para el clado AMP fue de 11,10 Ma (95% HPD: 1,23-27,73 Ma) lo que la centra en el Mioceno Medio (Fig. 2.4).



**Figura 2.3.** Árboles bayesianos de los Brachidontinae basados en los genes nucleares 18S ADN<sub>r</sub> y 28S ADN<sub>r</sub>, utilizando *Atrina pectinata*, *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis* como grupos externos. Los números sobre las ramas representan los valores de probabilidades posteriores bayesianas / “bootstraps” de Máxima verosimilitud (sólo > 60) como soporte para los nodos. En el caso de *Perumytilus* los números entre paréntesis que siguen al nombre de las especies indican el código de la localidad de las secuencias (ver Fig. 2.1, Tabla 2.2).



**Figura 2.4.** Análisis filogenético bayesiano con los tiempos de divergencia estimados (Ma), basado en secuencias de ADN mitocondrial (COI). La longitud de la rama indica el tiempo de divergencia. Las barras indican el intervalo de credibilidad del 95% para las edades de los nodos. Las estrellas rojas indican los puntos de calibración.

## Estructura y diversidad genética en *Perumytilus*

Se utilizó un total de 89 secuencias del gen mitocondrial COI y 27 secuencias del gen 28S ADNr. Las muestras fueron recolectadas en once localidades distribuidas a lo largo de la distribución de la especie. Entre las 559 pb del alineamiento del gen mitocondrial COI, se observaron 81 sitios polimórficos (14,5%); de esos, 30 fueron sitios variables simples (37%) y 47 fueron sitios parsimoniosamente informativos (63%). Se obtuvo un total de 66 haplotipos. Los índices de saturación observados (Iss) fueron significativamente menores que los esperados (Isse) (Iss: 0,18 a 0,20 < Isse: 0,68-0,78;  $p < 0,05$ ), sugiriendo poca saturación para las secuencias mitocondriales. No se detectaron indels o codones de parada en las secuencias. Se observaron dos filogramas bien definidos, separados por 19 pasos mutacionales (Fig. 2.5). De aquí en adelante, nos referiremos a estos dos grupos como Clado Norte y Clado Sur, ya que no es posible determinar cuál de los dos es el que le correspondería el nombre específico "*purpuratus*" (para más detalles ver Anexo A2). El Clado Norte incluye secuencias de las localidades de San Marcos, La Chimba, Coquimbo y Coliumo (Chile), y el Clado Sur incluye secuencias de La Misión y Huinay (Chile), así como de Puerto Madryn y Caleta Carolina (Chubut), Puerto Deseado (Santa Cruz), Bahía Ensenada (Tierra del Fuego) y Surfer Bay (Islas Malvinas) (Argentina). El Clado Norte mostró una genealogía en forma de estrella con un haplotipo central muy frecuente (número 3); mientras que el Clado Sur dió lugar a una genealogía reticulada más expandida, con dos haplotipos muy frecuentes (número 26 y 39) (Fig. 2.5).

Los resultados del AMOVA basado en los marcadores mitocondrial (COI) y nuclear (28S) fueron consistentes entre sí; la hipótesis de panmixia fue rechazada en ambos casos (Tabla 2.4). Los análisis de AMOVA indicaron que el 82,48% (COI) y el 98,22% (28S) de la variación genética de *Perumytilus* se debió a la partición en clados Norte y Sur, lo que sugiere estructuración genética dentro de la "especie". Los grupos geográficos recuperados en este análisis (es decir los clados Norte y Sur) se tuvieron en cuenta en todos los análisis demográficos descritos a continuación.

Aunque la diversidad haplotípica fue comparable entre clados, el número de sitios polimórficos y haplotipos, la diversidad nucleotídica y el número medio de diferencias nucleotídicas fueron ligeramente superiores en el Clado Sur (Tabla 2.5). Sólo las poblaciones más aisladas del Clado Norte mostraron cierta diferenciación genética, sugerida por valores de  $\Phi_{ST}$  significativos entre San Marcos y Coliumo (Tabla 2.6). Dentro del Clado Sur, las poblaciones presentaron valores de  $\Phi_{ST}$  bajos y no significativos (Tabla 2.7). La

diferenciación genética inter- e intra-clados se visualizó por medio de un análisis de escaleamiento multidimensional (EMD, Fig. 2.6). Los clados Norte y Sur mostraron una divergencia inter-linajes del 5,8% y una divergencia intra-linaje del 0,8% y 1.5%, respectivamente.

**Tabla 2.4.** Análisis molecular de la varianza (AMOVA) de las poblaciones de *Perumytilus*. (\*): Diferencias estadísticamente significativas.

<b>Gen</b>	<b>Fuente de Variación</b>	<b>df</b>	<b>Índices de Fijación</b>	<b>% de variación</b>
COI	Entre grupos: Clado Norte vs Clado Sur	1	$\Phi_{CT}$ : 0,82*	82,48
	Entre poblaciones	9	$\Phi_{SC}$ : 0,03*	0,61
	Dentro de poblaciones	78	$\Phi_{FT}$ : 0,83*	16,91
28S	Entre grupos: Clado Norte vs Clado Sur	1	$\Phi_{CT}$ : 0,98*	98,22
	Entre poblaciones	9	$\Phi_{SC}$ : 1,00*	1,78
	Dentro de poblaciones	15	$\Phi_{FT}$ : 1,00*	0,00

**Tabla 2.5.** Índices de diversidad genética de *Perumytilus* basados en secuencias de ADNmt (COI). N: números de especímenes analizados; S: número de sitios polimórficos; k: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica;  $\Pi$ : número medio de diferencias nucleotídicas y DS: desviación estándar.

<b>Localidad</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>k</b>	<b>Hd +/- DS</b>	<b><math>\pi</math> +/- DS</b>	<b><math>\Pi</math> +/- DS</b>
1- San Marcos	11	9	8	0,94 +/- 0,05	0,004 +/- 0,003	2,32 +/- 1,37
2- La Chimba	9	18	9	1,00 +/- 0,04	0,010 +/- 0,006	4,83 +/- 2,60
3- Coquimbo	8	15	8	1,00 +/- 0,06	0,009 +/- 0,005	4,53 +/- 2,49
4- Coliumo	8	13	4	0,89 +/- 0,11	0,007 +/- 0,004	3,89 +/- 2,18
<b>Clado Norte</b>	36	35	25	0,97 +/- 0,01	0,008 +/- 0,001	3,69 +/- 1,30
5- La Misión	8	17	8	0,98 +/- 0,007	0,010 +/- 0,006	5,57 +/- 2,99
6- Huinay	8	16	7	0,96 +/- 0,07	0,009 +/- 0,005	4,35 +/- 2,40
7- Pto. Madryn	4	10	4	1,00 +/- 0,17	0,010 +/- 0,007	5,33 +/- 3,25
8- Caleta Carolina	9	14	8	0,97 +/- 0,06	0,008 +/- 0,005	4,44 +/- 2,41
9- Pto. Deseado	6	15	6	1,00 +/- 0,09	0,010 +/- 0,006	5,40 +/- 3,02
10- Surfer Bay	10	22	8	0,97 +/- 0,05	0,011 +/- 0,007	6,35 +/- 3,29
11- Bahía Ensenada	8	17	8	1,00 +/- 0,06	0,009 +/- 0,006	4,92 +/- 2,68
<b>Clado Sur</b>	53	56	41	0,98 +/- 0,007	0,011 +/- 0,0008	5,16 +/- 1,78

**Tabla 2.6.** *Perumytilus*, Clado Norte. Comparaciones entre los  $\Phi_{ST}$  pareados (debajo de la diagonal) y la distancia aproximada entre las poblaciones, en kilómetros (por encima de la diagonal). En el caso de los  $\Phi_{ST}$  pareados, a la izquierda de la barra se indican los valores de  $p$  sin corregir y a la derecha los valores con la corrección de Bonferroni-Holm. (\*): diferencias estadísticamente significativas ( $p$  inferior a su valor corregido).

<b>Clado Norte</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
1- San Marcos	-	383,12	1090,59	1859,40
2- La Chimba	0,037 (0,10/0,01)	-	707,91	1477,72
3- Coquimbo	0,000 (0,41/0,05)	0,056 (0,05/0,03)	-	770,79
4- Coliumo	0,097 * (0,006/0,008)	0,028 (0,16/0,02)	0,108 (0,013/0,010)	-

**Tabla 2.7.** *Perumytilus*, Clado Sur. Comparaciones entre los  $\Phi_{ST}$  pareados (debajo de la diagonal) y la distancia aproximada entre las poblaciones, en kilómetros (por encima de la diagonal). En el caso de los  $\Phi_{ST}$  pareados, a la izquierda de la barra se indican los valores de  $p$  sin corregir y a la derecha los valores con la corrección de Bonferroni-Holm (\*): diferencias estadísticamente significativas ( $p$  inferior a su valor corregido).

<b>Clado Sur</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>
5- La Misión	-	290,19	3107,51	2874,89	2548,49	2418,13	1745,70
6- Huinay	0,043 (0,19/0,0036)	-	2820,20	2587,58	2261,18	2130,82	1458,39
7- Puerto Madryn	0,016 (0,34/0,0063)	0,080 (0,07/0,0025)	-	233,41	559,88	1088,84	1361,81
8- Caleta Carolina	0,000 (0,65/0,012)	0,138 (0,01/0,0024)	0,068 (0,11/0,0028)	-	329,21	1914,16	1129,19
9- Puerto Deseado	0,001 (0,45/0,0071)	0,021 (0,22/0,0038)	0,000 (0,90/0,050)	0,025 (0,22/0,0042)	-		802,79
10- Surfer Bay	0,000 (0,74/0,016)	0,000 (0,48/0,0083)	0,049 (0,19/0,0033)	0,039 (0,17/0,0031)	0,017 (0,31/0,0056)	-	672,43
11- Bahía Ensenada	0,023 (0,28/0,0050)	0,038 (0,12/0,0029)	0,000 (0,63/0,010)	0,042 (0,101/0,0026)	0,000 (0,77/0,025)	0,021 (0,27/0,0045)	-

## Historia demográfica de *Perumytilus*

La hipótesis de neutralidad fue investigada para cada población dentro de cada clado. Sin embargo, debido a la falta de estructuración dentro de los clados, y dado el bajo número de muestras secuenciadas por población, sólo los resultados calculados a nivel de clado fueron considerados (Tabla 2.8). Los índices coinciden en el rechazo de la hipótesis de neutralidad en ambos clados. Los valores de  $F_s$  de  $F_u$  fueron negativos y significativos, lo cual es evidencia de un exceso en el número de alelos, como es de esperar para una población en expansión o en el caso de barrido selectivo (“*genetic hitchhiking*”, donde ciertos alelos están ligados a otros). En el caso de la prueba  $D$  de Tajima los valores negativos observados sugieren o bien que la población está en expansión o que está actuando la selección purificadora, también conocida como selección negativa. Los valores bajos de  $R_2$  también sugieren una expansión poblacional reciente.

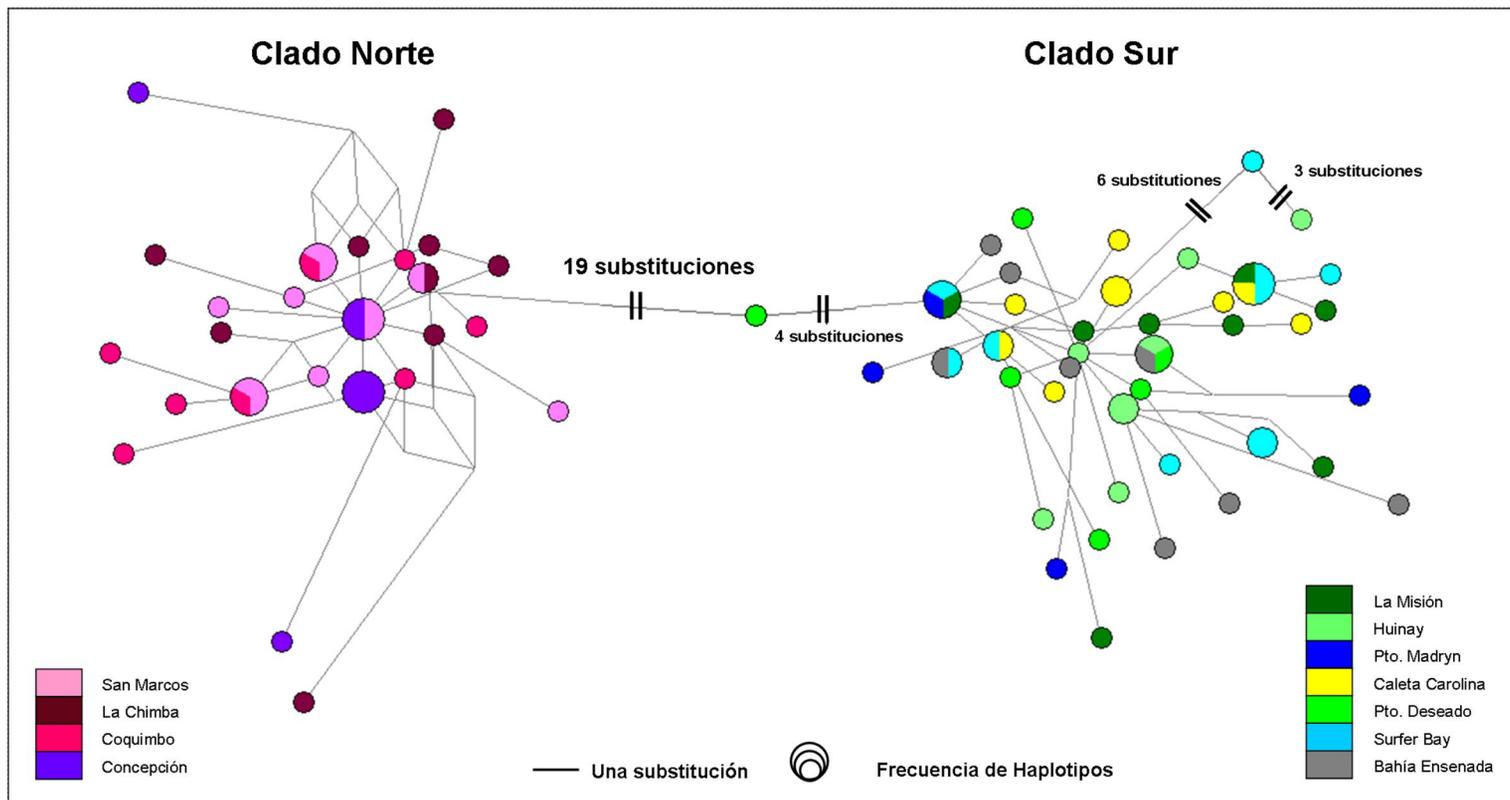
**Tabla 2.8.** *Perumytilus*: test de neutralidad por localidad y por clado. (\*) Diferencias estadísticamente significativas.  $F_s$  es considerado significativo cuando  $p < 0.02$ ; en los otros test son consideradas significativas cuando  $p < 0,05$ .

Localidad	$F_s$	D de Tajima	$R_2$
1- San Marcos	-3,89* ( $p < 0,01$ )	-1,01 ( $p = 0,18$ )	0,10* ( $p = 0,01$ )
2- La Chimba	-5,00* ( $p < 0,01$ )	-1,32 ( $p = 0,10$ )	0,10* ( $p = 0,01$ )
3- Coquimbo	-4,20* ( $p < 0,01$ )	-1,10 ( $p = 0,14$ )	0,09* ( $p < 0,01$ )
4- Coliumo	1,58 ( $p = 0,80$ )	-1,13 ( $p = 0,14$ )	0,17 ( $p = 0,34$ )
Clado Norte	-20,22* ( $p < 0,01$ )	-1,99* ( $p = 0,01$ )	0,04* ( $p < 0,01$ )
5- La Misión	-3,60* ( $p = 0,01$ )	-0,77 ( $p = 0,21$ )	0,12* ( $p = 0,04$ )
6- Huinay	-2,24 ( $p = 0,05$ )	-1,51 ( $p = 0,06$ )	0,15 ( $p = 0,21$ )
7- Pto. Madryn	-0,43 ( $p = 0,21$ )	-0,22 ( $p = 0,55$ )	0,09* ( $p = 0,01$ )
8- Caleta Carolina	-3,06 ( $p = 0,03$ )	-0,65 ( $p = 0,28$ )	0,11* ( $p = 0,03$ )
9- Pto. Deseado	-2,01 ( $p = 0,06$ )	-1,09 ( $p = 0,14$ )	0,09* ( $p < 0,01$ )
10- Surfer Bay	-1,36 ( $p = 0,18$ )	-0,86 ( $p = 0,20$ )	0,12 ( $p = 0,11$ )
11- Bahía Ensenada	-3,95* ( $p = 0,01$ )	-1,28 ( $p = 0,11$ )	0,16 ( $p = 0,53$ )
Clado Sur	-41,40* ( $p < 0,01$ )	-2,03* ( $p < 0,05$ )	0,05* ( $p < 0,01$ )

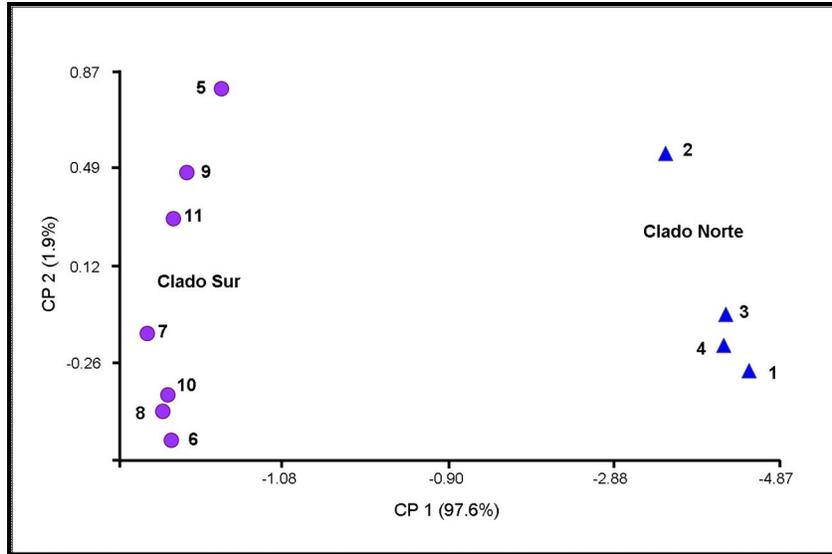
Con el objetivo de visualizar la expansión poblacional sugerida por los otros índices, se realizó un análisis de distribución de diferencias pareadas (“*mismatch*”). Los dos clados exhibieron distribuciones unimodales con un solo pico (Fig. 2.7), un patrón frecuente bajo un modelo de expansión poblacional. Estos resultados también fueron apoyados por valores bajos y no significativos del índice de Harpending (“*raggedness*”). La tasa de mutación estimada para *Perumytilus* fue de 0,19 sustituciones/Myr. Asumiendo esa tasa, la expansión del Clado Norte habría comenzado hace 15 ka (final del Pleistoceno), y continuó durante el Holoceno y la actualidad (Fig. 2.7a). En el caso de Clado Sur, el cambio más grande en el tamaño de la población se habría producido durante el Holoceno, 11,5 a 3,5 ka, y el Reciente (Fig. 2.7b). La prueba de McDonald-Kreitman (MK) no pudo ser calculada debido al bajo número de sustituciones no sinónimas y polimorfismos fijos que exhibían los clados. A modo exploratorio, se llevó a cabo una prueba de MK entre cada clado y otro brachidontino, *B. rodriguezii*. La relación de las diferencias fijas no sinónimas y sinónimas entre las especies fue mayor que la proporción de las diferencias de polimorfismos no sinónimos y sinónimos dentro de las especies (Clado Norte: *B. rodriguezii*: 21/54 > 5/59; Clado Sur: *B. rodriguezii*: 21/52 > 2/61). Estos resultados sugieren una fuerte selección direccional actuando a una escala más profunda en la filogenia. Finalmente, la prueba de Mantel mostró que no existe correlación entre distancia genética y geográfica en ninguno de los dos clados (Clado Norte:  $r = 0,15$ ,  $p > 0,05$ ; Clado Sur:  $r = 0,06$ ,  $p > 0,05$ ).

### **Distribución de los clados de *Perumytilus* relativos a los gradientes térmicos latitudinales**

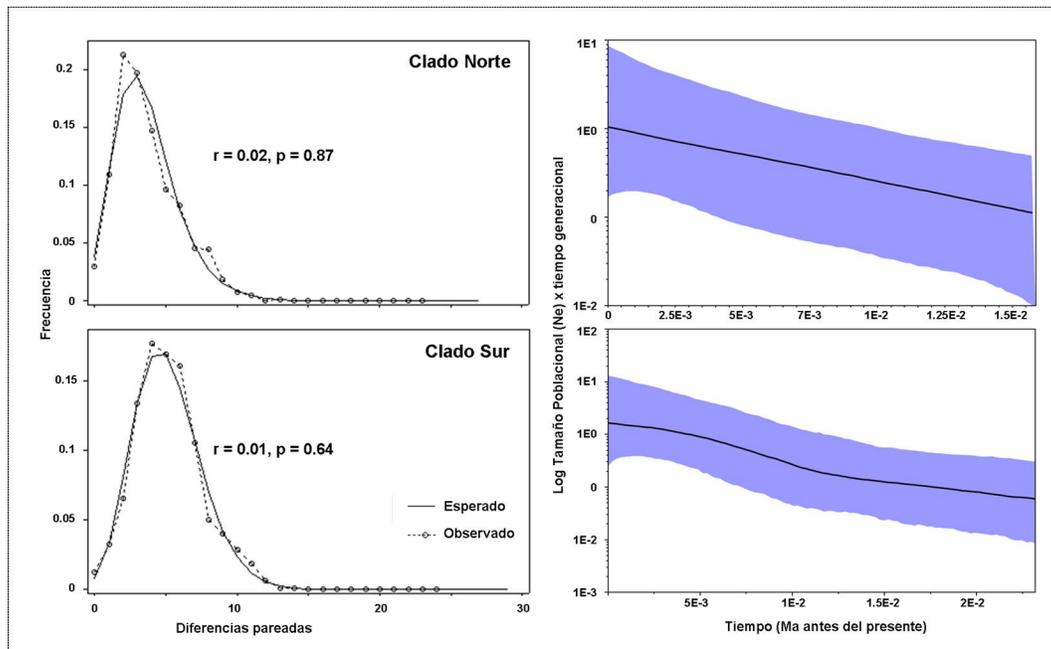
Los perfiles climatológicos latitudinales de temperatura superficial del agua fueron utilizados para caracterizar la distribución de los clados de *Perumytilus* a lo largo de ambas costas de Sudamérica. El rango latitudinal de distribución de los clados a lo largo de la costa del Pacífico se asocia claramente con la temperatura superficial del mar (TSM, Fig. 2.8): los individuos del Clado Norte no se encuentran donde la  $TSM_{\min}$  (agosto) cae por debajo de 10°C, mientras que, los individuos del Clado Sur se pueden encontrar a una  $TSM_{\min}$  tan baja como 2,82°C (Surfer Bay, Islas Malvinas). La temperatura durante el mes más cálido también parece estar correlacionada con la distribución de los dos clados de *Perumytilus*. Los miembros del Clado Sur fueron obtenidos solo donde  $TSM_{\max} \leq 14,2^\circ\text{C}$  en el Pacífico (La Misión, 39° S) y  $TSM_{\max} \leq 17,6^\circ\text{C}$  en el Atlántico (Puerto Madryn, 43° S), mientras que, los del Clado Norte se pueden encontrar en aguas tan cálidas como 21,7°C en el lado del Pacífico (San Marcos, 20° 12 'S).



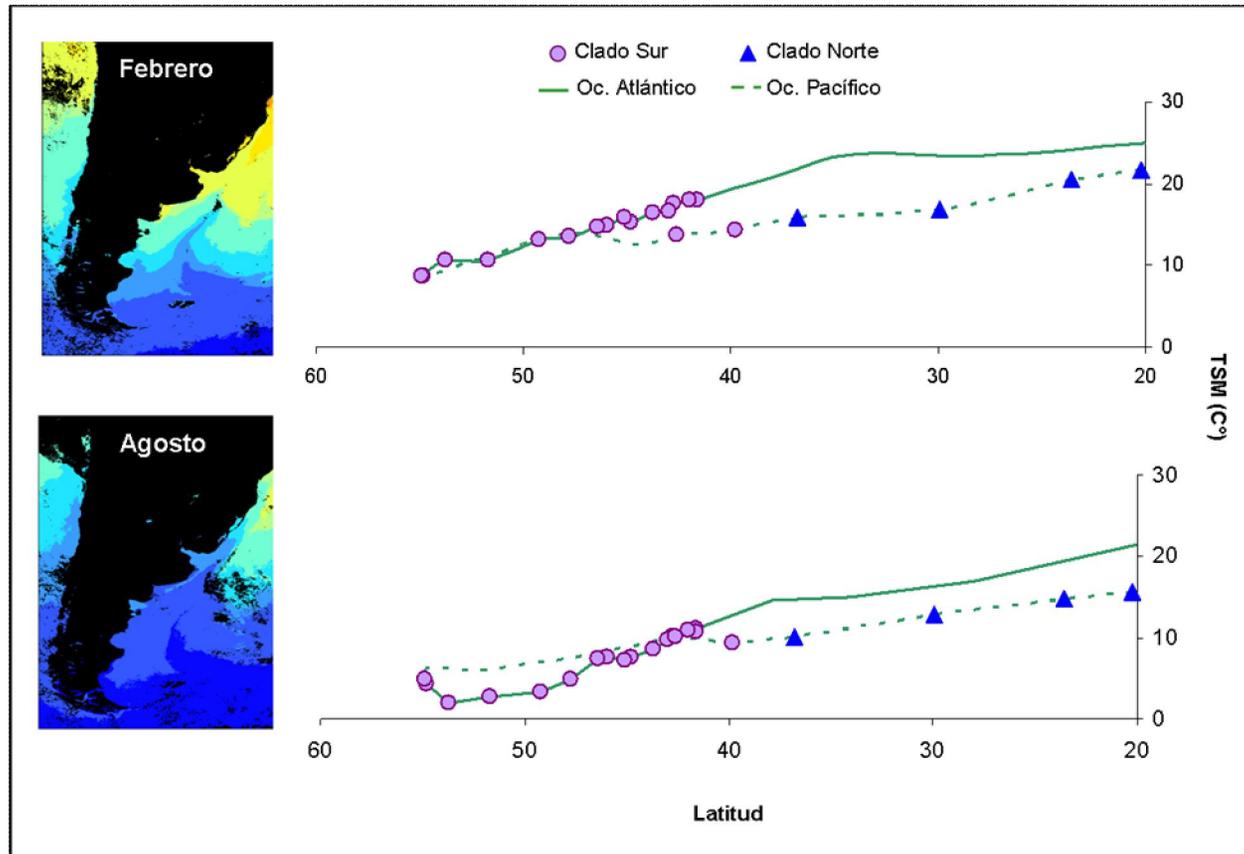
**Figura 2.5.** Red de haplotipos de *Perumytilus* basada en el gen mitocondrial COI. Cada haplotipo es representado por un círculo cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia; los colores indican la localidad de origen (ver Figura 2.1 y Tabla 2.2 para más información).



**Figura 2.6.** Análisis de escalamiento multidimensional (EMD) utilizando los  $\Phi_{ST}$  pareados calculados con las secuencias mitocondriales de *Perumytilus*. (▲) Clado Norte, (●) Clado Sur. Los números corresponden a las localidades que se muestran en la Figura 2.1.



**Figura 2.7.** Distribución de diferencias pareadas (“mismatch”) (izquierda) y perfiles demográficos bayesianos (“bayesian skyline plots”) (derecha). La distribución de diferencias pareadas muestra las frecuencias observadas (línea punteada) y esperadas bajo un modelo de expansión súbito (línea continua); índice de Harpending (“raggedness”,  $r$ ) y valores de  $p$ . Los perfiles demográficos bayesianos muestran el tamaño efectivo de la población estimado (log) por tiempo generacional, a través del tiempo (Ma); línea punteada: valores medios, banda sombreada: intervalo de confianza del 95%. Arriba: Clado Norte, abajo: Clado Sur.



**Figura 2.8.** Gradientes latitudinales de la temperatura superficial del mar (TSM, 2008-2010) a lo largo de ambas costas de Sudamérica austral para el mes más cálido (febrero, arriba) y el mes más frío (agosto, abajo), indicando las localidades donde se tomaron muestras de *Perumytilus*.

## DISCUSIÓN

### Relaciones filogenéticas y filogeográficas de los brachidontinos del sur de Sudamérica

Dentro de los Brachidontinae los análisis recuperaron tres clados con alto soporte: [i] *Austromytilus* + *Mytilisepta* + *Perumytilus* (AMP), [ii] *Ischadium* + *Geukensia* y [iii] *Brachidontes* s.l. El género *Mytilisepta* generalmente se ha considerado por autores no japoneses (incluyendo Huber, 2010) como miembro de los Septiferinae, e incluso como sinónimo menor de *Septifer* Récluz. La filogenia basada en el gen mitocondrial COI (Matsumoto, 2003) indicó que *Mytilisepta virgata* y *Septifer excisus* pertenecen a diferentes clados, apoyando la retención de *Mytilisepta* como un género distinto ubicado dentro de los Brachidontinae, lo cual es confirmado por los resultados de este estudio. Esto implica que el tabique que sirve para la inserción del músculo aductor en *Septifer* y *Mytilisepta* (Anexo A1) sería una homoplasia que evolucionó independientemente en los dos linajes.

Dado que los mejillines están ausentes en Nueva Zelanda y no están tampoco representados allí en el registro fósil (Fleming, 1959; Beu, 2006), es razonable hipotetizar que los brachidontinos evolucionaron después de que Nueva Zelanda se separara durante el Cretácico tardío (80 Ma; Sanmartin y Ronquist, 2004). Los miembros del clado AMP se distribuyen en las regiones templadas del Océano Pacífico: *Austromytilus* en el suroeste, *Perumytilus* en el sureste y *Mytilisepta* en el norte. En los árboles basados en genes nucleares se observa que en primer lugar se separó *Perumytilus*, y posteriormente *Austromytilus* y *Mytilisepta*, sin embargo en el árbol basado en el gen mitocondrial COI no ocurre lo mismo. El tiempo de divergencia estimado ubica a la radiación del clado AMP en el Mioceno Medio. Los tiempos de divergencia se estimaron utilizando dos puntos de calibración, uno de ellos correspondiente a la formación del istmo de Panamá. La edad de cierre del istmo y sus implicaciones biogeográficas ha sido un tema de reciente debate (Stone, 2013). Mientras la hipótesis generalizada del cierre completo durante el Plioceno (3,1 a 3,5 Ma, utilizado en nuestra calibración) es apoyada por un importante cuerpo de evidencia (e.g. Jackson y O'Dea, 2013), estudios recientes han postulado un cierre muy anterior (Montes et al., 2012). Sin embargo, incluso los defensores de un cierre temprano admiten que las conexiones interoceánicas poco profundas pueden haber persistido durante el Plioceno. Las especies de *Brachidontes* se distribuyen en la zona intermareal y en los manglares, hábitats que pueden ser considerados en un escenario de conexiones interoceánicas poco profundas (Lee y Ó Foighil, 2005).

Aun cuando hay mucha incertidumbre asociada con las estimaciones de los tiempos de divergencia sobre la base de los datos moleculares, esas estimaciones son consistentes con los patrones biogeográficos e información ecológica en el apoyo a la hipótesis de una división entre los dos linajes antes del Mioceno medio, y después de la apertura del canal de Tasmania durante el Oligoceno (ca. 31 Ma; Nelson y Cooke, 2001), una vez que la circulación circumpolar fue establecida. Existe mucha evidencia sobre el papel de la Deriva de los Vientos Occidentales (“*West Wind Drift*”, WWD), corriente superficial impulsada por los fuertes vientos del oeste que circundan la Antártida, en la dispersión de organismos marinos a través del Pacífico (Waters, 2008). La dispersión de los organismos bentónicos a lo largo de la WWD se ve facilitada en gran medida por el balseo (“*rafting*”) sobre algas a la deriva (Zucarello et al., 2008; Nikula et al., 2010; Fraser et al., 2013). *Perumytilus* y *Austromytilus*, sin embargo, no parecen ser candidatos para el balseo, en parte debido a que se encuentran comúnmente en la zona intermareal-media - de las costas rocosas, por encima del nivel de marea donde las algas como *Durvillaea* o *Macrocystis* se suelen fijar. Thiel y Gutow (2005) compilaron una lista de 1,205 especies para las que se confirmó o pudo inferirse balseo. A pesar de que los autores examinaron el balseo en detalle a lo largo de las costas de Chile, *Perumytilus* no estuvo incluido entre las especies encontradas. Otro indicativo de un potencial limitado de dispersión a medio o largo alcance es la ausencia de *Austromytilus* en Nueva Zelanda, mientras que otros géneros de mitílidos (e.g. *Limnoperna*, *Mytilus*) se encuentran a ambos lados del mar de Tasmania. *Perumytilus* está también ausente en el archipiélago de Juan Fernández, 580-720 km al oeste de la costa de Chile, a pesar de contar con hábitats y régimen térmico apropiados (Ramírez y Osorio, 2000). En la zona intermareal de las costas rocosas de Nueva Zelanda, el espacio ecológico normalmente ocupado por miembros del clado AMP está ocupado por *Limnoperna pulex* (Lamarck) (Arcuatulinae), también presente en las islas Antípodas, Tasmania y en las costas del sur de Australia (ver Colgan y da Costa, 2013). *Limnoperna* está bien representada en Nueva Zelanda desde el Mioceno (Beu, 2006). Con la excepción de las Islas Malvinas (relativamente cerca del sur de Sudamérica), los brachidontinos están ausentes en todas las islas subantárticas oceánicas bajo la influencia de la WWD.

La vicarianza, hipótesis frecuente en los animales que muestran un patrón gondwánico (Sanmartín y Ronquist, 2004), ofrece una alternativa a la dispersión. La vicarianza invocaría un ancestro común distribuido a lo largo de las costas del sur de Australia, la Antártida occidental y el suroeste de América del Sur antes de la pérdida de la conexión entre las

plataformas de los continentes y tras la apertura del Pasaje de Drake durante el Eoceno medio (ca. 41 Ma; Scher y Martin, 2006). Tal hipótesis supondría que los brachidontinos existieron una vez en la Antártida, pero que luego se extinguieron. En el Eoceno de la Antártida se han registrado dos brachidontinos fósiles (Beu, 2009), pero sobre la base de caracteres morfológicos de la valva no parecen estar relacionados con el clado AMP.

Si bien la hipótesis de dispersión trans-Pacífica de *Austromytilus* o *Perumytilus* (o un ancestro común putativo) no es admitida en los escenarios hipotetizados, el registro fósil tampoco ofrece soporte para una conexión gondwánica involucrando a la Antártida. Una tercera alternativa sería la dispersión en un escenario temprano de la WWD durante el Oligoceno tardío o Mioceno temprano, posteriores a los eventos de fragmentación de Gondwana (Burrige et al., 2012), pero cuando las distancias entre las costas de los distintos fragmentos eran menores que en la actualidad.

### **Clados Norte y Sur de *Perumytilus***

El análisis de las secuencias mitocondriales (COI) y nucleares (28S y 18S) indicó que el género monotípico *Perumytilus* incluye dos linajes divergentes. Las muestras de la costa chilena entre 20° S y 36° S corresponden al Clado Norte, mientras que las provenientes de localidades al sur de 39° S en el Pacífico (Chile) y de 42° S en el Atlántico (Argentina) corresponden al Clado Sur. Estos resultados fueron coincidentes con los revelados por la red de haplotipos, el análisis de distancias genéticas (COI) y el AMOVA (COI y 28S). Los resultados apoyan la hipótesis de que *P. "purpuratus"* en realidad se compone de dos grupos genéticamente distinguibles. Este hallazgo fue sugerido previamente por Briones et al. (2012). En su estudio ellos realizan observaciones en tres localidades de la costa chilena y encuentran coincidencia geográfica entre la variación de la morfología de los espermatozoides y un marcador molecular (16S), identificando dos grupos, uno al norte (Antofagasta y Valparaíso) y otro al sur (Valdivia). Estos grupos se ubican en el rango latitudinal de los clados identificados en este estudio, los cuales son apoyados por tres marcadores adicionales y una amplia cobertura geográfica. Considerando los objetivos de este trabajo, la resolución del problema taxonómico planteado por la existencia de dos linajes de *P. "purpuratus"* (Anexo A2) va más allá del alcance de este estudio.

Teniendo en cuenta que los Brachidontinae, con excepción del Clado Sur de *Perumytilus*, se distribuyen en los mares cálidos y templado-cálidos, se postula que *Perumytilus* se originó en la región templado-cálida del Pacífico sudoriental, que coincide con

el rango latitudinal del Clado Norte. Esta hipótesis es consistente con el registro paleontológico; los registros fósiles más antiguos de *Perumytilus* corresponden al Pleistoceno temprano del norte y centro de Chile, desde Coquimbo a Antofagasta (Fig. 9, 10A, Anexo A3) (Herm, 1969; Ortlieb et al., 1996; Kiel y Nielsen, 2010). La diferenciación del Clado Sur puede haberse iniciado por una expansión gradual del rango hacia el sur de Sudamérica (la llamada Provincia Biogeográfica Magallánica) y la adaptación simultánea de poblaciones marginales a un régimen térmico templado-frío, dando lugar a una incipiente diferenciación peripátrica (Fig. 2.10B). La estimación del tiempo de divergencia entre los dos clados en aproximadamente 2-3 Ma, correspondiente a Plioceno tardío / Pleistoceno temprano, es compatible con esa hipótesis. El aislamiento de los dos clados durante el Cuaternario probablemente haya ocurrido como resultado de la extirpación de *Perumytilus* de gran parte del sur de Chile, cuando esa región fue cubierta por hielo repetidamente (Rabassa et al., 2005), resultando en una división de las poblaciones de las costas no glaciadas de Chile Central y de la costa atlántica de la Patagonia (Figs. 2.9, 2.10C, Anexo A2). Además de ser vulnerables a la presencia de grandes masas de hielos sobre las costas, al igual que otros invertebrados intermareales epibentónicos, su preferencia térmica limitaría su persistencia incluso en los enclaves no glaciados dentro de las áreas glaciares. La temperatura superficial mínima en la que se encuentra presente el Clado Sur como el mitílido intermareal dominante es de 4°C (TSM<sub>min</sub>). A lo largo de las líneas costeras más frías, *Perumytilus* es reemplazado por *Mytilus* sp. (mejillón) y *Aulacomya atra* (cholga) (M. Adami, resultados no publicados), y no es frecuente encontrarlo en el Holoceno de la región fueguina (Gordillo, 1999; Gordillo et al., 2005). Además, *Perumytilus* está ausente en un ensamble templado-frío atribuible al último interglaciar de la Región Fueguina (Isla Navarino, 54° 56' S), que ha sido bien documentado por Gordillo et al. (2010). La hipótesis de un refugio en las costas de la Patagonia Atlántica, las cuales nunca fueron glaciadas (Rostami et al., 2000), es consistente con los primeros registros de *Perumytilus* en esa región, que se corresponden con el último interglaciar (Sangamon, Pleistoceno superior, ca. 110-130 Ka), de muchos sitios entre Cabo Raso (44° 20' S) y San Julián (49° 20' S). Los moluscos de estos sitios siguen habitando en la actualidad en la Provincia Magallánica (Feruglio, 1950; Aguirre et al., 2005, 2006 a,b, 2009).

La hipótesis que se propone es que el Clado Sur se expandió hacia el sureste de Chile desde las costas no glaciadas del Atlántico sudoccidental cuando las masas de hielo retrocedían durante los periodos interglaciares (Fig. 2.10D). El último de esos retrocesos tuvo lugar luego del último máximo glaciar (“*Last Glacial Maximum*”, UMG) hace

aproximadamente 18-20 ka (Rabassa et al., 2000). Esto podría haber generado una zona de contacto secundario entre los dos clados en un rango latitudinal relativamente estrecho, donde actualmente se observa el reemplazo de un clado por otro (Fig. 2.10D). Esta zona de contacto no ha sido investigada. A lo largo de la costa chilena, Tellier et al. (2009) documentaron una zona de contacto estrecha entre dos clados del alga *Lessonia nigrescens* entre 29° 30' S y 30° 14' S. En esa región, los ejemplares en cada localidad de muestreo pertenecían a uno u otro de los dos clados sin evidencia de introgresión o hibridación, indicativo de dos especies totalmente aisladas que probablemente evolucionaron a través de especiación parapátrica o incipiente. Una situación similar podría ocurrir en la zona de contacto secundaria entre los dos clados de *Perumytilus*, teniendo en cuenta que la diferencia en la morfología de los espermatozoides descrita por Briones et al. (2012) puede ser indicativa de aislamiento reproductivo. La aparición de zonas de contacto secundario o zonas híbridas seguidas de contracción del rango en refugios durante el máximo glacial y la posterior expansión durante interglaciares es un fenómeno bien documentado (Waters, 2011; Waters et al., 2013).

Existen otros dos casos documentados de una zona de reemplazo entre clados que son coincidentes con los de *Perumytilus*, y ambos corresponden a organismos asociados a costas rocosas. El primer caso es el quiebre filogeográfico norte-sur documentado para el alga *Durvillaea "antarctica"* entre los 36° 36' S (cerca de Concepción) y 39° 49' S (cerca de Valdivia) por Fraser et al. (2009). Este rango latitudinal coincide con el quiebre filogeográfico observado entre los dos linajes de *Perumytilus*. Los dos linajes de *Durvillaea* corresponden a especies diferentes, una que se distribuye a lo largo de las costas templado-cálidas del centro de Chile, y la otra con una amplia distribución circumpolar subantártica, incluyendo el sur de Chile y la mayoría de las islas subantárticas (Fraser et al., 2010). El segundo caso corresponde a los clados del alga roja *Mazzaella laminarioides* (Montecinos et al., 2012). El reemplazo entre los clados del sur y del centro de *Mazzaella* está situado en la región de Arauco (37° S-38° S), anidado dentro del rango latitudinal donde se produce el reemplazo entre los clados de *Perumytilus* y *Durvillaea*. Montecinos et al. (2012) hipotetizan que el clado sur de *Mazzaella* se originó en un refugio glacial durante el Pleistoceno, desde donde habría colonizado las costas del sur de Chile durante el último post-glacial. A diferencia de *Perumytilus*, el rango actual de *Mazzaella* no se extiende sobre el Atlántico sudoccidental (Boraso de Zaixso, 2013), por lo que un refugio en el este de la Patagonia no fue considerado. Estos tres casos ilustran un conjunto de procesos plausibles que conducen a una zona de contacto entre los linajes de organismos que se distribuyen en las costas rocosas templado-cálidas y templado-frías. Los

tres casos se diferencian en la supuesta fuente del linaje templado-frío: en el caso de *Perumytilus* (este estudio) un refugio en las costas no glaciadas de la Patagonia Atlántica, en *Mazzaella* refugios no glaciados en el sur de Chile (Montecinos et al., 2012), y en *Durvillaea* áreas no glaciadas fuera de América del Sur, arribando vía la WWD (Fraser et al., 2009). Los patrones filogeográficos resultantes de las glaciaciones cuaternarias del sur de Sudamérica no pueden ser explicados bajo un único modelo.

El hallazgo de que el género monotípico *Perumytilus* se compone de dos linajes adaptados a diferentes regímenes térmicos resuelve la aparente paradoja de una especie que se distribuye a lo largo de la región templado-cálida del Pacífico Sudoriental, pero no en la misma región templado-cálida del Atlántico Sudoccidental. El rango latitudinal / térmico del Clado Sur de *Perumytilus* es consistente a lo largo de ambas costas del sur de Sudamérica, con su límite norte definido por una TSM de aproximadamente 13° C. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la TSM, por lo general tratado como un sustituto de los regímenes térmicos experimentados por los organismos marinos, es un indicador poco preciso en el caso de los organismos intermareales (Helmuth, 2009). Al norte de esa frontera aproximada, el Clado Sur es reemplazado por el Clado Norte en el Pacífico y por la especie templado-cálida *Brachidontes rodriguezii* en el Atlántico (Trovant et al., 2013), donde las dos especies se entremezclan en los mismos bancos dentro del rango 41° -43° S (Trovant et al., 2013). Teniendo en cuenta que el linaje que dio origen a *B. rodriguezii* podría haber estado presente en esa región por lo menos desde el Mioceno superior (Capítulos 1 y 4; Trovant et al., 2013), es probable *Perumytilus* no se encuentre en la zona templado-cálida debido a un proceso de "bloqueo por alta densidad" (Waters, 2011; Waters et al., 2013). Esto podría explicar por qué *Perumytilus* no amplió su rango hacia el norte en el Atlántico, incluso cuando no existen barreras a la dispersión y pese a que parece ser adaptable a un amplio rango de regímenes térmicos templados.

### **Diversidad genética en *Perumytilus***

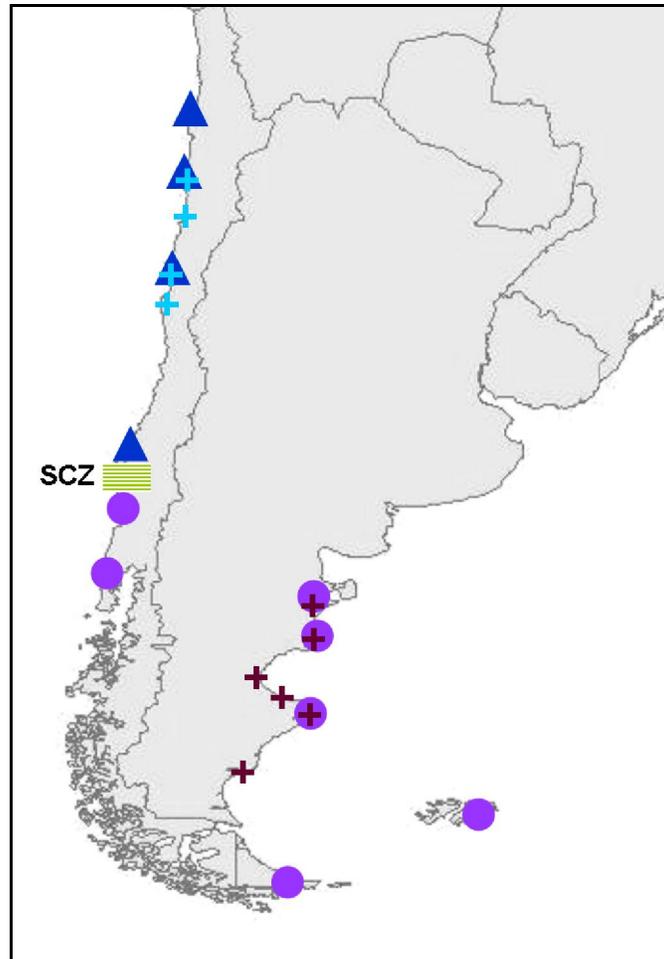
Mientras que el Clado Sur no exhibió estructura genética a lo largo de una gran área geográfica, el Clado Norte mostró algo de estructura genética en un área geográfica mucho más reducida. Fraser et al. (2010) observaron poca estructura en el alga *Durvillaea antarctica* en el sur de Chile (49° -56° S), y alta estructuración al norte de los 44° S. Las poblaciones de las regiones templado-cálidas tienen mayor estructura filogeográfica debido a la supervivencia y a su divergencia en momentos en que las poblaciones que se encontraban en

latitudes más altas estuvieron expuestas a los efectos de la glaciación. En muchos casos la región de latitud más baja dentro del rango de una especie funcionó como un refugio, desde donde las poblaciones se expandieron hacia regiones de mayor latitud durante la recolonización postglacial (Provan y Bennett, 2008). En general, las especies de climas templados son genéticamente menos diversas en latitudes más altas, a las que se expandieron durante las de-glaciaciones, pero esto varía con el lugar y el entorno geográfico (Hewitt, 2004; Provan y Bennett, 2008). Este tipo de evidencia es consistente con la hipótesis que postula que durante el último máximo glacial la costa central y norte de Chile actuó como un refugio para varios taxones marinos (Fraser et al., 2010), posiblemente incluyendo el Clado Norte de *Perumytilus*.

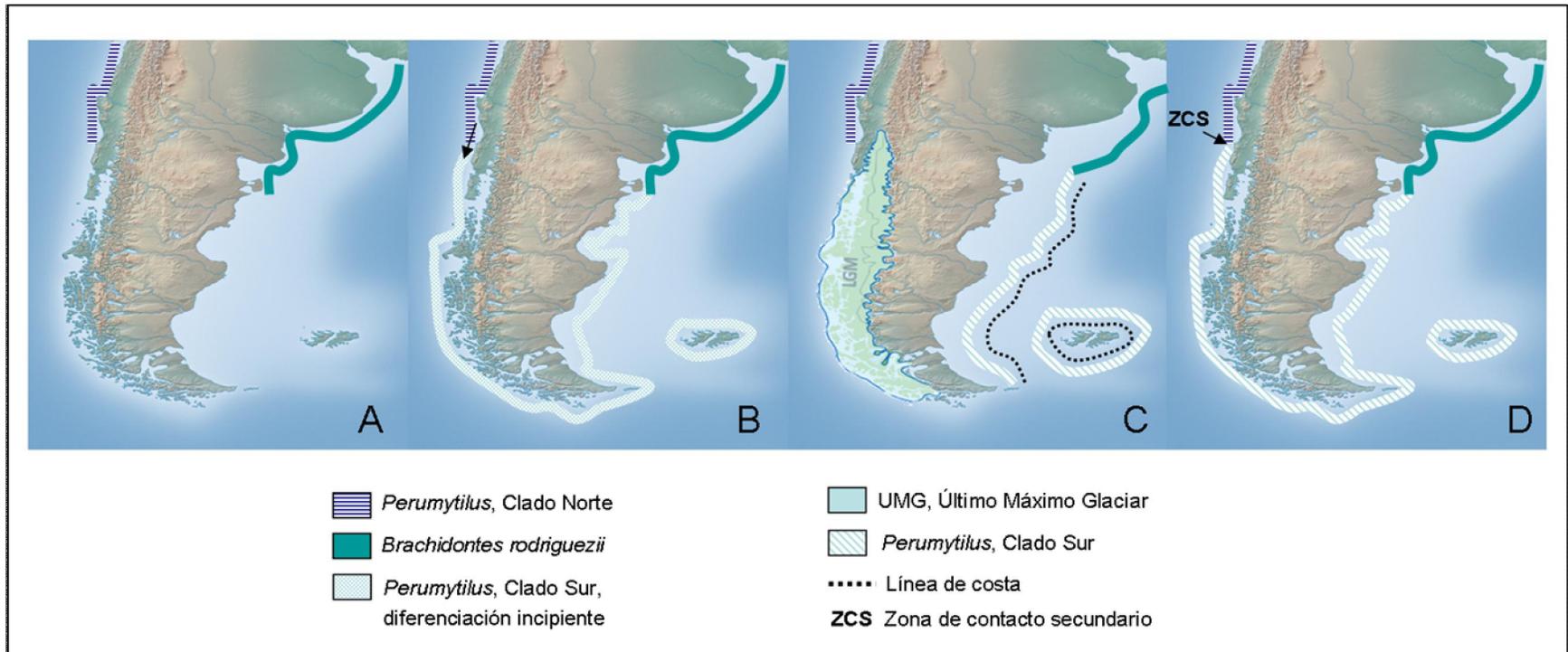
La ausencia de estructuración, observada en el Clado Sur, podría ser también explicada como el resultado de flujo génico, incluso en ausencia de una reciente expansión y separación en sub-poblaciones. En tanto se espera que las larvas pelágicas faciliten el flujo génico en ambientes advectivos (Kelly y Palumbi, 2010; Selkoe y Toonen, 2011), estudios recientes sugieren que la retención de las larvas es más frecuente de lo que se pensaba anteriormente (Levin, 2006). No obstante, los valores de  $\Phi_{ST}$  bajos y no significativos, baja diversidad nucleotídica junto con alta diversidad de haplotipos, falta de correlación entre la distancia genética y geográfica, y el rechazo de la hipótesis de neutralidad, sin evidencia de selección en el marcador COI, sugieren que la falta de estructura del Clado Sur de *Perumytilus* se debe a una reciente expansión poblacional.

La hipótesis de expansión poblacional rápida de *Perumytilus* en el Atlántico sudoccidental luego del Último Máximo Glacial (UMG) está bien demostrada en otros dos casos: la lapa *Nacella magellanica* (de Aranzamendi et al., 2011; González-Wevar et al., 2011) y un pez costero, *Eleginops maclovinus* (Ceballos et al., 2011). Durante el UMG las costas del Atlántico sudoccidental, que nunca estuvieron glaciadas durante el Cuaternario, se ubicaban al este de su posición actual (Fig. 2.10; Rostami et al., 2000); la mayor parte de la plataforma patagónica quedó expuesta, formando extensas planicies (Ponce et al., 2011). Estas últimas se inundaron gradualmente después del UMG, un periodo durante el cual los paisajes costeros estuvieron presumiblemente dominados por costas bajas y ambientes de depósito (Fray y Ewing, 1963). Las costas de sustratos duros y rocosos fueron hábitats localizados, presumiblemente habitados por ensamblajes no saturados. Este fue el escenario ecológico probablemente encontrado por poblaciones de organismos en expansión, como *Perumytilus* y *Nacella*, en el periodo post-UMG. La instauración de los ensamblajes parece

persistir aún en nuestros días, como lo atestiguan las ausencias conspicuas notadas por los ecólogos que estudiaron las comunidades de costas rocosas (Olivier et al., 1966a, 1966b).



**Figura 2.9.** Registros fósiles existentes y muestras secuenciadas de *Perumytilus*. [+] Registros fósiles más antiguos para el centro-norte de Chile y para el este de la Patagonia. [●] muestras genotipadas del Clado Sur, [▲] *Ibid.*, Clado Norte. ZCS Zona de contacto secundario.



**Figura 2.10.** Eventos hipotéticos que habrían conducido a la especiación en *Perumytilus*. (A) Plioceno Tardío/Pleistoceno temprano: Clado Norte limitado a la región templado-cálida del sureste del Pacífico. (B) iniciación de la diferenciación peripátrica del Clado Sur después de la expansión en la Provincia Magallánica templado-fría. (C) las glaciaciones del Pleistoceno en el sur de Chile aíslan los dos clados, conduciendo a la especiación del Clado Sur en las costas no glaciadas de la Patagonia oriental. (D) luego de la de-glaciación del sur de Chile, el Clado Sur se expande hacia el sur de Chile y se establece una zona de contacto secundario (ZCS) entre los dos clados.

## ANEXO

Los anexos que se presentan a continuación consisten de una serie de componentes independientes que proporcionan información relevante como apoyo para esta tesis. Están numerados consecutivamente en el orden en que se mencionan en el texto.

**A1.** Caracteres fenotípicos de la valva de las especies investigadas

**A2.** Implicaciones taxonómicas de la existencia de dos clados genéticamente distintos de *Perumytilus*

**A3.** Registro fósil de *Perumytilus*

### **A1. Caracteres fenotípicos de la valva de las especies investigadas**

La sistemática y taxonomía genérica de los Mytilidae en general, y en particular de los BRACHIDONTINAE, se basa en caracteres fenotípicos observables de la valva. Se examinaron caracteres diagnósticos cualitativos a nivel genérico en especies de *Brachidontes*, *Perumytilus*, *Austromytilus* y *Mytilisepta* bajo microscopio estereoscópico, y se fotografiaron con una cámara Nikon D90 con un lente MicroNikor de 105 mm. Estos caracteres incluyen [1] la posición del umbo con respecto al extremo apical de las valvas, [2] la presencia y naturaleza de los dientes apicales en la región de la charnela, [3] la naturaleza de la zona de inserción del músculo aductor anterior, [4] la longitud relativa del ligamento a lo largo del borde dorsal de las valvas, [5] la diferenciación y la posición de los dientes laterales posteriores en relación con el punto de inflexión medio dorsal de la línea de contorno de la valva y el extremo posterior del ligamento, [6] la disposición del extremo anterior del ligamento respecto a la charnela, y [7] la presencia y naturaleza de las crenulaciones a lo largo del borde de las valvas.

Los miembros de la subfamilia BRACHIDONTINAE cuyas valvas fueron examinadas como parte de este estudio (Tabla A1) mostraron una gran variabilidad en la mayoría de los caracteres diagnósticos considerados, ya sea a nivel genérico o específico. Los géneros del clado AMP (ver capítulo 2), comparten un carácter: el borde ventral de la valva es crenulado (Fig. A1), aunque en *Perumytilus* las crenulaciones pueden ser débiles en individuos jóvenes o desgastarse en los más viejos. Todos los miembros del clado se encuentran en la zona media del intermareal en costas rocosas expuestas, estrechamente unidos por el biso al sustrato y normalmente formando bancos monoespecíficos. Las valvas, sobre todo cuando están erosionadas, tienen

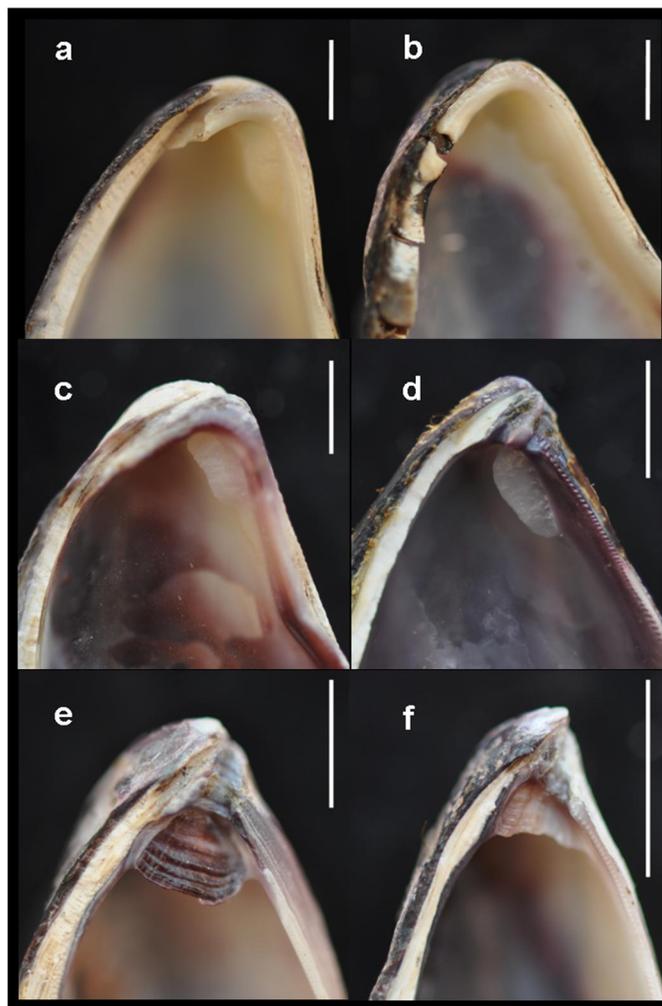
---

tendencia a exhibir un color violáceo característico, por lo que son a menudo conocidos como "mejillines púrpura" (el nombre específico de *Perumytilus purpuratus* deriva de ese carácter).

Dentro del clado AMP, algunos caracteres de la valva tienen valor diagnóstico a nivel de género. En *Perumytilus* (con dos linajes genéticamente distintos) la charnela anterior posee de 5-7 pequeños denticulos apicales, a veces seguidos postero-dorsalmente por una hilera de 10 a 15 pequeños denticulos subiguales, y ocasionalmente por una denticulación irregular muy pequeña en el borde antero-ventral (Fig. A1: a-c). La charnela anterior del género monotípico *Austromytilus* tiene dientes nodulares de tamaño desigual situados inmediatamente debajo del umbo (Fig. A1: d), un diente en una valva y dos y un orificio en el otro (que puede ser la izquierda o la derecha). Por último, en *Mytilisepta* (dos especies estrechamente relacionadas) hay un gran diente en una valva y un orificio grande sobre la otra (indistintamente la izquierda o la derecha) (Fig. A1: e, f).

El tabique ventral que sirve para la inserción del músculo aductor anterior presente en *Mytilisepta* es un autapomorfismo (Fig. A1: e). Una estructura similar evolucionó de manera independiente en *Septifer* (subfamilia SEPTIFERINAE) (Fig. A1: f). En *Austromytilus* y *Perumytilus* la zona de inserción del aductor anterior tiene una tendencia a crecer por acreción, tomando la forma de un tubérculo conspicuo elevado (Fig. A1: d), característica que fue también observada en algunos ejemplares de *Brachidontes erosus*.

*Perumytilus* posee un autapomorfismo único: una expansión de la capa interior de cada valva, que se continúa en la charnela anterior, envuelve las proyecciones anteriores del ligamento, y se cierra en una estructura calcárea casi-tubular que se extiende hacia delante por debajo de la charnela de cada valva (Fig. A1: a, c). El extremo posterior de esta envoltura calcárea a menudo se rompe (Fig. A1: b), dando la impresión visual de una estructura truncada que parece marcar (en cada valva) el extremo anterior del ligamento (Fig. A1: a, c). Una forma incipiente de esta estructura se observó también en *Brachidontes granulatus* y en juveniles de *B. darwinianus*, pero su expresión en *Perumytilus* es única.



**Figura A1.** Especímenes utilizados en este estudio donde se observa la sección del umbo. (a) *P. purpuratus* (Valparaíso, Chile), exhibiendo el recubrimiento calcáreo del ligamento en forma de tubo roto; (b) *P. purpuratus* (Valparaíso, Chile), exhibiendo el recubrimiento calcáreo del ligamento en forma de tubo roto pero completo; (c) *P. purpuratus* (Pto. Deseado); (d) *Austromytilus rostratus* (Tarooma, Tasmania, Australia); (e) *Mytilisepta virgata* (Japon); (f) *M. bifurcata* (California). (c) y (d) muestran el área de inserción del músculo aductor anterior en forma de tubérculo; (e) y (f) muestran el septo sobre el que se inserta el músculo. Barra: 0.5 cm.

**Tabla A1.** Caracteres morfológicos de la valva observados en las especies consideradas principalmente en el Capítulo 2.

<b>Especies y localidad</b>	<b>Charnela</b>	<b>Ligamento</b>	<b>Área de inserción del músculo aductor anterior</b>	<b>Crenulación ventral marginal</b>	<b>Dientes postero-laterales (dorsal)</b>
<i>Perumytilus</i> (dos clados genéticamente diferentes), especímenes de Valparaíso (Chile), Puerto Deseado y Puerto Madryn (Argentina)	5-7 pequeños denticulos apicales, a veces seguido por una hilera postero-dorsal de 10 a 15 pequeños denticulos, subiguales y ocasionalmente por una muy pequeña, denticulación irregular en la parte antero-ventral.	Semi-interno. En cada valva, una expansión de la capa interna, continua con la charnela, envuelve la proyección laminar anterior del ligamento (oscura), que se va cerrando en una estructura calcárea casi tubular que se extiende hacia delante por debajo de la charnela. El extremo posterior de esta envoltura calcárea a menudo se rompe, dando la impresión visual de una estructura cortada que parece marcar (en cada valva) el extremo anterior del ligamento.	Cicatriz marcada, suave y generalmente hialina en juveniles, pero puede crecer hasta formar un tubérculo prominente.	Margen ventral suavemente crenulado	~ 6-9 dientes pequeños, casi iguales, bien diferenciados, ubicados inmediatamente detrás de la inflexión medio-dorsal.
<i>Austromytilus rostratus</i> , especímenes de Tarooma (Australia)	Dientes nodulares de tamaño desigual situados inmediatamente debajo del umbo; un diente en una valva, dos y una cavidad en el otro (puede ser la izquierda o la derecha).	Dorsalmente expuesto, en el extremo anterior, situado en un surco que termina entre el umbo y la charnela.	Cicatriz levemente elevada en juveniles, pero puede crecer hasta formar un tubérculo prominente.	Margen ventral conspicuamente crenulado a lo largo de toda su longitud; en la parte anterior la crenulación alcanza la charnela.	~ 4-7 dientes pequeños, aproximadamente iguales, casi a continuación de la crenulación marginal dorso-posterior, situada inmediatamente detrás de la inflexión medio-dorsal.
<i>Mytilisepta virgata</i> , especímenes de Japon y Hong Kong	Un diente grande en una valva, y una cavidad amplia sobre la otra (indistintamente la izquierda o la derecha).	Semi-interno, dorsalmente cubierto en su mayor parte por la expansión de la valva; anteriormente situado en un surco que se extiende hacia adelante entre el umbo y la charnela; ligamento fibroso con pequeñas perforaciones.	En un septo detrás del rostro.	Margen ventral crenulado a lo largo de toda su longitud; en la parte anterior la crenulación alcanza la charnela.	~ 5-7 dientes pequeños e indiferenciados, apenas distinguibles de la crenulación marginal postero-dorsal del extremo anterior; situada inmediatamente

					detrás de mediados de la inflexión dorsal.
<i>Mytilisepta bifurcata</i> , especímenes del Sur de California (USA)	Un diente prominente y romo en una valva, y una cavidad en la otra.	Anteriormente situado en un surco que se extiende hacia adelante entre la charnela y el umbo.	En un septo detrás del rostro.	Margen ventral crenulado a lo largo de toda su longitud; en la parte anterior la crenulación alcanza la charnela, con algunos de los dientes anteriores de mayor tamaño.	~ 6-7 pequeños dientes, casi iguales, o algo mayor que el extremo anterior de la crenulación marginal postero-dorsal; situado entre el final del ligamento y la inflexión medio-dorsal.
<i>Brachidontes rodriguezii</i> , especímenes de Bahía San Blas (Argentina), localidad tipo	Fila de 5-6 pequeños denticulos, hasta un máximo de 20.	Se extiende anteriormente entre el umbo y la charnela.	Bajo, opaco.	Margen ventral liso.	~ 4-6 dientes, poco visibles a bien diferenciados; situado en o ligeramente por detrás del punto de inflexión medio-dorsal.
<i>Brachidontes granulatus</i> , especímenes de Coquimbo (Chile)	1-3 dientes grandes distales, seguidos hacia el lado ventral por unos 5-7 denticulos adicionales y, a veces, 1-2 denticulos en el lado dorsal.	Se extiende anteriormente entre el umbo y la charnela de cada valva, dentro de un surco profundo; la expansión calcárea de la capa interior se continúa sobre la charnela, a veces contribuyendo a "envolver" la extensión del ligamento anterior en cada valva.	Cicatriz plana o ligeramente deprimida.	Margen antero-ventral liso (a excepción de los denticulos de posición ventral-anterior adyacentes a la charnela); la crenulación del margen postero-ventral coincide con la terminación de las costillas exteriores.	~ 5-9 dientes; el tamaño varía entre los individuos; situados entre el extremo posterior de la charnela y la inflexión medio-dorsal (que no siempre está bien definida).

## **A2. Implicaciones taxonómicas de la existencia de dos linajes genéticamente distintos de la taxonomía de *Perumytilus*.**

La evidencia de dos linajes distintos en el género monotípico *Perumytilus* Olsson crea un problema taxonómico difícil. Lamarck (1819) dio una breve descripción de *Modiola purpurata* y *Mytilus ovalis*, el segundo ha sido considerado hasta ahora un sinónimo del primero (Olsson, 1961). Lamarck (*op. cit.*) no dio ninguna indicación de la localidad de origen de *M. purpurata*, y el tipo está presumiblemente perdido (G. Pastorino, 23 de julio de 2012, pers. comm. in litt.). Por lo tanto, no es posible establecer a cuál de los dos clados se aplica el nombre específico "*purpuratus*". *Mytilus ovalis* se basó en una muestra de Perú; el tipo está depositado en el Museo de Ginebra. Mientras que todavía no se han secuenciado muestras provenientes de Perú, los registros de la región posiblemente podrían corresponder al Clado Norte. Dejando de lado la taxonomía específica, el género *Perumytilus* Olsson parece estar inequívocamente definido, tanto fenotípica y como genotípicamente. Resolver este dilema taxonómico específico va más allá del alcance de este estudio.

## **A3. Registro fósil de *Perumytilus***

Los primeros registros de *Perumytilus* corresponden a las costas del norte y centro de Chile: Pleistoceno temprano (quizás Plioceno superior según el profesor Ulrich Radtke, Universität Duisburg-Essen, com. pers.) de Coquimbo / La Serena (29° 50'S a 30° S) y Tongoy (30° 08'S y 30° 25'S) (Herm, 1969), del Plioceno superior o Pleistoceno temprano de Caleta Obispito (26° 44'S) (Kiel y Nielsen, 2010 su Material suplementario, Tabla DR2, y S. Nielsen, com. pers.), y paleocostas en la Península de Mejillones (23°S), desde el Holoceno al penúltimo interglacial (MIS 7, 220 Kya), y tal vez al Pleistoceno temprano (Ortlieb et al., 1996). Los registros más antiguos de *B. granulatus* coinciden con los de *Perumytilus* (Herm, 1969; Kiel y Nielsen, 2010).

A lo largo de las costas de la Patagonia argentina (Atlántico sudoccidental), la presencia de *Perumytilus* está bien documentada en las terrazas marinas del Holoceno (Feruglio, 1950; Aguirre, 2003; Aguirre et al., 2006, 2009) y para el llamado Sistema de Terrazas Marinas V, que se corresponde con el último interglacial (Sangamon, Pleistoceno superior, ca. 110-130 Ka, 5e MIS) de muchos sitios entre Cabo Raso (44° 20'S) y la zona de San Julián (49° 20'S) (Feruglio, 1950; Aguirre et al., 2006, 2009). Los moluscos de esos sitios todavía se encuentran viviendo en la Provincia Magallánica templado-fría. Los registros más antiguos son cuestionables. Feruglio (1950) citó "*Brachidontes purpuratus*" para la Terraza

IV en Bahía Bustamante, a partir de los cordones con *Macoma spp.* donde la fauna de moluscos está dominada por especies templado-cálidas que actualmente viven más al norte. Luego, Rutter et al. (1990) citó a "*B. rodriguezii*" para la misma localidad y unidad (lamentablemente el material de soporte se perdió, N. Rutter, com. pers.). Aguirre et al. (2009) identificaron a *Brachidontes sp.* para el mismo sistema de terrazas en otras localidades.

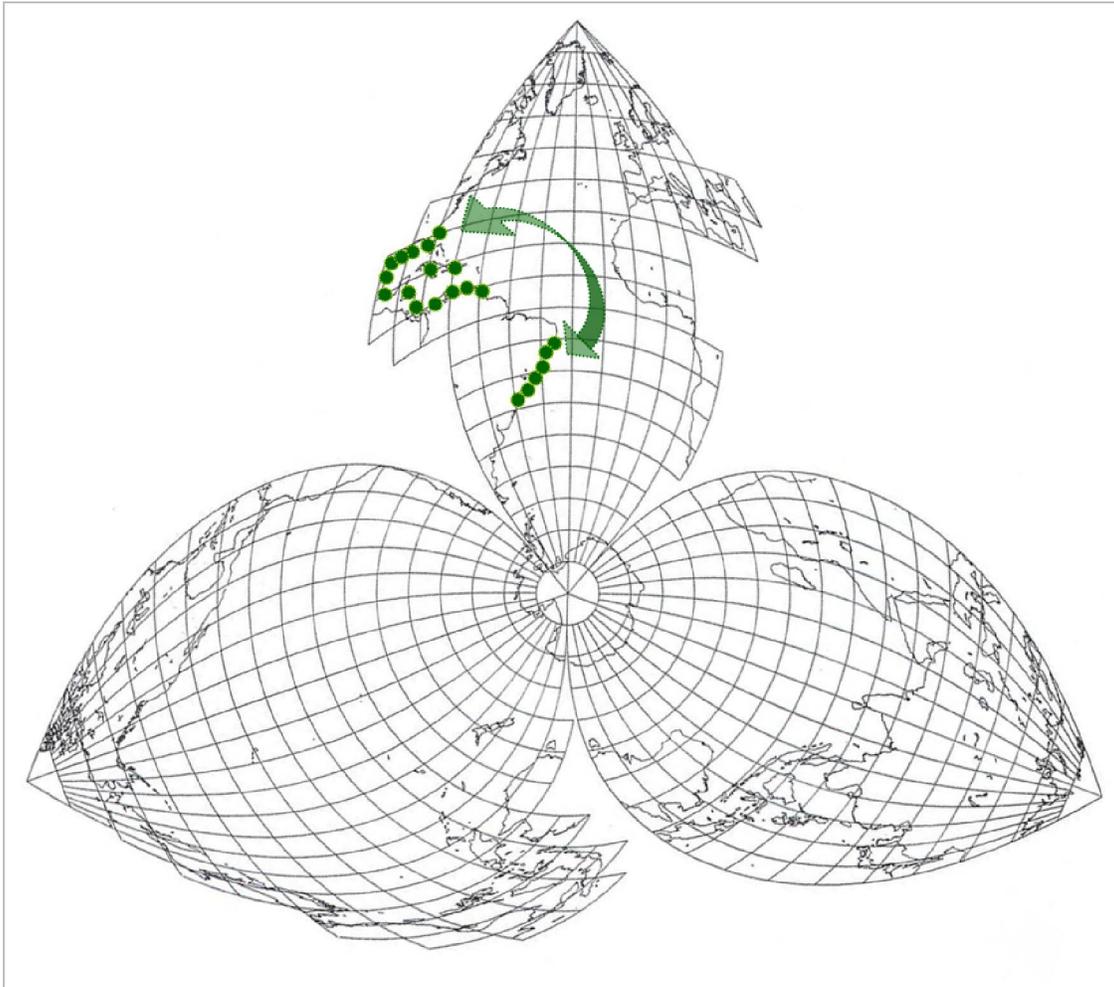
Los cordones de Bahía Bustamante fueron fechados por Rutter et al. (1990) y Schellmann y Radtke (1997) por medio de la técnica de resonancia de espín electrónico (ESR), arrojando edades en el rango de > 190-240 Ka, que pueden corresponder al penúltimo interglacial (MIS 7) o incluso a uno más antiguo. Los materiales de *Brachidontes spp.* de la Terraza IV de Feruglio no estuvieron disponibles para este estudio, por lo que su identidad permanece sin confirmar. Feruglio (1950) también reportó "*Brachyodontes purpuratus*" de la Formación Cerro Laciari (su Terraza I), que fue datada por del Río et al. (2013) sobre la base de  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  de valvas calcáreas en 5.10-5.15 Ma, correspondiendo al Zancleano (Plioceno inferior). El examen de esos materiales (ahora en las colecciones de paleontología de invertebrados del Museo Argentino de Ciencias Naturales, Buenos Aires) y lleva a concluir que no están relacionados con *Perumytilus*. El rango estratigráfico "Mioceno-Reciente" indicado por Aguirre et al. (2008, p.307 y T.3) es presumiblemente un *lapsus*; todos los registros paleontológicos listados por ellos corresponderían al Cuaternario.

El conjunto más rico y diverso de invertebrados marinos del Pleistoceno del extremo sur de América del Sur fue descrito por Gordillo et al. (2010) de la Isla Navarino (54° 56'S). Sobre la base de la datación por radiocarbono, esa transgresión marina presumiblemente correspondería al último interglacial (Sangamon), pero podría ser más antigua. *Perumytilus* no fue incluido entre los 34 taxones de moluscos registrados, que corresponden a las especies que aún viven en la Región Magallánica templado-fría. Aunque *Perumytilus* está registrado para el Holoceno de la región del Canal Beagle (Gordillo, 1999) no parece ser ubicuo. Estuvo ausente en cuatro unidades del Holoceno a lo largo del canal de Beagle, donde la macrofauna fue descrita en detalle por Gordillo et al. (2005), en tanto que los mitílidos que co-existen con él actualmente en las costas rocosas de la misma región sí estaban presentes (*Mytilus*, *Aulacomya*).

### CAPÍTULO 3. Relaciones filogenéticas y patrones

biogeográficos de los mejillines de la costa templado-cálida del

Atlántico sudoccidental



---

**RESUMEN**

Muchas especies marinas tienen distribuciones latitudinales discontinuas con una interrupción de extensión variable centrada en la zona tropical, un patrón conocido como “antitropicalidad”. *Brachidontes darwinianus* (SE Brasil a Uruguay) constituiría un caso potencial de este tipo de patrón, ya que fue considerada por algunos autores como un sinónimo de *B. exustus* (golfo de México y el Caribe). El segundo caso potencial es el de *B. solisianus*, ya que esta especie ha sido citada también para localidades ubicadas al norte de la zona intertropical, aunque el status de esos registros requiere mayor escrutinio. El objetivo de este capítulo es dilucidar las relaciones filogenéticas y filogeográficas de las especies de la región templado-cálida del Atlántico sudoccidental -*B. solisianus*, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii*- evaluando la antitropicalidad frente a otras hipótesis filogeográficas alternativas. Para alcanzarlo, se utilizaron secuencias de dos genes nucleares (18S y 28S ADNr) y uno mitocondrial (COI ADNmt) y se reconstruyeron las relaciones filogenéticas de los Brachidontinae. Asimismo, se estimó la diversidad y estructura genética, así como también la historia demográfica de las tres especies.

En la filogenia inferida a partir de secuencias de COI, *Brachidontes solisianus* (Brasil) y *B. “exustus P” sensu* Lee y Ó Foighil (2005) (golfo de México y el Caribe) aparecen como miembros de un par distribuido al norte y sur de la desembocadura del Río Amazonas, con un tiempo de divergencia de aproximadamente 2.6 Ma. Ello es coincidente con un aumento del caudal del río Amazonas durante el Pleistoceno. *Brachidontes darwinianus* no está relacionado con el “complejo *exustus*”, con lo que en este caso se refuta la hipótesis de antitropicalidad. Se discute la hipótesis de que la vía marítima que conectó el Atlántico Sudoccidental con la región Caribe durante el Mioceno pudiera haber sido el escenario de conexiones entre esas dos regiones. *Brachidontes rodriguezii* es una especie bien definida, sin una relación clara con las especies tropicales de las Américas. Su hipotética relación con formas fósiles del Mioceno es considerada en el Capítulo 4.

En cuanto a la historia demográfica de las especies, *B. solisianus* exhibió signos de expansión poblacional reciente y poblaciones sin diferenciación genética significativa, a pesar de su amplia distribución a lo largo de las costas de Brasil, mientras que *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* presentaron diferenciación genética significativa entre sus poblaciones, sin evidencias de cambios recientes en su tamaño poblacional.

---

## INTRODUCCIÓN

El análisis de la distribución de diversos grupos de organismos marinos de aguas cálidas y templado-cálidas del Atlántico occidental revela varias discontinuidades. Entre estas, dos son particularmente prominentes: los pares de “especies geminadas” a ambos lados del istmo de Panamá (Lessios, 2008) y la presencia de especies estrechamente relacionadas (o aún de poblaciones de la misma especie) al norte y al sur de un hiato intertropical, un patrón conocido como “antitropicalidad” en su acepción mas amplia (Hubbs, 1952; Joyeux et al., 2001).

La primera de estas discontinuidades esta relacionada con el surgimiento del istmo de Panamá que interrumpió el flujo interoceánico y afectó la salinidad, la temperatura y la productividad primaria a ambos lados del istmo. Como resultado de estos cambios algunas especies se extinguieron, y otras dieron origen a “pares geminados” de especies estrechamente relacionadas entre si, presentes a uno lado y otro del istmo (Jordan, 1908). En contraste con ese patrón, que esta muy bien documentado, la significancia de los patrones antitropicales no ha sido debidamente apreciada en el Atlántico occidental. A título de ejemplo, Vermeij (1991), en su influyente síntesis de intercambios bióticos globales, no indica ningún intercambio marino trans-tropical en esa región (Vermeij, *op.cit.*, su Fig. 1). La razón aparente es que las compilaciones de distribuciones geográficas a lo largo de las costas del Atlántico occidental frecuentemente ignoran el hiato intertropical. Los patrones antitropicales pueden ser divididos en tres categorías generales (Hubbs, 1952):

(1) Distribución estrictamente bipolar, conforme a la cual organismos relacionados se distribuyen en las regiones frías y frío-templadas de ambos hemisferios (Ekman, 1953). Este fenómeno está bien representado por ejemplo en los cnidarios (Stepanjants et al., 2006), bacterias marinas (Zeng et al., 2010), foraminíferos (Darling et al., 2000), briozoos (Kuklinsky y Barnes, 2010) y protozoos (Di Giuseppe et al., 2013).

(2) Distribución “bi-templada” (Hubbs, 1952): organismos relacionados se distribuyen en las regiones templado-calidas de ambos hemisferios. Este patrón fue observado en numerosos organismos marinos (Lindberg, 1991), por ejemplo, en bivalvos (Josefowicz y Ó Foighil, 1998; Hilbish et al., 2000; Shilts et al., 2007), peces (Grant y Leslie, 2001), briozoos (Schwaninger, 2008) y estrellas de mar (Nakamura et al., 2011).

(3) Distribución interrumpida solo en la región ecuatorial, con una especie o especies estrechamente relacionadas presentes en la franja inter-tropical. Randall (1982) introdujo el término “antieuatorial” para este patrón, bien representado en el Atlántico occidental por especies o pares de especies distribuidos al norte y al sur de las plumas combinadas del Orinoco y el Amazonas. Es el caso, por ejemplo, de algunos peces de arrecife (Joyeux et al., 2001; Luiz et al., 2013), langostas (Rodríguez Rey, 2010) y cangrejos (Tourinho et al., 2012).

Los mejillines de América del Sur presentan dos casos potenciales de antitropicalidad. El fenotipo de *Brachidontes darwinianus*, una especie registrada en ambientes estuariales de Uruguay y Brasil, se asemeja mucho al del “complejo *exustus*” (Linnaeus) del golfo de México, al punto que algunos autores (e.g. Ríos, 1994) los consideran sinónimos. Un estudio reciente basado en información molecular mostró que *B. exustus* es en realidad un complejo monofilético de cinco especies crípticas distribuidas en el Caribe y el golfo de México, más dos especies geminadas del Pacífico (Lee y Ó Foighil, 2005). No habiendo estudios genéticos sobre *B. darwinianus*, su relación con el “complejo *exustus*” no está resuelta.

*Brachidontes solisianus*, una especie marina, fue originalmente descrita por d'Orbigny (1842, 1846) en base a material colectado en Maldonado (Uruguay) y Río de Janeiro (Brasil), existiendo numerosos registros para las costas de Brasil al norte de Santa Catarina (28°S). Esta especie ha sido citada también para localidades ubicadas al norte de la zona intertropical (Ríos, 1994), aunque el status de esos registros requiere mayor escrutinio. De confirmarse, este patrón constituiría otro caso potencial de antitropicalidad.

La tercer especie de *Brachidontes* que se encuentra en la región templado-cálida del Atlántico sudoccidental es *B. rodriguezii* (d'Orbigny), cuyo rango de distribución se extiende desde Río Grande do Sul (Brasil, ~ 32° S) hasta Punta Ninfas (Argentina, ~ 43° S) (Scarabino et al., 2006; Trovant et al., 2013). Se ha sugerido que *Brachidontes rodriguezii* estaría relacionada con formas fósiles del Mioceno y se habría originado en la región geográfica que hoy habita (Trovant et al., 2013).

El objetivo de este capítulo es clarificar las relaciones filogenéticas y filogeográficas de los mejillines de la región templado-cálida del Atlántico sudoccidental, en particular de las especies *B. solisianus* y *B. darwinianus*. Ello, a su vez requiere aclarar las relaciones dentro de *Brachidontes* s.s. La hipótesis considerada, implícita en la literatura taxonómica, postula que *B. darwinianus* y *B. solisianus* son miembros de pares antitropicales, con contrapartes en el golfo de México y el Caribe pertenecientes al “complejo *exustus*”.

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de muestras

Especímenes de *Brachidontes solisianus*, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* fueron recolectados en nueve localidades repartidas a lo largo de las costas de Brasil y Uruguay, desde Bahía (~ 14°S) a Montevideo (~ 34°S, Fig. 3.1, Tabla 3.1). Además, se incluyeron las muestras de *B. darwinianus* y de *B. rodriguezii* utilizadas en el Capítulo 1 (Tabla 3.1). Se realizaron observaciones de caracteres morfológicos sobre los ejemplares muestreados y materiales de *Brachidontes* depositados en el "Museo Oceanográfico Eliezer Ríos" (Río Grande, Brasil) y en el "Museo de Historia Natural de Montevideo" (Montevideo, Uruguay) (Tabla 3.2). Con el fin de respaldar la asignación de los especímenes utilizados en este estudio a las especies en base a caracteres fenotípicos de la valva, se obtuvieron imágenes de alta calidad de los materiales tipo de *B. solisianus*, *B. darwinianus*, *B. rodriguezii* y de *B. adamsianus* depositados en el Museo Británico de Historia Natural.

A fin de caracterizar los fenotipos de los especímenes provenientes del golfo de México, el Caribe y el Pacífico americano tropical incluidos en el estudio de Lee y Ó Foighil (2004, 2005), que no habían sido adecuadamente descritos, se solicitaron en préstamo todos los materiales de *B. "adamsianus I"* (n = 35), *B. "adamsianis II"* (n = 3) y *B. "exustus I"* (n = 34) utilizados en aquel estudio, y se fotografiaron ambas valvas de cada espécimen.

Todas las muestras fueron fijadas en etanol al 95%. Las secuencias de taxones relacionados utilizadas en la filogenia, provenientes del GenBank, fueron las mismas que las utilizadas en el Capítulo 2 (Tabla 2.3), salvo unas pocas secuencias que se detallan en la Tabla 3.3 junto con las secuencias obtenidas para este estudio. En la filogenia basada en genes nucleares se incluyó una secuencia disponible en Genbank identificada como *B. dominguensis* Lamarck 1819, teniendo en cuenta que esta especie ha sido considerada un sinónimo junior de *B. exustus* (Ríos, 2009).

### Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

La metodología de extracción, amplificación y secuenciación de ADN es similar a la detallada en los Capítulos 1 y 2. En este capítulo, como en el caso del capítulo 2, se utilizan el gen mitocondrial COI y los genes nucleares 28S y 18S. Cuando fue posible se secuenciaron diez ejemplares por localidad para el COI y dos especímenes por localidad para cada uno de los genes nucleares. En total se obtuvieron 161 secuencias (109 de COI, 23 de 18S y 29 de

28S), las cuales serán depositadas en GenBank previamente a la publicación de los resultados del estudio.

Los iniciadores utilizados para amplificar el gen mitocondrial COI mostraron una gran variabilidad en la eficacia para unirse a las regiones flanqueantes y amplificar con éxito el fragmento, posiblemente debido a que la región de unión varía entre especies e inclusive dentro de las especies de mejillines. Por esta razón se diseñaron dos nuevos iniciadores, llamados COI-UY-79-F (5' ACA AAT CAT AAA GAT ATT GGT ACH YTW TA) (Enrique Lessa, Universidad de la República, Montevideo) y COI-UY-iv-733-R1 (AAC AAR TGT ATA AAT AAM ACA GGA TC) (Ivanna Tomasco, Universidad de la República). Estos, combinados con los anteriormente diseñados (CO1Fa/CO1Ra) y los iniciadores tomados de Folmer et al. (1994), permitieron amplificar con éxito las secuencias del gen mitocondrial del resto de las especies de mejillines.

Como se señaló en el primer capítulo, algunos mitílidos tienen una forma de herencia mitocondrial conocida como “doble herencia uniparental” (DUI) (Zouros et al., 1992; Skibinski et al., 1994a,b). Este fenómeno no ha sido estudiado en *Brachidontes solisianus*, *B. darwinianus* o *B. rodriguezii* pero siguiendo a Lee y Ó Foighil (2004), se espera minimizar el riesgo de obtener ADN mitocondrial paterno extrayendo ADN del músculo aductor posterior, (ver explicación en materiales y métodos de Caps. 1 y 2).

### **Análisis filogenético y estimación de tiempos de divergencia**

Primero se evaluó el grado de saturación de las secuencias mitocondriales con una prueba de saturación de sustituciones (Xia y Lemey, 2009) en DAMBE V5 (Xia, 2013). Luego, se infirió la filogenia de *Brachidontes* s.s. a partir de los dos genes nucleares concatenados (18S y 28S ADNr) y del gen mitocondrial COI. Como grupos externos se utilizaron los mitílidos *Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis* (Mytilinae), *Ischadium recurvum* (como Mytilinae en Huber, 2010), *Geukensia* spp. (Brachidontinae) y un representante de cada uno de los géneros del clado AMP obtenido en el Capítulo 2 (*Austromytilus*, *Mytilisepta* y *Perumytilus*, Brachidontinae) (Tabla 3.3). Asimismo, fueron incluidas dos especies de un género relacionado, *Mytilaster* (Monterosato, 1884).

Al igual que en el capítulo anterior, se utilizaron dos métodos para la reconstrucción filogenética: Máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. El criterio de información de Akaike (AIC) implementado en jModelTest v 2.1.5 (Darriba et al., 2012) fue utilizado para seleccionar el modelo de evolución que mejor se ajusta a los datos. El modelo de sustitución

escogido fue GTR (GTR+G, Tavaré, 1985). Los análisis de máxima verosimilitud se llevaron a cabo con RAxML 7.4.2 (Stamatakis, 2006), implementado en raxmlGUI 1.3 (Silvestro y Michalak, 2012) utilizando un análisis de bootstrap rápido con 1000 réplicas. El análisis bayesiano se realizó en cada conjunto de datos utilizando BEAST v1.8 (Drummond et al., 2012) por 40 millones de generaciones para la matriz de los genes nucleares concatenados y por 80 millones para la matriz de secuencias mitocondriales; se muestrearon árboles cada 1000 generaciones y el porcentaje de árboles que fueron descartados del período inicial fue del 25%. Similar a lo realizado en los capítulos anteriores, los modelos de árbol y de reloj seleccionados fueron “*Yule process*” y reloj relajado. El diagnóstico de convergencia de las corridas se realizó en Tracer. Se utilizó TreeAnnotator para generar los árboles de máxima credibilidad y luego Figtree para editarlos.

La tasa de sustitución y el tiempo de divergencia entre *Brachidontes solisianus* y *B. “exustus I”* fueron estimados a partir de la ecuación  $\mu = (1/2 \times d) / t$ , donde  $\mu$  es la tasa de sustitución,  $d$  es la distancia genética y  $t$  el tiempo de divergencia, utilizando el tiempo de separación de *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I” sensu Lee y Ó Foighil (2005)*, el cual se estima fue el de la formación del Istmo de Panamá (3,3 +/- 0,2 Ma, Lessios, 2008).

### Estructura y diversidad genética

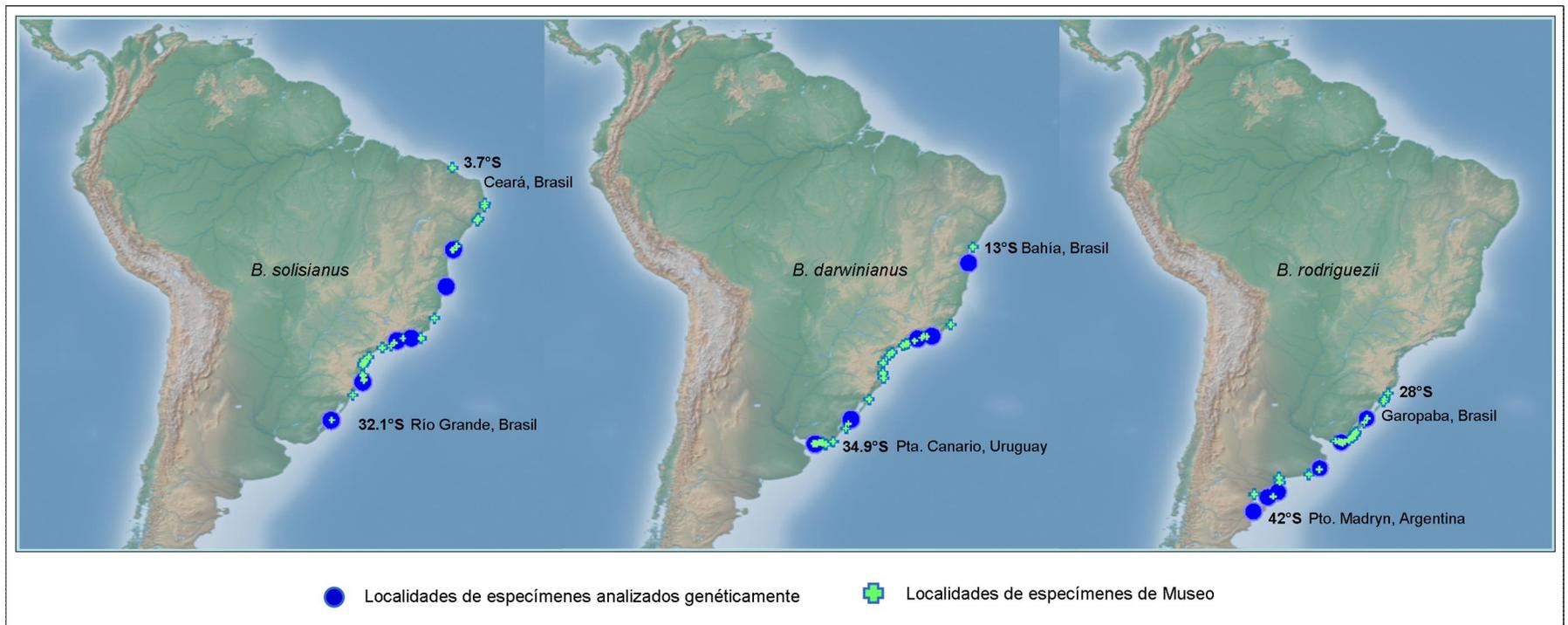
Se condujo un análisis de la variación molecular (AMOVA; Excoffier et al., 1992) implementado en Arlequin v 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) a partir de las secuencias mitocondriales, con 10000 iteraciones, para investigar la relación entre las especies *B. solisianus*, *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”* que forman un clado (ver resultados). Este análisis se llevo a cabo sólo con el gen mitondrial debido a que el resto de los genes presentaron muy poca variabilidad. Asimismo, se estimaron las distancias genéticas dentro y entre estas especies utilizando el método “*p-distance*” (Kimura, 1980) en MEGA v5 (Tamura et al., 2011).

Por otro lado, la estructura y diversidad genética de las especies, *B. solisianus*, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* fue analizada sobre la matriz de datos mitocondriales del gen COI, el marcador que presenta mayor variabilidad. Como los sitios de muestreo están lo suficientemente separados unos de otros, cada sitio se consideró como una población distinta, excepto dos sitios de muestreo ubicados en Río de Janeiro (Niteroi 22°S y Paraty 23°S), que fueron considerados como una misma población. Se estimaron los índices de diversidad genética (e.g. número de sitios polimorficos, número de haplotipos) y los  $\Phi_{ST}$  pareados por

población y por especie utilizando Arlequin. Su significancia fue calculada aplicando la corrección secuencial de Holm-Bonferroni (Holm, 1979). Además, se construyó una red de haplotipos para cada especie con el método de máxima parsimonia utilizando el algoritmo *median joining* (Bandelt et al., 1999), sin modificar los parámetros por defecto del programa Network v 4.6.1 (Polzin y Daneschmand, 2003). Posteriormente a la construcción de la red, se realizó una “*MP calculation*” para reducir el número de links y vectores innecesarios.

### **Historia demográfica**

La hipótesis de neutralidad, conforme a la cual el tamaño de la población es constante y no hay evidencias de que la selección está actuando, se investigó a partir de los índices:  $F_s$  de Fu (Fu, 1997) y  $D$  de Tajima (Tajima, 1989). Las pruebas se calcularon en base a los datos mitocondriales del gen COI utilizando DNAsp v 5.10 (Librado y Rozas, 2009). Se realizó un análisis de distribución de diferencias pareadas (“*mismatch*”) (Rogers y Harpending, 1992) para cada especie y se cuantificó el ajuste de la distribución observada con respecto a la esperada con el índice de Harpending ( $r$ , *raggedness*) (Harpending et al., 1993).



**Figura 3.1.** Localidades de los especímenes analizados genéticamente y de museo de *Brachidontes solisianus*, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii*, distribuidas a lo largo de Brasil, Uruguay y Argentina. Ver Tabla 3.1 para información detallada de las localidades.

**Tabla 3.1.** Sitios de muestreo de las especies de *Brachidontes* s.s. de las costas de Brasil (BR), Uruguay (UY) y Perú (PE). En los análisis de estas especies se agregaron, a modo de comparación, las muestras de las localidades de Argentina y Uruguay analizadas en el Capítulo 1 (Tabla 1.1) indicadas con (\*).

<b>Especie</b>	<b>Localidad</b>	<b>Latitud/Longitud</b>
<i>Brachidontes solisianus</i>	Cumuruxatiba, Bahía, BR	17° 05' S, 39° 11' O
	Niteroi, Bahía de Guanabara, Río de Janeiro, BR	22° 52' S, 43° 06' O
	Paraty, Río de Janeiro, BR	23° 12' S, 44° 43' O
	Itapoa, Bahía, BR	26° 06' S, 48° 36' O
	Praia da Cima, Santa Catarina, BR	28° 00' S, 48° 35' O
	Praia do Casino (Navío Altair), Río Grande do Sul, BR	32° 11' S, 52° 09' O
<i>Brachidontes darwinianus</i>	Bahía de Ihleus, Bahía, BR	14° 47' S, 39° 01' O
	Niteroi, Bahía de Guanabara, Río de Janeiro, BR	22° 52' S, 43° 06' O
	Paraty, Río de Janeiro, BR	23° 12' S, 44° 43' O
	Praia do Casino (Navío Altair), Río Grande do Sul, BR	32° 11' S, 52° 09' O
	Punta Canario, Montevideo, URY (*)	34° 51' S, 56° 09' O
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	Praia do Casino (Navío Altair), Río Grande do Sul, BR	32° 11' S, 52° 09' O
	Santa Clara del Mar (AR) (*)	37° 50' S, 57° 30' O
	Bahía San Blas (AR) (*)	40° 32' S, 62° 15' O
	Bahía Rosas (AR) (*)	41° 01' S, 64° 06' O
	Puerto Madryn (AR) (*)	42° 46' S, 65° 00' O
<i>Brachidontes "adamsianus" I'</i>	Colan, Paita, PE	5° 04' S, 81° 06' O

**Tabla 3.2.** Sitios de colecta de las muestras de *Brachidontes* depositadas en el “Museo Oceanográfico Eliezer Ríos” (MOFURG) y en el “Museo de Historia Natural de Montevideo” (MHNM).

Espece	Localidad	País	Latitud Sur	Longitud Oeste	Museo	
<i>B. solisianus</i>	Praia do Futuro (Ceará)	Brasil	-3,72	-38,45	MOFURG	
	Ilha de Itamaraca (Pernambuco)	Brasil	-7,74	-34,82	MOFURG	
	Praia da Piedade (Pernambuco)	Brasil	-8,08	-34,87	MHNM	
	Paripueira (Alagoas)	Brasil	-9,46	-35,54	MOFURG	
	Ponta verde (Alagoas)	Brasil	-9,66	-35,69	MOFURG	
	Praia do Forte (Bahía)	Brasil	-12,57	-38	MOFURG	
	Praia do Farol (Bahía)	Brasil	-12,95	-38,34	MOFURG	
	Pituba (Bahía)	Brasil	-13	-38,45	MOFURG	
	Guarapari (Espírito Santo)	Brasil	-20,67	-40,49	MOFURG	
	Cabo Frio (Río de Janeiro)	Brasil	-22,89	-42,02	MOFURG	
	Mangaratiba (Río de Janeiro)	Brasil	-22,96	-44,04	MOFURG	
	Arraial do Cabo (Río de Janeiro)	Brasil	-22,97	-42,01	MOFURG	
	Praia do Tenorio (San Pablo)	Brasil	-23,46	-45,05	MHNM	
	San Sebastian (San Pablo)	Brasil	-23,8	-45,39	MHNM	
	Santos (San Pablo)	Brasil	-23,97	-46,32	MHNM	
	Cananea (San Pablo)	Brasil	-25,04	-47,88	MHNM	
	Baía de Paranaguá (Paraná)	Brasil	-25,45	-48,39	MOFURG	
	Isla de Mel (Paraná)	Brasil	-25,52	-48,33	MOFURG	
	Piraquara (Paraná)	Brasil	-25,6	-48,36	MOFURG	
	Matinhos (Paraná)	Brasil	-25,83	-48,53	MOFURG	
	Caioba (Paraná)	Brasil	-25,85	-48,55	MHNM/ MOFURG	
	Guaratuba (Paraná)	Brasil	-25,88	-48,56	MOFURG	
	Ilha do Saí (Paraná)	Brasil	-25,97	-48,59	MOFURG	
	Itapema (Santa Catarina)	Brasil	-27,09	-48,61	MOFURG	
	Bombinhas (Santa Catarina)	Brasil	-27,14	-48,49	MOFURG	
	Porto Belo (Santa Catarina)	Brasil	-27,15	-48,54	MOFURG	
	Praia do Canto Grande (Santa Catarina)	Brasil	-27,19	-48,50	MOFURG	
	Ilha Santa Catarina (Santa Catarina)	Brasil	-27,6	-48,43	MOFURG	
	Campeche (Santa Catarina)	Brasil	-27,69	-48,48	MOFURG	
	Torres (Río Grande do Sul)	Brasil	-29,33	-49,71	MHNM/ MOFURG	
	Molhe Este Río Grande (Río Grande do Sul)	Brasil	-32,16	-52,08	MOFURG	
	<i>B. darwinianus</i>	Salvador de Bahía (Bahía)	Brasil	-13	-38,53	MHNM
		Sao Joao da Barra (Río de Janeiro)	Brasil	-21,64	-41,01	MOFURG
Mangaratiba (Río de Janeiro)		Brasil	-22,96	-44,04	MOFURG	
Sepetiba (Río de Janeiro)		Brasil	-22,97	-43,7	MOFURG	
Isla Grande (Río de Janeiro)		Brasil	-23,1	-44,25	MHNM/ MOFURG	
Ubatuba (San Pablo)		Brasil	-23,45	-45,05	MOFURG	
Praia da Boraceia (San Pablo)		Brasil	-23,75	-45,81	MOFURG	
Bertioga (San Pablo)		Brasil	-23,8	-46,02	MOFURG	
Santos (San Pablo)		Brasil	-23,97	-46,32	MHNM	
Isla Comprida (San Pablo)		Brasil	-24,74	-47,54	MHNM	
Cananea (San Pablo)		Brasil	-25,04	-47,88	MHNM	
Caioba (Paraná)		Brasil	-25,85	-48,55	MOFURG	
Guaratuba (Paraná)		Brasil	-25,88	-48,56	MOFURG	
Camburiu (Santa Catarina)		Brasil	-27	-48,6	MOFURG	
Praia do Pereque (Santa Catarina)		Brasil	-27,15	-48,57	MOFURG	
Florianopolis (Santa Catarina)		Brasil	-27,59	-48,54	MOFURG	
Lagoa da Conceicao (Santa Catarina)		Brasil	-27,61	-48,47	MOFURG	
Imbe (Río Grande do Sul)		Brasil	-29,97	-50,12	MOFURG	
Tramandai (Río Grande do Sul)		Brasil	-29,98	-50,12	MOFURG	

Sarita (Río Grande do Sul)	Brasil	-32,66	-52,43	MHNM
Albardao (Río Grande do Sul)	Brasil	-33,2	-52,7	MOFURG
Punta Gorda (Colonia)	Uruguay	-33,91	-58,41	MHNM
La Paloma (Rocha)	Uruguay	-34,65	-54,15	MHNM
La Floresta (Canelones)	Uruguay	-34,76	-55,67	MHNM
Solis Chico (Canelones)	Uruguay	-34,76	-55,7	MHNM
San Luis (Canelones)	Uruguay	-34,77	-55,58	MHNM
Los Titanes (Canelones)	Uruguay	-34,78	-55,56	MHNM
Bella Vista (Montevideo)	Uruguay	-34,8	-55,34	MHNM
Playa Las Flores (Maldonado)	Uruguay	-34,81	-55,33	MHNM
Piriapolis (Maldonado)	Uruguay	-34,87	-55,27	MHNM
Playa Carrasco (Montevideo)	Uruguay	-34,88	-56,04	MHNM
Playa Malvin (Montevideo)	Uruguay	-34,89	-56,1	MHNM
Punta Yeguas (Montevideo)	Uruguay	-34,89	-56,3	MHNM
Playa Buceo (Montevideo)	Uruguay	-34,89	-56,12	MHNM
Puerto de Montevideo (Montevideo)	Uruguay	-34,9	-56,21	MHNM
Escollera Sarandí (Montevideo)	Uruguay	-34,91	-56,21	MHNM
Punta Carretas (Montevideo)	Uruguay	-34,93	-56,15	MHNM
Isla de Flores (Montevideo)	Uruguay	-34,94	-55,92	MHNM
Punta del Este (Maldonado)	Uruguay	-34,96	-54,94	MHNM
<b><i>B. rodriguezii</i></b>				
Garopaba (Santa Catarina)	Brasil	-28,02	-48,61	MOFURG
Torres (Río Grande do Sul)	Brasil	-29,33	-49,71	MHNM
Tramandai (Río Grande do Sul)	Brasil	-29,98	-50,12	MOFURG
Albardao (Río Grande do Sul)	Brasil	-30,26	-50,22	MOFURG
Molhe Este Río Grande (Río Grande do Sul)	Brasil	-32,16	-52,08	MOFURG
Molhe Oeste Río Grande (Río Grande do Sul)	Brasil	-32,17	-52,09	MOFURG
Sarita (Río Grande do Sul)	Brasil	-32,66	-52,43	MHNM/ MOFURG
Barra do Chui (Río Grande do Sul)	Brasil	-33,74	-53,36	MOFURG
La Coronilla (Rocha)	Uruguay	-33,89	-53,5	MHNM/ MOFURG
Playa Santa Teresa (Rocha)	Uruguay	-34	-53,53	MHNM
Punta del Diablo (Rocha)	Uruguay	-34,04	-53,53	MHNM
Aguas Dulces (Rocha)	Uruguay	-34,27	-53,77	MHNM
Valizas (Rocha)	Uruguay	-34,33	-53,78	MHNM
Cabo Polonio (Rocha)	Uruguay	-34,4	-53,79	MHNM
La Pedrera (Rocha)	Uruguay	-34,59	-54,12	MHNM
La Paloma (Rocha)	Uruguay	-34,65	-54,15	MHNM/ MOFURG
Santa María de Rocha	Uruguay	-34,66	-54,21	MHNM
La Floresta (Canelones)	Uruguay	-34,76	-55,67	MHNM
Bella Vista (Montevideo)	Uruguay	-34,8	-55,34	MHNM
José Ignacio (Maldonado)	Uruguay	-34,84	-54,63	MHNM
Piriápolis (Maldonado)	Uruguay	-34,87	-55,27	MHNM/ MOFURG
Punta Ballena (Maldonado)	Uruguay	-34,89	-55,04	MHNM
Playa Las Delicias (Maldonado)	Uruguay	-34,91	-54,97	MHNM
Isla Gorriti (Maldonado)	Uruguay	-34,95	-54,96	MHNM
La Pastora (Maldonado)	Uruguay	-34,95	-54,93	MHNM
Punta del Este (Maldonado)	Uruguay	-34,96	-54,94	MHNM
Isla de Lobos (Maldonado)	Uruguay	-35,02	-54,88	MHNM
Mar del Plata (Buenos Aires)	Argentina	-37,99	-57,54	MOFURG
Necochea (Buenos Aires)	Argentina	-38,58	-58,71	MHNM
Puerto Belgrano (Buenos Aires)	Argentina	-38,9	-62,09	MHNM
Los Medanos (Buenos Aires)	Argentina	-39,44	-62,02	MOFURG
Punta Villarino (Río Negro)	Argentina	-40,82	-64,89	MHNM
Carmen de Patagones (Río Negro)	Argentina	-41,03	-62,79	MHNM
Desembocadura del Río Negro (Río Negro)	Argentina	-41,04	-62,78	MHNM

**Tabla 3.3.** Secuencias de ADN de *Brachidontes* utilizadas en este capítulo junto con su código de acceso a Genbank (el resto de las secuencias utilizadas se detallan en la Tabla 2.2), o el número de identificación del laboratorio en el caso de no haber sido publicadas.

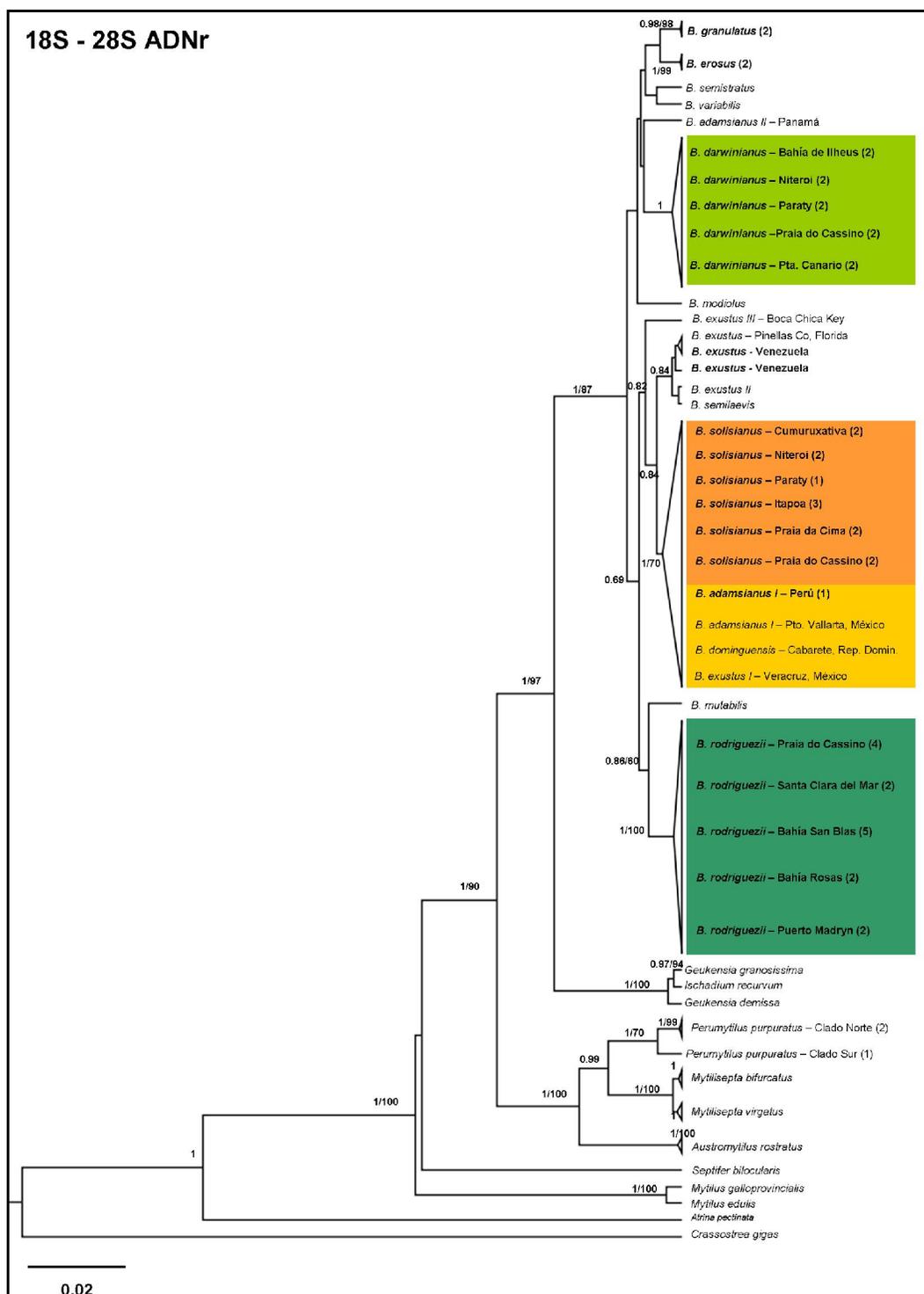
Especies	COI	28S ADNr	18S ADNr	Referencias
<i>B. solisianus</i>	285, 286, 290, 291, 293, 294, 242-244, 254, 256-264, 354-358, 441-447, 449-452, 536, 537-540, 542-545	242-243, 254, 256, 288, 289, 441, 442, 536, 537, 554, 555	242, 243, 254, 256, 291-293, 441, 442, 536, 537	Secuencias obtenidas en este estudio
<i>B. darwinianus</i>	223, 224, 226-230, 345, 346, 429-431, 433-438, 546	221, 222, 345, 346, 429, 430, 546, 564	221, 223, 430, 546, 557	Secuencias obtenidas en este estudio
<i>B. rodriguezii</i>	547-550, 557, 558	550, 550, 547, 558	46, 47, 547, 548, 558	Secuencias obtenidas en este estudio
<i>B. "adamsianus" F</i>	AY825158- AY825187	579	-	Lee y Ó Foighil, 2005, secuencia obtenida en este estudio
<i>B. "exustus" F</i>	AY825127- AY825138, AY825216, AY825192, AY825193	AY825104	-	Lee y Ó Foighil, 2005

---

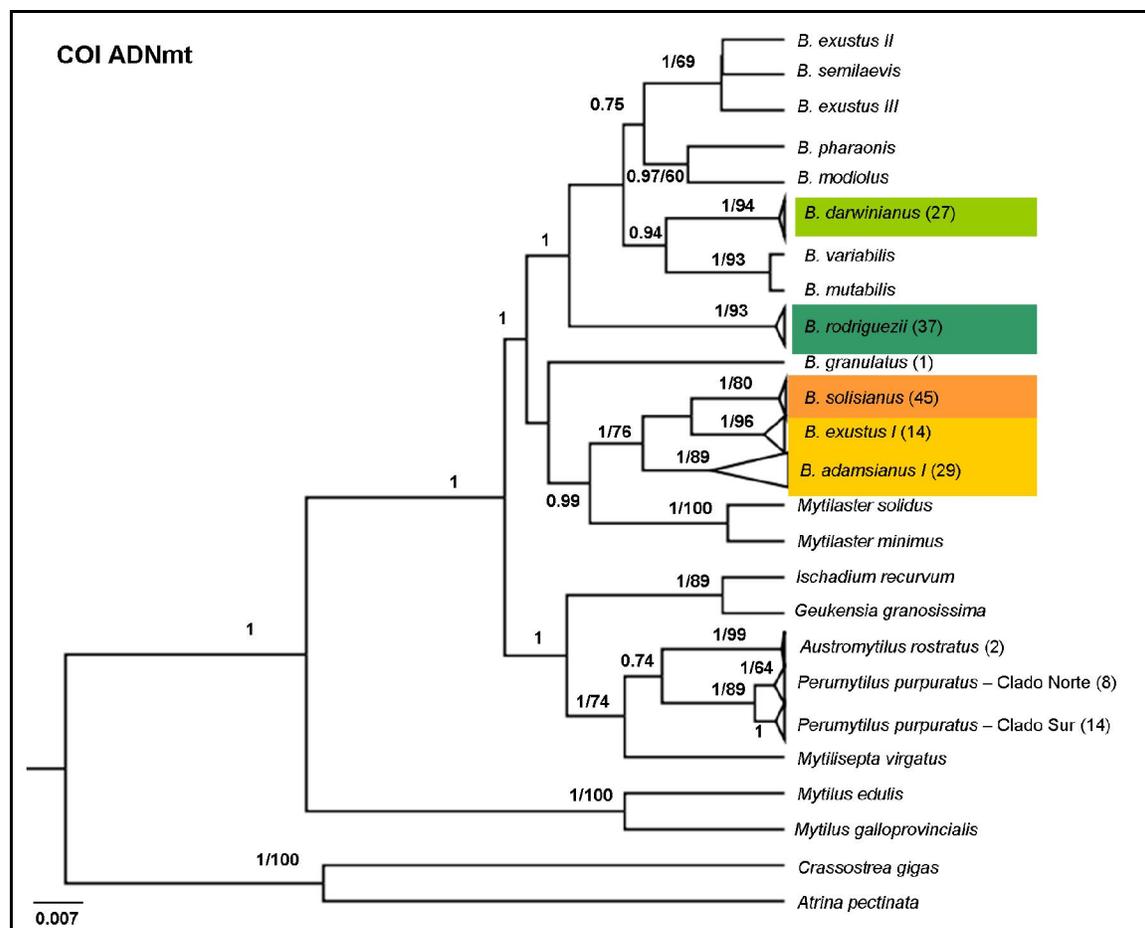
## RESULTADOS

### Filogenia de *Brachidontes* s.s. y estimación de tiempos de divergencia

Las filogenias inferidas a partir de datos mitocondriales y nucleares recuperaron tres clados con alto soporte: [i] *Brachidontes* s.l. [ii] *Ischadium* + *Geukensia* y [iii] *Austromytilus* + *Mytilisepta* + *Perumytilus*, coincidente con los resultados del Capítulo 2. *Brachidontes solisianus* (Brasil), se agrupa con un alto valor de soporte con *B. “exustus I”* (Caribe Occidental) y su par geminado, *B. “adamsianus I”* (Pacífico Oriental), tanto en la filogenia inferida con los genes nucleares como con el gen mitocondrial. En la filogenia basada en el gen mitocondrial (Fig. 3.3) cada una de estas tres especies tiene un alto valor de soporte, mientras que esto no ocurre en la filogenia basada en los genes nucleares (Fig. 3.2). El ejemplar secuenciado de Paita (Perú), se agrupa con *B. “adamsianus I”* (Fig. 3.2), indicando que el miembro Pacífico de este grupo se distribuye desde México hasta el norte de Perú. En las filogenias construidas a partir de los genes nucleares y del gen mitocondrial se observan discordancias en las relaciones filogenéticas dentro del clado de *Brachidontes* s.s. Asumiendo un tiempo de separación entre *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”* de 3,3 +/- 0,2 Ma y una distancia genética de 20,2% (ver Tabla 3.4), se calculó una tasa de substitución para estas especies de 0.03 substituciones/sitio/Ma. Utilizando esta información se estimó el tiempo de divergencia entre *B. “exustus I”* y *B. solisianus* en aproximadamente 2,6 +/- 0,6 Ma.



**Figura 3.2.** Reconstrucción filogenética bayesiana de los Brachidontinae a partir de los genes 18S y 28S concatenados. Los números sobre las ramas representan los valores de probabilidades posteriores bayesianas / “bootstraps” de máxima verosimilitud (sólo > 60) como soporte para los nodos. Las especies secuenciadas en este estudio se indican en negrita y los números entre paréntesis que siguen al nombre de las especies señalan el número de secuencias.



**Figura 3.3.** Reconstrucción filogenética bayesiana de los Brachidontinae a partir del gen mitocondrial COI. Los números sobre las ramas representan los valores de probabilidades posteriores bayesianas / “bootstraps” de máxima verosimilitud (sólo > 60) como soporte para los nodos. Las especies secuenciadas en este estudio se indican en negrita y los números entre paréntesis que siguen al nombre de las especies señalan el número de secuencias.

### Estructura y diversidad genética de las especies – Historia demográfica

Los índices de saturación observados (Isso) fueron significativamente menores que los esperados (Isse) (Isso: 0,22 a 0,23 < Isse: 0,35 - 0,75;  $p < 0,05$ ), sugiriendo poca saturación para las secuencias mitocondriales, por lo cual se procedió a realizar todos los análisis con la matriz completa. No se detectaron indeles o codones de parada en las secuencias.

A partir de los resultados, los cuales sugirieron una relación filogenética cercana entre *B. solisianus*, *B. “exustus P”* y *B. “adamsianus P”*, se calculó la distancia genética entre las especies sobre la matriz de datos mitocondriales COI. La distancia genética entre especies presentó valores de 16% a 20,2%, mientras que la distancia genética dentro de las especies, varió entre 0,02% y 0,03% (N=89; Tabla 3.4). Los resultados del AMOVA realizado a partir del marcador mitocondrial (COI) dieron soporte para rechazar la hipótesis de panmixia (Tabla 3.5). El análisis de AMOVA indicó que el 77,22% (COI) de la variación genética entre *B. solisianus*, *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”* se debió a la partición entre especies nominales clasificadas en base a caracteres fenotípicos.

**Tabla 3.4.** Distancias genéticas calculadas con el método “*p-distance*” entre y dentro *Brachidontes solisianus*, *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”*, basadas en datos de secuencias mitocondriales. Las estimaciones del error estándar (ES) se obtuvieron mediante “*bootstrap*” (1000 réplicas).

	Distancia genética media (%)	E
<b>Entre grupos</b>		
<i>B. solisianus</i> - <i>B. “exustus P”</i>	16,0	0,015
<i>B. solisianus</i> - <i>B. “adamsianus P”</i>	17,5	0,014
<i>B. “exustus P”</i> - <i>B. “adamsianus P”</i>	20,2	0,014
<b>Dentro de grupos</b>		
<i>B. solisianus</i>	0,002	0,001
<i>B. “exustus P”</i>	0,074	0,007
<i>B. “adamsianus P”</i>	0,032	0,005

**Tabla 3.5.** Análisis molecular de la varianza (AMOVA) del gen mitocondrial COI para *B. solisianus*, *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”* (\*  $p < 0,05$ ).

Gen	Fuente de variación	df	Índices de fijación	% de variación
COI	Entre grupos: <i>solsianus</i> vs “ <i>exustus P</i> ” vs “ <i>adamsianus P</i> ”	2	$\Phi_{CT}$ : 0,77*	77,22
	Entre poblaciones	8	$\Phi_{ST}$ : 0,93*	16,30
	Dentro de poblaciones	78	$\Phi_{SC}$ : 0,71*	6,48
	Total	88		

Los índices de diversidad genéticos - número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), número medio de diferencias nucleóticas (k) y diversidad nucleotídica (Pi) - fueron similares entre las distintas especies. Sólo una de ellas, *B. solisianus*, mostró evidencias de expansión poblacional y/o de selección positiva, con valores de  $F_s$  y D de Tajima negativos y significativos (Tabla 3.6).

Los valores de  $\Phi_{ST}$  pareados dentro de *B. solisianus* indican que no hay diferenciación genética significativa entre las poblaciones (Tabla 3.7). En contraste, los valores de  $\Phi_{ST}$  pareados dentro de *B. darwinianus* indican que las tres poblaciones presentan diferenciación genética significativa (Tabla 3.8). En el caso de *B. rodriguezii*, a pesar de haber aplicado la corrección de Holm-Bonferroni (específica para comparaciones múltiples), se obtiene el mismo patrón observado en el Capítulo 1, donde la población de Santa Clara del Mar se diferencia del resto de las poblaciones. La población incorporada en este capítulo, Praia do Cassino (Brasil), presenta diferencias genéticas significativas con la población de Bahía San Blas (Argentina) (Tabla 3.9).

**Tabla 3.6.** Índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad por localidad y por especie basados en secuencias de ADNmt (COI) de las especies de *Brachidontes*. N: número de muestras analizadas; S: número de sitios polimórficos; k: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica;  $\Pi$ : número medio de diferencias nucleotídicas y DS: desviación estándar. (\*) Diferencias estadísticamente significativas. *F<sub>s</sub>* se considera significativo cuando  $p < 0,02$ ; mientras que D de Tajima se considera significativa cuando  $p < 0,05$ .

<b>Localidad</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>k</b>	<b>Hd</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b><math>\Pi</math></b>	<b><i>F<sub>s</sub></i></b>	<b>D de Tajima</b>
<i>B. solisianus</i>								
Cumuruxativa	11	7	5	0,80	0,002	1,48	-0,66 (p=0,25)	-1,03 (p=0,17)
Niteroi + Paraty	9	8	5	0,83	0,003	2,00	-0,78 (p=0,27)	-1,46 (p=0,09)
Itapoa	5	6	4	0,90	0,003	2,00	-0,56 (p=0,22)	-0,66 (p=0,37)
Praia da Cima	10	9	7	0,86	0,003	1,95	-3,34* (p=0,01)	-1,68* (p=0,03)
Praia do Casino	9	3	2	0,58	0,001	1,11	1,84 (p=0,78)	-1,51 (p=0,05)
<b>Total</b>	<b>44</b>	<b>22</b>	<b>19</b>	<b>0,68</b>	<b>0,002</b>	<b>1,34</b>	<b>-19,41* (p=0,001)</b>	<b>-2,41* (p&lt;0,01)</b>
<i>B. darwinianus</i>								
Bahía de Ihleus	9	1	2	0,22	0,0003	0,22	0,67 (p = 0,43)	-1,36 (p = 0,09)
Niteroi + Paraty	9	3	3	0,41	0,0013	0,66	-0,38 (p = 0,17)	-1,51 (p = 0,05)
Punta Canario	8	3	4	0,64	0,0015	0,75	-1,83* (p = 0,01)	-1,45 (p = 0,07)
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>0,81</b>	<b>0,005</b>	<b>2,21</b>	<b>-0,38 (p &gt; 0,10)</b>	<b>-1,08 (p = 0,30)</b>
<i>B. rodriguezii</i>								
Praia do Casino	6	6	3	0,73	0,009	2,80	1,67 (p = 0,80)	0,38 (p = 0,65)
Santa Clara del Mar	6	7	3	0,60	0,006	3,33	2,03 (p = 0,87)	0,51 (p = 0,67)
Bahía San Blas	8	10	5	0,86	0,007	4,04	0,33 (p = 0,53)	0,22 (p = 0,63)
Bahía Rosas	9	2	3	0,41	0,0008	0,42	-1,08 (p = 0,05)	-1,36 (p = 0,09)
Puerto Madryn	8	1	2	0,25	0,0004	0,25	-0,18 (p = 0,20)	-1,05 (p = 0,22)
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>10</b>	<b>7</b>	<b>0,58</b>	<b>0,006</b>	<b>1,92</b>	<b>1,16 (p&gt;0,10)</b>	<b>0,37 (p=0,83)</b>

**Tabla 3.7.** Comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$  (debajo de la diagonal) y distancia aproximada entre las poblaciones de *B. solisianus* en km (arriba de la diagonal). En el caso de las comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$ , los valores de  $p$  sin corregir se muestran a la izquierda de la barra y después de las correcciones de Holm-Bonferroni a la derecha de la barra. (\*): Diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p$  inferior a su valor corregido).

<i>Brachidontes solisianus</i>	1	2	3	4	5
1-Cumuruxativa	-	980	1950	2230	2960
2-Niteroi + Paraty	0,008 (0,50/0,010)	-	970	1200	1900
3-Itapoa	0,001 (0,37/0,008)	0,004 (0,35/0,007)	-	290	1000
4-Praia da Cima	0,030 (0,77/0,05)	0,029 (0,73/0,025)	0,028 (0,70/0,017)	-	730
5-Praia do Casino	0,047 (0,14/0,006)	0,006 (0,58/0,013)	0,145 (0,08/0,005)	0,045 (0,11/0,006)	-

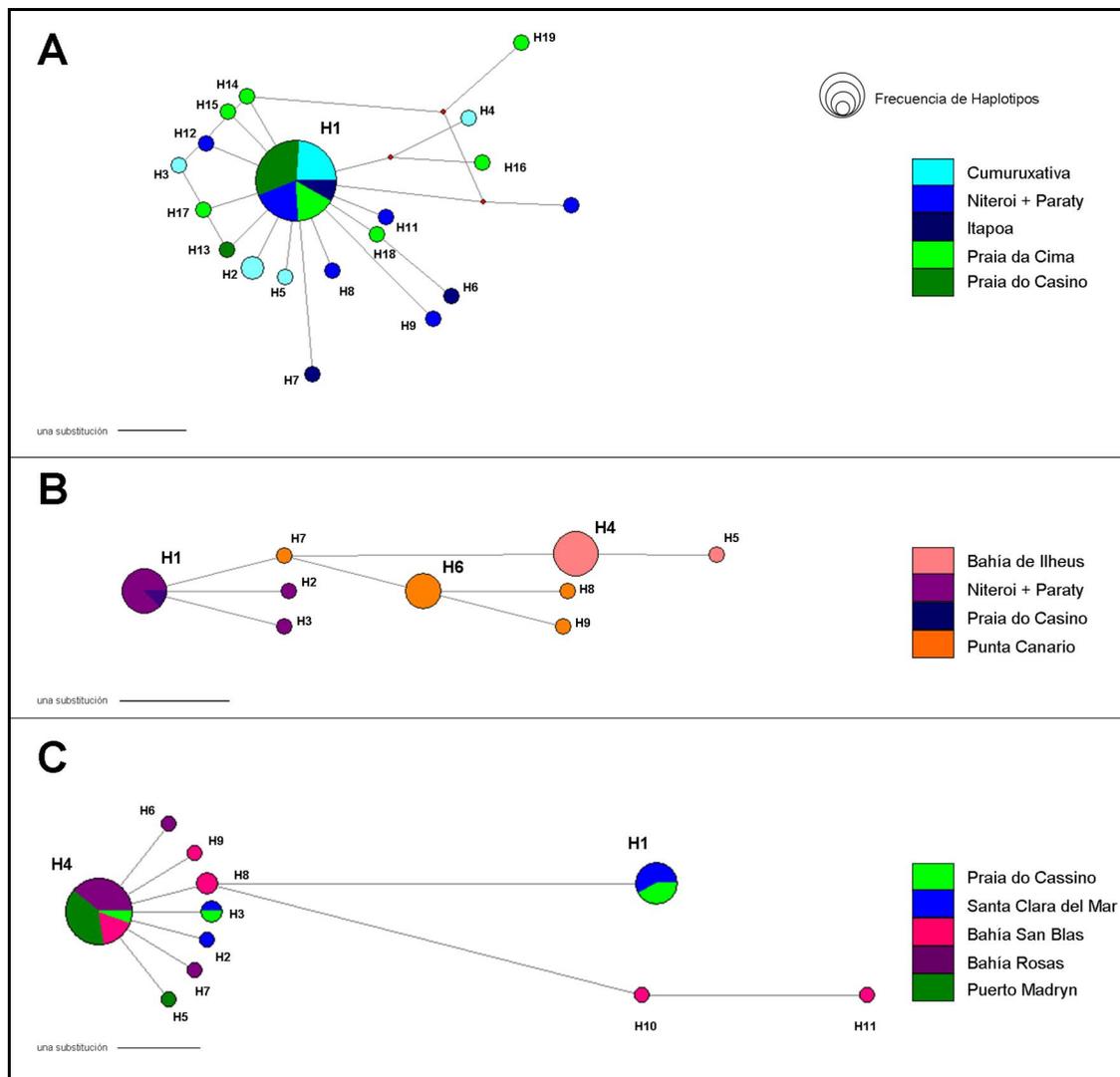
**Tabla 3.8.** Comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$  (debajo de la diagonal) y distancia aproximada entre las poblaciones de *B. darwinianus* en km (arriba de la diagonal). (\*): Diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p < 0,05$ ). Los valores de  $p$  fueron todos iguales a 0.0000001 por lo que la corrección de Holm-Bonferroni no pudo ser calculada.

<i>Brachidontes darwinianus</i>	1	2	3
1-Bahía de Ihleus	-	1270	3570
2-Niteroi + Paraty	0,84*	-	2380
3-Punta Canario	0,85*	0,68*	-

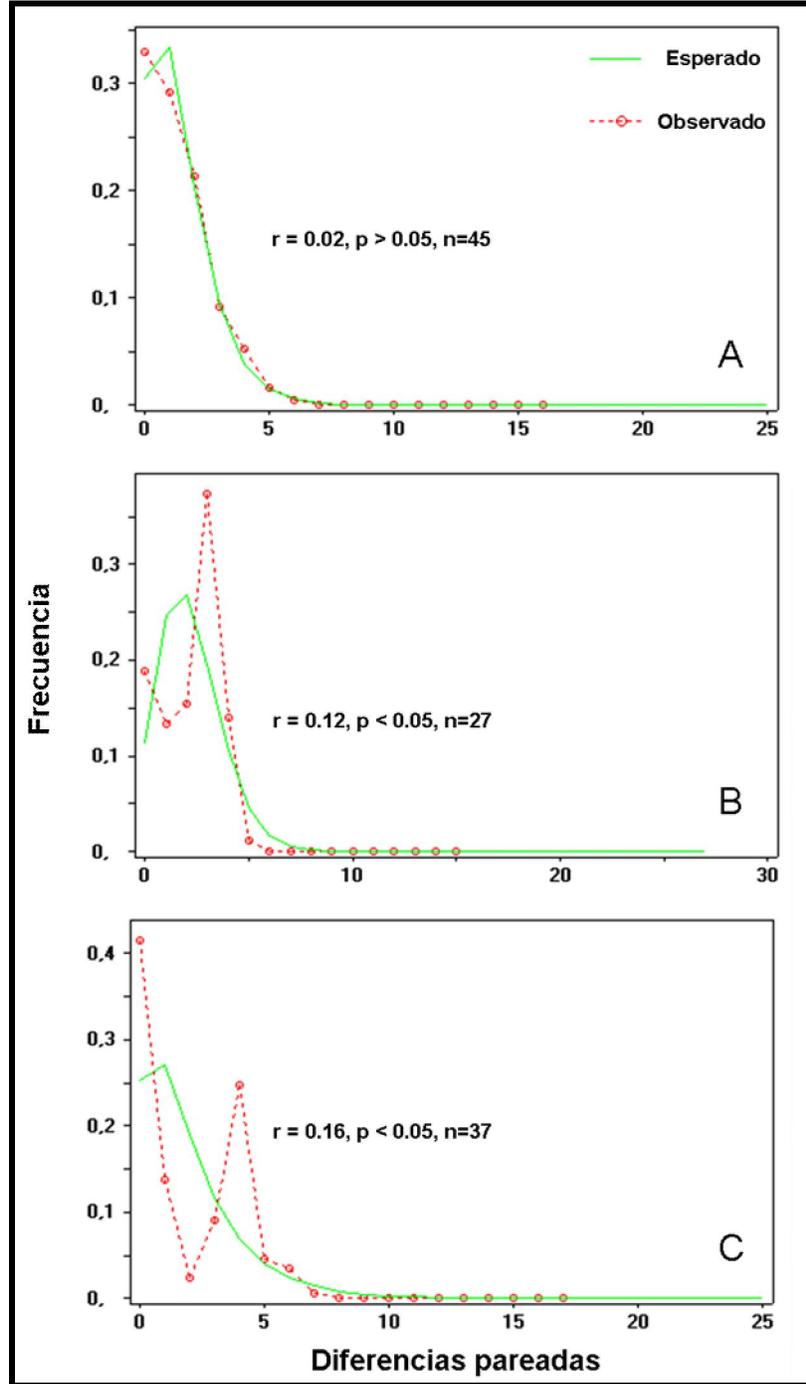
**Tabla 3.9.** Comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$  (debajo de la diagonal) y distancia aproximada entre las poblaciones de *B. rodriguezii* en km (arriba de la diagonal). En el caso de las comparaciones pareadas  $\Phi_{ST}$ , los valores de  $p$  sin corregir se muestran a la izquierda de la barra y después de las correcciones de Holm-Bonferroni a la derecha de la barra. (\*): Diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p$  inferior a su valor corregido).

<i>Brachidontes rodriguezii</i>	1	2	3	4	5
1- Praia do Casino	-	1100	1700	1800	2100
2- Santa Clara del Mar	0,16 (0,99/0,025)	-	500	600	1100
3- Bahía San Blas	0,30* (0,004/0,006)	0,34* (0,003/0,006)	-	100	400
4- Bahía Rosas	0,61 (0,10/0,02)	0,64* (0,003/0,005)	0,257 (0,01/0,008)	-	300
5- Puerto Madryn	0,59 (0,014/0,01)	0,62* (0,006/0,007)	0,236 (0,08/0,013)	0,000 (0,99/0,05)	-

*Brachidontes solisianus* exhibió una red de haplotipos en forma de estrella y una distribución unimodal (Figs. 3.5A, 3.6A), mientras que *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* presentaron redes expandidas y distribuciones multimodales (Figs. 3.5B-C, 3.6B-C). En la red de haplotipos de *B. solisianus*, el haplotipo 1 tiene la frecuencia más alta, posee una amplia distribución geográfica y tiene muchas conexiones con haplotipos poco frecuentes (Fig. 3.4A). En el caso de *B. darwinianus* el haplotipo 1 y 4 son los más frecuentes (Fig. 3.4B), mientras que en la red de *B. rodriguezii* (Fig. 3.4C) el haplotipo 4 es el más frecuente y posee una amplia distribución geográfica.



**Figura 3.4.** Red de haplotipos de: (A) *B. solisianus*, (B) *B. darwinianus* y (C) *B. rodriguezii*.

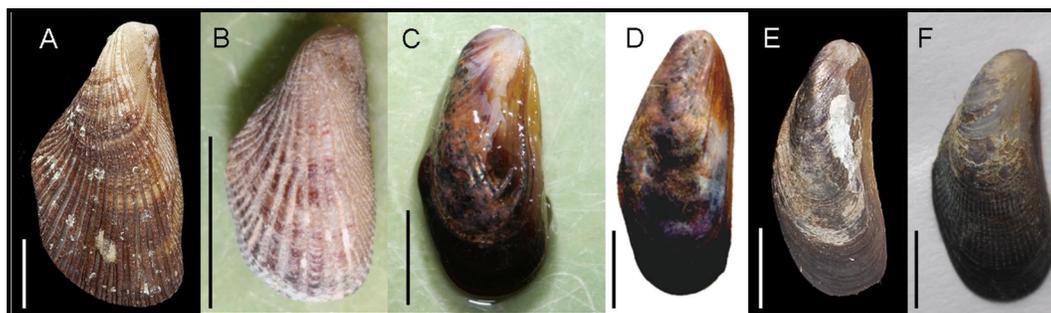


**Figura 3.5.** Distribución de diferencias pareadas (“mismatch”) de: (A) *B. solisianus*, (B) *B. darwinianus* y (C) *B. rodriguezii*.

### Revisión del material de los museos

Las muestras de *Brachidontes solisianus* se distribuyeron desde Ceará (Brasil, 3.7°S) hasta el muelle este de Río Grande do Sul (32.1°S), las muestras de *B. darwinianus* desde Bahía (Brasil, 13°S) hasta Punta del Este (Uruguay, 34.9°S), y las de *B. rodriguezii* desde Garopaba (Brasil, 28.9°S) hasta Puerto Madryn (Argentina, 42°S) (Fig. 3.1; Tabla 3.2).

Lee y Ó Foighil (2005) encontraron que los especímenes identificados morfológicamente como *B. adamsianus* Dunker correspondían a dos clados diferentes. La re-examinación de sus materiales en este estudio mostró que *Brachidontes* “*adamsianus* IP” (Fig. 3.6B) se corresponde fenotípicamente con la descripción original de *B. adamsianus* (Fig. 3.6A), en tanto el material identificado como *B. “adamsianus* I” (Fig. 3.6C) se asemeja fenotípicamente a la serie tipo de *B. solisianus* d’Orbigny (Fig 3.6E), al material de esa especie recolectado como parte de este estudio (Fig 3.6F), y a *B. “exustus* I” (Fig 3.6D).



**Figura 3.6.** (A) Sintipo de *Mytilus adamsianus* Dunker de Panamá (ID: 18565317\_04, imagen cortesía de Harry Taylor, Natural History Museum); (B) *B. “adamsianus* IP” de Isla Jicarón, Panamá (Lee y Ó Foighil, 2005, ID: 9067); (C) *B. “adamsianus* I” de Pto Vallarta, México (Lee y Ó Foighil, 2005, ID: 9077); (D) *B. “exustus* I” de Veracruz, México (Lee y Ó Foighil, 2005); (E) Sintipo de *B. solisianus* d’Orbigny; (F) *B. solisianus* de Cumuruxativa, Brasil.

## DISCUSIÓN

### Relaciones filogenéticas y patrones filogeográficos

La reconstrucción filogenética a partir de datos nucleares y mitocondriales sugiere que *B. solisianus*, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* son especies pertenecientes a linajes diferentes dentro del clado *Brachidontes* s.s.

En las filogenias construidas a partir de los genes nucleares y del gen mitocondrial se observan discordancias en las relaciones filogenéticas dentro del clado de *Brachidontes* s.s. Una causa genérica potencial de la incongruencia parcial entre los árboles basados en ADN nuclear y mitocondrial es una señal filogenética débil, que puede resultar en una pobre resolución filogenética o en árboles inexactos de genes como un artefacto de la reconstrucción filogenética (Funk y Omland, 2003). Como se señaló en el Capítulo 1, se necesitarían otros estudios, incluyendo más especies de *Brachidontes* y géneros afines, así como muestras de otras regiones del mundo para resolver la filogenia completa del grupo. Sin embargo, por fuera de las discordancias, se observa que *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* no muestran una relación cercana con el complejo “*B. exustus*”. Mientras que en la filogenia inferida a partir del marcador mitocondrial COI, *Brachidontes solisianus*, que se distribuye a lo largo de las costas de Brasil, forma parte del complejo “*B. exustus*” *sensu* Lee y Ó Foighil (2005), agrupándose con *B. “exustus I”* (golfo de México y Caribe) y *B. “adamsianus I”* (Pacífico tropical). Aún cuando la clarificación de la taxonomía del género no es parte de los objetivos de este estudio, cabe destacar que el re-examen de los materiales de *B. “adamsianus I y II”* estudiados por Lee y Ó Foighil (2005) muestran correspondencia entre fenotipos y genotipos que no habían sido detectadas.

La distribución de *B. solisianus*, *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”*, especies estrechamente relacionadas entre sí, muestra dos disyunciones: una correspondiente al istmo de Panamá entre *B. “exustus I”* y *B. “adamsianus I”* (discutida por Lee y Ó Foighil, 2005), y la otra a un hiato ecuatorial entre *B. “exustus I”* y *B. solisianus*. Esta última constituye un ejemplo de un tipo de antitropicalidad conocido como “antiecuatorial” (Randall, 1982), con *B. “exustus I”* y *B. solisianus* distribuidas respectivamente al norte y al sur de las plumas combinadas del Orinoco y el Amazonas.

La hipótesis con mayor evidencia paleontológica y genética que explica el origen de los patrones bi-polares y bi-templados es dispersión transtropical durante el periodo de

enfriamiento del Plio-Pleistoceno (Berg, 1933; Grant y Leslie, 2001; BurrIDGE, 2002). Los patrones antiecuatoriales observados en el Atlántico occidental han sido a veces atribuidos a la historia de flujo del Amazonas. En el caso de *B. solisianus* y *B. "exustus I"* la temperatura podría no ser un factor relevante, ya que ambas especies están presentes en la región intertropical. En cambio, al ser estas especies marinas y típicas de costas rocosas, la salinidad y el hábitat serían los factores determinantes de la disyunción. De acuerdo con los registros geológicos, la deposición de sedimentos y el flujo de agua dulce por el río Amazonas se iniciaron a finales del levantamiento de los Andes, que invirtió el flujo del río hacia el Océano Atlántico a principios del Mioceno tardío, hace alrededor de 10 Ma (Hoorn, 1993, 1996). Actualmente el río Amazonas descarga un gran volumen de agua dulce en el Atlántico (Curtin, 1986 a,b), lo que provoca una alteración de la salinidad y sedimentos de descarga de hasta 500 km hacia el mar y 30 m de profundidad (Rocha, 2003). Esta barrera es considerada selectiva, ya que para algunos grupos de organismos la pluma del Amazonas no significa una barrera completa a la dispersión. Joyieux et al. (2001) encuentran baja diferenciación genética entre poblaciones/especies de peces de arrecife del Caribe y Brasil, sugiriendo que la barrera es cruzada ocasionalmente. Por el contrario, Tourinho et al. (2012) encontraron alta diferenciación genética entre las poblaciones de la langosta espinosa (*Panulirus argus*) del Caribe y Brasil, y estiman un tiempo de divergencia aproximado de 16 Ma (5- 23 Ma), hipotéticamente relacionado con el comienzo del flujo del Amazonas hacia el Atlántico. La distancia genética encontrada en la langosta es comparable a la hallada entre *Brachidontes solisianus* y *B. "exustus I"* en este estudio.

El tiempo de divergencia estimado para el par *B. solisianus* - *B. "exustus I"* es 2,6 Ma (2,45-2,77 Ma), centrado en el Pleistoceno. Esta disyunción sería más reciente que la de *B. "exustus I"* y *B. "adamsianus I"*, atribuida al levantamiento del istmo de Panamá y estimada en 3,3 Ma (3,1-3,5 Ma). La menor distancia genética entre *B. solisianus* y *B. "exustus I"* podría no reflejar la edad relativa del evento geológico que originó la disyunción, sino la "permeabilidad" de la barrera Amazónica comparada con el istmo de Panamá durante el Pleistoceno.

La hipótesis más plausible acerca de la historia evolutiva de *B. solisianus* y *B. "exustus I"* es vicarianza a través de especiación parapátrica (separación con contacto ocasional). Previo al origen del Amazonas (ca. 10 Ma) y al levantamiento del istmo de Panamá, el ancestro común de *B. solisianus*, *B. "exustus I"* y *B. "adamsianus I"* habría estado distribuido en el Pacífico oriental tropical, el Caribe y las costas de Brasil. Al aumentar el flujo del

Amazonas habría comenzado a desarrollarse la barrera que separó a las poblaciones brasileras y caribeñas, que comenzaron a diferenciarse aún cuando habría persistido flujo génico ocasional. La divergencia entre *B. solisianus* y *B. "exustus P"* puede haber estado asociada a la intensificación del caudal del río causada por un levantamiento y erosión de los Andes durante el Plioceno ( $5,3 \pm 1,6$  Ma; Hoorn, 1994), haciéndose efectiva durante el Pleistoceno. Con respecto a la separación de *B. "adamsianus P"*, es plausible que fuera consecuencia de la formación del Istmo de Panamá, usualmente estimada en 3,3 Ma. La edad de cierre del istmo y sus implicaciones biogeográficas ha sido un tema de reciente debate (Stone, 2013). La hipótesis con mayor evidencia es la del cierre completo durante el Plioceno (3,1-3,5 Ma, e.g. Jackson y O'Dea, 2013), hipótesis alternativas apoyan un cierre mucho mas temprano (~15 Ma, Montes et al., 2012). Sin embargo, las conexiones inter-oceánicas poco profundas parecen haber persistido durante el Plioceno, no afectando la conectividad entre poblaciones de especies que, como los mejillines, se distribuyen en aguas muy someras. Luego del levantamiento final del istmo (~ 3,3 Ma) las poblaciones del Pacífico tropical y el Caribe quedaron totalmente aisladas, sin posibilidad flujo génico entre ellas. Así, mientras que la hipótesis más probable sobre la especiación de *B. "adamsianus P"* (Pacífico tropical) es vicarianza por alopatria hace aproximadamente 3,3 Ma con la formación del Istmo de Panamá, la hipótesis sobre la especiación de *B. solisianus* parece haber sido por vicarianza parapatrica, un proceso lento que podría haber comenzado en el Mioceno Superior y habría culminado durante el Pleistoceno.

Con respecto a *B. darwinianus*, las hipótesis de una estrecha relación con el "complejo *exustus*" y un patrón de distribución antitropical, basadas en la literatura taxonómica (e.g. Ríos, 1994), son claramente refutadas por los resultados de este estudio. La filogenia inferida en base a genes nucleares indica que *B. darwinianus* no forma parte del "complejo *exustus*". El origen de *B. darwinianus*, una especie estuarial, es intrigante. Una hipótesis es que el escenario haya sido la posible conexión entre el Atlántico y el mar Caribe durante el Mioceno, como ha sido sugerido para otros grupos de invertebrados (e.g. anémonas de tubo, Stampar et al., 2012), aunque la existencia de tal conexión ha sido seriamente cuestionada (Wesselingh y Salo, 2006; Cooke et al., 2012).

Finalmente, como fue indicado en el Capítulo 1, *B. rodriguezii* es una especie bien definida, y habría divergido muy tempranamente dentro del género. La presencia de formas fósiles en el Mioceno superior de la provincia Parania motivó la hipótesis de una larga

historia evolutiva en la región (Capítulo 1). Esta hipótesis es considerada en detalle en el Capítulo 4.

### **Estructura y diversidad genética de las especies – Historia demográfica**

Las tres especies que se distribuyen en la región templado-cálida del Atlántico Sudoccidental, *B. solisianus*, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii*, presentaron diferencias en su estructura y diversidad genética así como también en su historia demográfica. *B. solisianus* exhibió signos de expansión y poblaciones sin diferenciación genética significativa, a pesar de la amplia distribución a lo largo de la costa de Brasil, mientras que, *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* presentaron diferenciación genética significativa entre sus poblaciones, sin evidencias de cambios recientes en el tamaño poblacional. La estructuración observada entre las poblaciones de *B. darwinianus* podría estar relacionado a que esta especie es típica de ambientes estuariales, los cuales a menudo son discontinuos, separados entre sí por extensas líneas de costa marina que podrían actuar como barreras a la dispersión. En el caso de *B. rodriguezii*, también discutido en el Capítulo 1, la diferenciación encontrada entre Santa Clara del Mar y el resto de las poblaciones ubicadas hacia el sur estaría relacionada con que entre estas poblaciones existen cientos de kilómetros de costa con playas arenosas y planos de marea fangosos (SEGEMAR, 2000), hábitats no adecuados para los mejillines.

## Distribución geográfica y ecológica de las especies

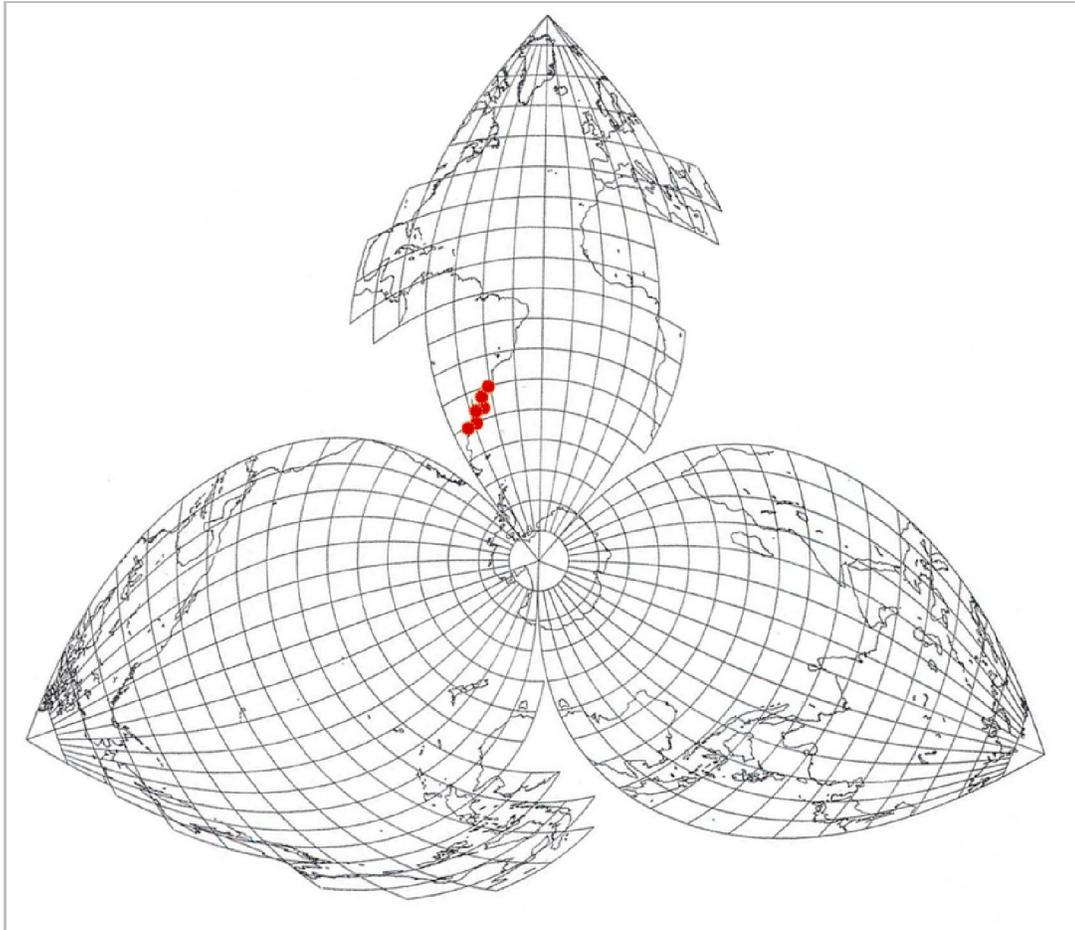
*Brachidontes solisianus* fue originalmente descrita por d'Orbigny (1842, 1846) en base a material colectado en Maldonado (Uruguay) y Río de Janeiro (Brasil), aunque las etiquetas del Museo Británico indican únicamente la primera de estas dos localidades. Desde su descripción original, *B. solisianus* no fue vuelta a citar para aguas Uruguayas. Como parte de este estudio se hizo una prospección del área recorrida por d'Orbigny, orientada por sus crónicas de viaje. El la observó “*sur les roches des environs de Maldonado, á l'embouchure de la Plata. Elle s'y attache par milliers sur les roches*”. En el sitio donde presumiblemente hizo sus observaciones (Punta Ballena) solo se halló *B. rodriguezii* en gran abundancia, y *B. darwinianus* en menor abundancia y circunscripto a algunas pozas. Dos hipótesis explicarían la ausencia de esta especie en el área. La primera es que en la época en que d'Orbigny exploró el litoral uruguayo esta especie se encontraba presente en el área, pero ha desaparecido de allí desde entonces. La segunda es que lo que él observó era en realidad *B. rodriguezii*. En este caso el material depositado en el Museo Británico debería haber sido colectado en Río de Janeiro, no en Maldonado como indican las etiquetas. La respuesta a este problema excede los objetivos de este estudio.

Existen, en cambio, numerosos registros de *B. solisianus* para las costas de Brasil al norte de Santa Catarina (28°S). Como parte de este estudio se visitaron también los escasos hábitats de sustrato duros presentes en la costa de Río Grande do Sul, caracterizada por aproximadamente 680 km de playas arenosas que se extienden entre La Coronilla (Uruguay) y Cabo Torres (Norte de Río Grande do Sul). Las únicas interrupciones son los muelles de Río Grande (31.5°S), construídos en 1915, y el casco del buque Altair, encallado en la zona intermareal al sur de Praia do Cassino (32°S) en la década de 1970s. En este último, se coleccionaron unos pocos especímenes aislados de *B. solisianus*, que constituyen el registro validado mas austral de la especie. El estudio de los materiales depositados en el Museo de Río Grande permitió ampliar el límite norte de distribución hasta los 3° S, en la localidad de Praia do Futuro (Ceará, Brasil).

*Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1842) es usualmente reportado desde los muelles de Río Grande do Sul (32°S) hasta los golfos norpatagónicos (41°-43°S) (Ríos, 1994), corroborado por los ejemplares secuenciados. Sin embargo, el límite norte de la distribución de *B. rodriguezii* según el material revisado de los museos indica que se extiende hasta Garopaba (Santa Catarina, Brasil, 28°S).

*Brachidontes darwinianus* es una especie estuarial cuya presencia está bien documentada para la costa uruguaya y en el este y sur de Brasil, donde puede superponerse con *B. solisianus* en hábitats transicionales. El límite sur de la distribución de *B. darwinianus* no está bien establecido. d'Orbigny (1842) basó la descripción original en materiales coleccionados en bahía Rosas (pcia. de Río Negro, Argentina), Maldonado (Uruguay) y Río de Janeiro (Brasil). El material coleccionado como parte de este estudio en bahía Rosas fue secuenciado y corresponde a *B. rodriguezii*. A pesar de una búsqueda cuidadosa no se observó en esa zona la presencia de *B. darwinianus*. Posiblemente haya habido una confusión con juveniles de *B. rodriguezii* los cuales presentan un fenotipo similar a *B. darwinianus* (Trovant et al., 2013). El material estudiado (colecciones propias y depositadas en museos) extiende el rango de distribución de esta especie desde Montevideo (34° S, Uruguay) hasta Bahía (13° S, Brasil).

**CAPÍTULO 4.** Relaciones putativas entre *Brachidontes rodriguezii* y formas fósiles del mar Entrerriense (Mioceno)



---

**RESUMEN**

Se ha sugerido que algunos invertebrados marinos hoy presentes en el Atlántico sudoccidental podrían haber evolucionado regionalmente a partir de las faunas del Neógeno. Ello sería el caso, en particular, de especies templado-cálidas relacionadas con formas presentes en las provincias Paranaiana y Valdesiana, correspondientes a la transgresión marina Entrerriense (Mioceno). Entre los moluscos de esa edad se encuentra *Brachidontes lepida* (Philippi, 1893), la cual ha sido considerada por algunos autores como una subespecie de *B. rodriguezii* (d'Orbigny), actualmente presente en la Provincia Biogeográfica Argentina. Este criterio taxonómico implica la hipótesis de que *B. rodriguezii* habría evolucionado de la forma presente en la provincia Paranaiana. El objetivo de este capítulo es investigar, en base a técnicas de morfometría geométrica, la relación entre esas dos especies. Se utilizaron muestras de *B. rodriguezii* de 4 localidades distribuidas en Uruguay y Argentina (n=63) y de *B. lepida* de la Formación Paraná (n=26). Se incluyeron, además, las otras dos especies de Brachidontinae actualmente presentes en la región. Se realizó un análisis de componentes principales y un análisis de variables canónicas (sobre los componentes que explicaban la mayor parte de la varianza) con el objetivo de identificar la variación en la forma de la valva entre las especies de mejillines. El análisis morfogeométrico diferenció las cuatro especies incluidas: *B. lepida*, *B. rodriguezii*, *B. darwinianus* y *Perumytilus purpuratus*. No obstante, la comparación de los fenogramas basados en distancias morfogeométricas con los filogramas soportados por información molecular muestra que los caracteres morfológicos capturados por el análisis, aun cuando capaces de discriminar las especies, no reflejan las relaciones filogenéticas entre ellas. Los resultados no respaldan la designación de *B. lepida* como subespecie de *B. rodriguezii*. Ello, no obstante, no constituye evidencia suficiente para rechazar la hipótesis de que las dos especies forman parte de un mismo linaje. La escasa representación del Plioceno para la costa del Atlántico sudoccidental dificulta el estudio de una posible conexión entre ellas. Un carácter compartido por *B. lepida* y *B. rodriguezii* es el aspecto “modioliforme”, un atributo infrecuente en los braquidontinos pero presente en una serie de registros fósiles fragmentarios de Sudamérica austral que se remontan hasta el Paleoceno tardío. Finalmente, se discute un posible escenario para la especiación de *B. darwinianus* en el mar Entrerriense durante el Mioceno.

---

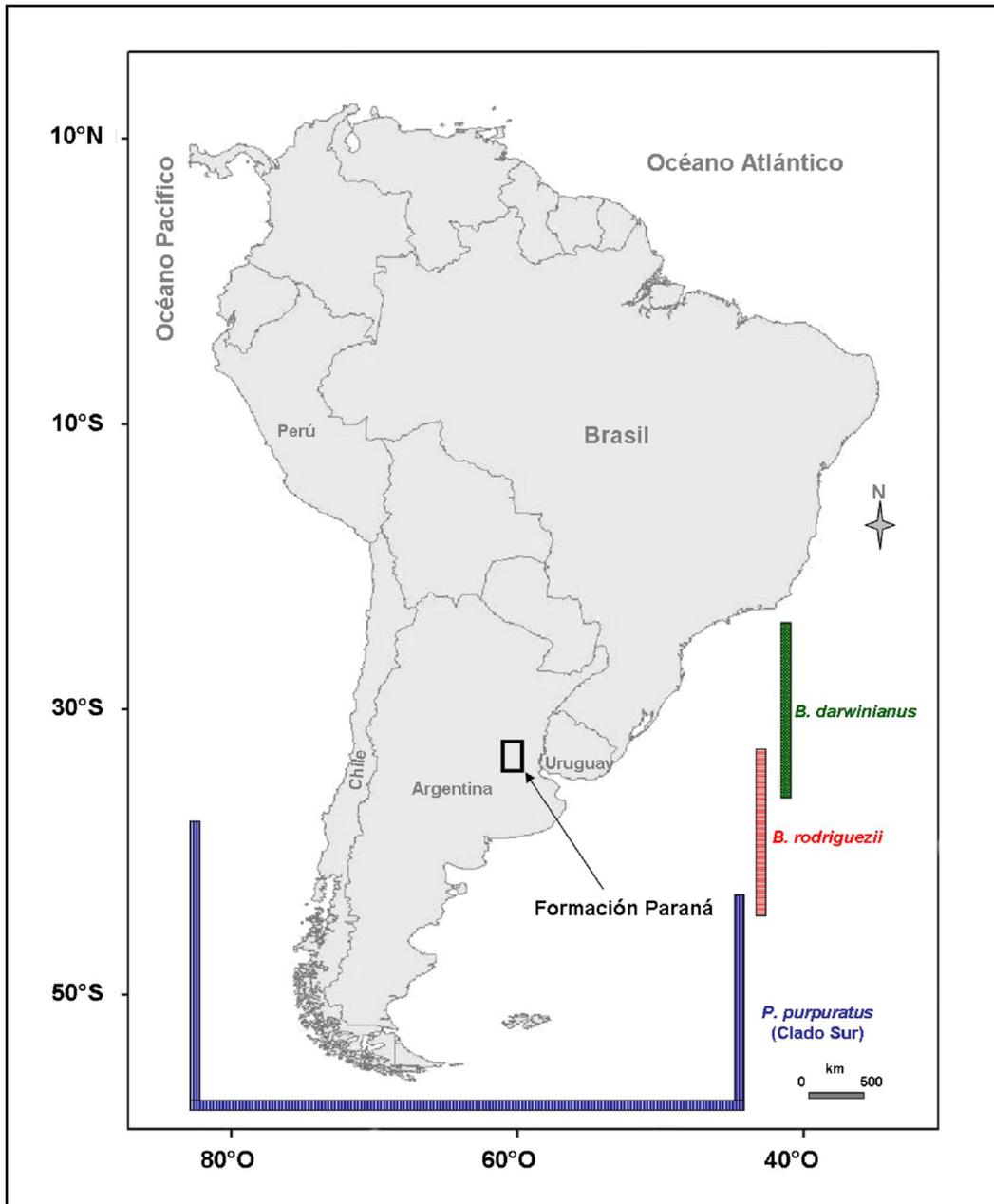
## INTRODUCCIÓN

Durante el Mioceno Superior tuvo lugar la última transgresión marina que inundó América del Sur, conocida como mar Entrerriense (Martínez y del Río, 2005; Malumián y Náñez, 2011). Este mar cubrió un amplio sector del continente, extendiéndose por el este sobre la región mesopotámica (Argentina), y a lo largo del litoral atlántico desde el norte de Patagonia hasta el sur de Brasil. Sus depósitos están expuestos en la región patagónica noroeste (Formación Puerto Madryn; Haller, 1978), en el área vecina a la ciudad de Paraná (Formación Paraná; Yrigoyen, 1969) y en el litoral sur de Uruguay (Formación Camacho; Goso y Bossi, 1966).

Considerando la distribución de las especies halladas en los depósitos y su coincidencia con discontinuidades ambientales, los paleobiogeógrafos diferenciaron dos unidades biogeográficas. La provincia Valdesiana se extendía aproximadamente desde Península Valdés (42° S) hasta el litoral de la provincia de Buenos Aires (37°- 39° S) y la fauna que la caracterizaba está representada en la Formación Puerto Madryn. La provincia Paranaiana se extendía hacia el norte a lo largo de la costa uruguaya y el sur de Brasil, estando representada en las formaciones Paraná y Camacho. Estas dos unidades, integradas fundamentalmente por elementos caribeños, coincidían geográficamente con la región actualmente comprendida en la Provincia Biogeográfica Argentina (Martínez y del Río, 2002 a,b; Figura IG.7).

Algunas especies recientes de bivalvos marinos podrían haber evolucionado regionalmente a partir de las faunas del Neógeno. Ello podría aplicarse, particularmente, a especies templado-cálidas relacionadas con formas presentes en el Mioceno. Algunos autores (e.g. Aguirre y Farinati 1997; Aguirre et al., 2008) apoyan la idea de que una parte importante de los moluscos marinos del Mioceno, se encuentra aún representada en la provincia Argentina, como es el caso de la vieira *Aequipecten paranensis* (d'Orbigny, 1842) y la especie Reciente *A. tehuelchus* d'Orbigny, 1846 (Aguirre et al., 2008; Pérez et al., 2011), mientras que otros (e.g. Martínez y del Río, 2006), sugieren que solo un pequeño porcentaje de la fauna del Mioceno poseen formas relacionadas vivientes en la región, y que el resto de los elementos, retrajeron su distribución hacia el norte, donde aún hoy existen algunos representantes, o se extinguieron.

Entre el abundante y diversificado contenido de moluscos de las sedimentitas entrerrienses de Argentina se encuentra *Brachidontes lepida* (Philippi, 1893) presente en las Provincias Paranaiana (Formación Paraná) y Valdesiana (Formación Pto. Madryn). del Río (1991) ha considerado a esta especie como una subespecie de *B. rodriguezii* (d'Orbigny), viviente en la Provincia Biogeográfica Argentina (Scarabino et al., 2006; Fig. 4.1), motivando la hipótesis de que *B. rodriguezii* podría haber evolucionado de formas presentes en la provincia Paranaiana (Trovant et al., 2013, Figura IG.7). La evaluación de esta hipótesis requiere la concatenación de datos moleculares, paleontológicos y morfogeométricos. Los fenotipos de las dos especies no han sido comparados en detalle.



**Figura 4.1.** Distribución geográfica de *Brachidontes rodriguezii* y de especies cercanas utilizadas en este estudio. El rectángulo indica el sitio de colecta del material fósil identificado como *B. lepida* de la Formación Paraná (provincia Paranaiana).

---

Existen dos técnicas disponibles para evaluar las diferencias fenotípicas entre estas especies: la morfometría clásica y la morfometría geométrica. La primera utiliza distancias lineales y angulares para capturar la forma y el tamaño de los taxones bajo estudio. Una desventaja de esta técnica es que estas medidas presentan problemas estadísticos por el alto grado de correlación entre ellas, lo cual dificulta la interpretación de los patrones de variación (Bookstein et al., 1985). La morfometría geométrica (MG) posee una serie de ventajas, pues permite cuantificar la variación en la forma de los individuos respecto a una forma de referencia (Rohlf y Marcus, 1993). Además, los resultados de los análisis multivariantes se pueden visualizar de manera gráfica, dado que la naturaleza implícita de la información geométrica de la forma no se pierde durante los análisis (Richtsmeier et al., 2002; Adams et al., 2004).

Las técnicas de MG se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellas que trabajan con coordenadas cartesianas (en 2 o 3 dimensiones) de puntos de referencia homólogos (“*landmarks*”; Rohlf y Marcus, 1993) y las que se basan en el análisis de los contornos de los objetos (Rohlf y Archie, 1984). Estudios recientes utilizan una mezcla de estas dos técnicas, utilizando “*semi-landmarks*”. Ambos enfoques proporcionan diferentes tipos de información y se pueden aplicar en circunstancias distintas. La técnica basada en “*landmarks*” permite estudiar los cambios morfológicos a partir del desplazamiento de un conjunto de puntos morfométricos basados en coordenadas cartesianas, los cuales definen la posición de puntos homólogos del ejemplar que se está estudiando. Este método de MG cuantifica la forma de cada espécimen de acuerdo a la ubicación en el espacio de un conjunto de puntos que son homólogos entre individuos. El tamaño y la forma son separados a través de la superposición de Procrustes de los “*landmarks*”, que traslada dichos puntos a un origen de coordenadas común, los escala y los rota hasta minimizar la suma de cuadrados de las distancias (Rohlf y Slice, 1990). Así, la superposición de Procrustes permite cuantificar la variación de la forma como una desviación multidimensional de los “*landmarks*” de un espécimen con respecto a una configuración de referencia (usualmente, el promedio de todas las configuraciones de la muestra) (Rohlf y Marcus, 1993).

La MG es un método apropiado para diferenciar entre grupos de moluscos bivalvos, ya que sus valvas presentan gran variabilidad y no se deforman (Rufino et al., 2007). Los primeros estudios de MG en bivalvos utilizaron principalmente métodos basados en contornos (Ferson et al., 1985; Innes y Bates, 1999; Krapivka et al., 2007), mientras que la mayoría de

los estudios actuales emplean “*landmarks*” o una combinación de ambos enfoques (Palmer et al., 2004; Sousa et al., 2007), los cuales se consideran que poseen mayor potencia (Rufino et al., 2007). Para diferenciar entre distintas especies de mejillines del género *Brachidontes* se han aplicado ambas técnicas, basadas en el contorno (van der Mollen et al., 2012) y en “*landmarks*” y “*semi-landmarks*” (Aguirre et al., 2006a).

En este capítulo, se utilizarán técnicas de MG basadas en “*landmarks*” y “*semi-landmarks*”, con el objetivo de investigar la relación entre *Brachidontes rodriguezii* (Provincia Argentina, Reciente) y *B. lepida* (Provincia Paranaiana, Mioceno). La hipótesis que se evalúa es que *B. rodriguezii* y *B. lepida* son lo bastante similares como para ser consideradas subespecies de una misma especie en base a sus fenotipos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

Los especímenes de *Brachidontes rodriguezii* fueron colectados en cuatro localidades en la costa del Atlántico Sudoccidental: Punta Ballena (Uruguay), Santa Clara del Mar, Mar del Plata y Bahía San Blas (Argentina) (n = 63, Tabla 4.1). En los análisis se incluyeron especies relacionadas de la región, *Brachidontes darwinianus* (n = 43, Tabla 4.1) y *Perumytilus purpuratus* (n = 58, Tabla 4.1) e imágenes del material tipo de *B. rodriguezii* y *B. darwinianus* d’Orbigny del Museo Británico (Fig. 4.2).

Los materiales fósiles identificados como *Brachidontes lepida* de la Formación Paraná se detallan en la Tabla 4.2. El material de *B. lepida* de la Formación Paraná es bastante abundante, mientras que el material de la formación Puerto Madryn consiste solo en 2 valvas rotas y su identificación es dificultosa. La descripción original de la especie (Philippi, 1893) se basó en materiales que le fueron cedidos por Mr. Stienman, quien a su vez los había recibido del Dr. G. Burmeister (entonces director del Museo Argentino de Ciencias Naturales), pero posteriormente se perdieron en el Museo de Historia Natural de Chile (del Río, com. pers.). El material procedía de la colección Bravard, la misma de donde proviene el material utilizado en este estudio. Es presumible que la serie típica y los materiales aquí estudiados provengan de la misma localidad.

Además, se examinaron materiales de las siguientes formas fósiles, depositados en el Museo Argentino de Ciencias Naturales:

1. MACN 4271. “*Modiolus*” sp., Formación Salamanca, Thanetiano (Paleoceno tardío). Río Chico, Chubut. Leg. Dr. R. Wichmann, 1923; 2 valvas (1 entera + 1 rota).
2. MACN 313. *Brachidontes andinus* (Ortmann, 1900) Oligoceno tardío - Mioceno temprano. Terciario, Monte Triste, Chubut Mr. Valentín col. Colección Ihering, 2 moldes en sedimento blanco.

**Tabla 4.1.** Especies de mejillines utilizadas en este estudio y sus sitios de muestreo.

Especies	N	Localidad	Latitud / Longitud
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	11	Punta Ballena, UY	34° 53' S, 55° 02' O
	14	Santa Clara del Mar, AR	37° 50' S, 57° 30' O
	18	Mar del Plata, AR	37° 58' S, 57° 35' O
	20	Bahía San Blas, AR	40° 32' S, 62° 15' O
<i>Brachidontes darwinianus</i>	12	Bahía de Ihleus, Bahía, BR	14° 47' S, 39° 01' O
	11	Montevideo, UY	34° 51' S, 56° 09' O
	20	Punta Ballena, UY	34° 53' S, 55° 02' O
<i>Perumytilus purpuratus</i> “Clado Sur”	19	Camarones, Chubut, AR	44° 47' S, 65° 43' O
	20	Puerto Deseado, Santa Cruz, AR	47° 44' S, 65° 53' O
	19	Bahía Ensenada, Tierra Del Fuego, AR	54° 49' S, 68° 15' O

**Tabla 4.2.** Material fósil de la Formación Paraná (depositado en el Museo Argentino de Ciencias Naturales).

Código	Etiqueta	Especímenes
4988	<i>Brachidontes (Brachidontes) rodriguezii lepida</i> (Philippi), Mioceno Form. Paraná Entre Ríos, Paraná, Col Bravard	13 valvas (6 completas + 6 con una sola valva completa + 1 con dos valvas rotas) etiqueta #: 112, 4988
4992	<i>Brachidontes lepida</i> , Col Bravard	15 valvas (6 completas + 9 rotas), etiqueta #: 112, 121, 571, 577, 580, 583
4991	<i>Brachidontes lepida</i> , Col Bravard	9 valvas (5 completas + 4 rotas) etiqueta #: 112 + 579, 112 + 598, 112 + 587, 112 + 589, 112 + 598, 112
4990	<i>Brachidontes (Brachidontes) rodriguezii lepida</i> (Philippi), Col Bravard	6 valvas (5 rotas + 1 completa), etiqueta #: 112, 4990
4989	<i>Brachidontes (Brachidontes) rodriguezii lepida</i> (Philippi), Mioceno Form. Paraná, Entre Ríos, Paraná, Col Bravard	7 valvas rotas, etiqueta #: 112, 4989

### Análisis genético

Las relaciones filogenéticas entre los tres taxones vivientes fueron estimadas a partir de secuencias del gen nuclear 28S ADNr con el método de inferencia bayesiana utilizando BEAST v 1.8 (Drummond et al., 2012). Para seleccionar el modelo de evolución que mejor se ajustaba a los datos se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC) implementado en

jModelTest v.2.1.5 (Darriba et al., 2012). El análisis bayesiano se realizó por 20 millones de generaciones, muestreando árboles cada 1000 generaciones, con un porcentaje de árboles que fueron descartados del período inicial de 25%. Se seleccionó “*Yule process*” como modelo de árbol y como modelo de reloj, el relajado. La convergencia de la corrida fue controlada en Tracer v1.5 (Rambaut et al., 2013). Luego, se generó el árbol de máxima credibilidad con TreeAnnotator v 1.6.1 (Drummond et al., 2012) y se editó en Figtree v 1.4 (Morariu et al., 2008). Como grupo externo se utilizó el mitílido *Aulacomya ater*. Las secuencias de ADN utilizadas se detallan en la Tabla 4.3.

**Tabla 4.3.** Secuencias del gen nuclear 28S ADNr obtenidas en este estudio y utilizadas en este capítulo.

<b>Especie</b>	<b>Código GenBank ó Lab ID</b>
<i>Aulacomya atra</i>	534
<i>Perumytilus purpuratus</i> (Clado Sur)	KC844378
<i>Brachidontes darwinianus</i>	KC844370
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	KC844372, KC844362, KC844365

### **Análisis morfogeométrico**

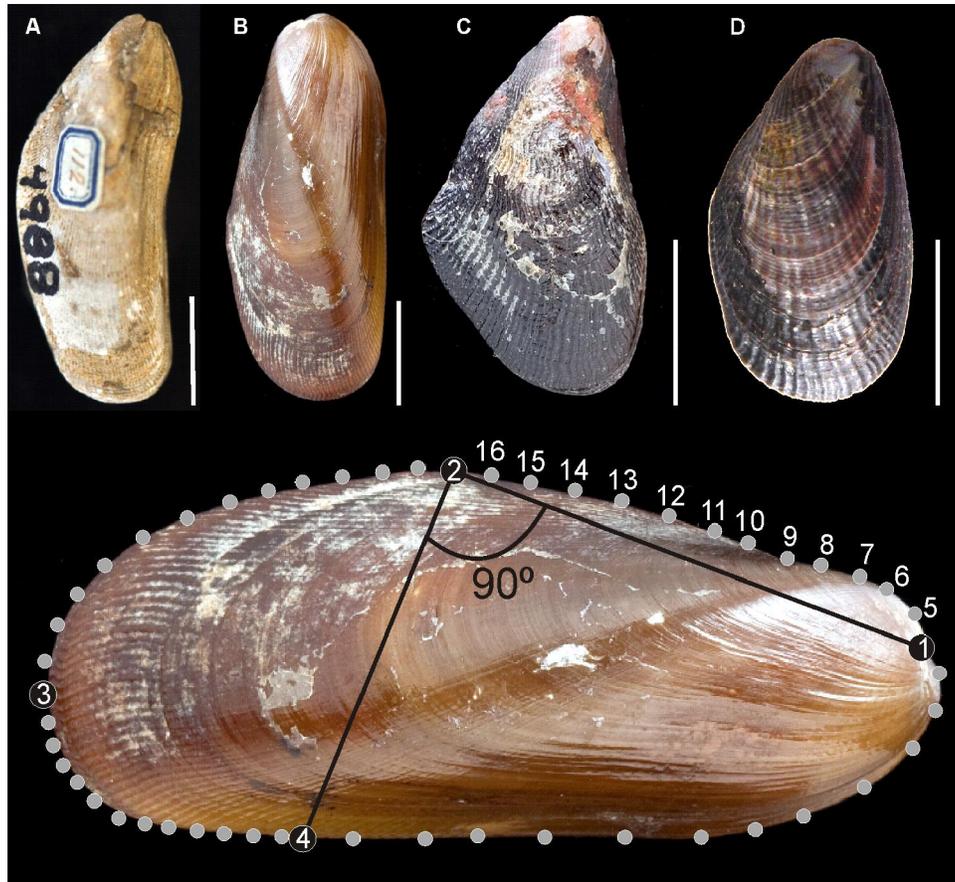
Se procedió a limpiar de tejidos blandos a todos los especímenes y a fotografiar el exterior de las valvas izquierdas con una cámara digital Nikon D110. La morfología de las valvas se señala en la figura 4.3. Luego, la forma de los individuos fue capturada a través de Coordenadas cartesianas en dos dimensiones de 4 “*landmarks*” anatómicos y 40 “*semi-landmarks*” (Fig. 4.2). Los “*semi-landmarks*” fueron digitalizados sobre el contorno de las valvas, donde la ubicación exacta de la curva no puede ser identificada y tampoco puede ser estimada estadísticamente. La configuración de “*landmarks*” y de “*semi-landmarks*” que se utilizó fue la siguiente: (1) umbo (extremo anterior), (2) cambio de la curvatura sobre el ligamiento, (3) curvatura máxima posterior, (4) intersección del contorno a 90° de la recta formada entre los “*landmarks*” 1 y 2, (5-14) “*semi-landmarks*” a lo largo del contorno entre los “*landmarks*” 1 y 2, (15-24) “*semi-landmarks*” entre los “*landmarks*” 2 y 3, (25-34) “*semi-landmarks*” entre los “*landmarks*” 3 y 4, y (35-44) “*semi-landmarks*” entre los “*landmarks*” 4 y 1. Todas las muestras fueron digitalizadas con el software TPS dig2 (Rohlf, 1996) por un observador. Para eliminar la rotación, traslación y efectos de escala, las configuraciones de “*landmarks*” se superpusieron mediante el análisis generalizado de Procrustes (Rohlf y Slice,

---

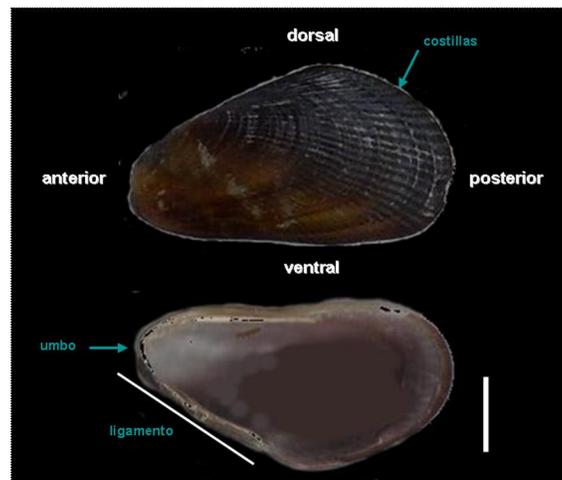
1990; Slice et al., 1996). Además, los “*semi-landmarks*” fueron deslizados utilizando el criterio para minimizar la energía de curvatura (“*bending energy*”), utilizado en el programa computacional TPSRelw (Rohlf, 2010). Este procedimiento traslada y rota las configuraciones de “*landmarks*” a un origen común y los escala a la unidad de un estimador del tamaño conocido como “*centroid size*”.

Para evaluar y controlar los efectos alométricos putativos, se llevó a cabo un análisis de regresión multivariada de la forma (las coordenadas de Procrustes alineadas fueron utilizadas como variables dependientes) sobre el tamaño (variable independiente). La variable utilizada como estimador insesgado del tamaño fue el “*centroid size*”, calculado para cada espécimen como la raíz cuadrada de la suma de las desviaciones al cuadrado de los puntos de referencia desde el “*centroid size*” (Bookstein, 1991; Zelditch et al., 2004). Klingenberg (2008) sugirió que este tipo de regresión es de utilidad para detectar y eliminar el efecto del tamaño, de la edad o de los factores ambientales, antes de realizar comparaciones de forma entre grupos. Para evaluar la independencia entre las variables de forma y tamaño, se realizó una prueba de permutación con 10000 iteraciones.

Con el objetivo de describir el espacio de variación de forma de las valvas de los mejillines y de reducir la dimensionalidad de los datos, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) de la matriz de varianza - covarianza de las coordenadas alineadas de Procrustes (Rohlf y Archie, 1984; Crampton, 1995). Se calculó también un análisis discriminante canónico (ADC) sobre aquellos CPs que explicaron el 98% de la variación total, con el fin de capturar los ejes de máxima separación entre grupos. Para probar diferencias entre las formas medias de cada especie se utilizó una extensión al caso multivariado de un método de comparación múltiple basada en análisis de conglomerados (UPGMA - MDGC: Valdano y di Rienzo, 2007; Márquez et al., 2010). Este método es una técnica híbrida que combina un agrupamiento jerárquico basado en distancias de Mahalanobis (Mahalanobis, 1948) con una prueba de hipótesis para casos multivariados. La salida gráfica de la prueba MDGC es una herramienta útil, ya que muestra una clara distinción entre las formas de las valvas de cada una de las especies que son estadísticamente diferentes, así como sus relaciones (Márquez et al., 2010).



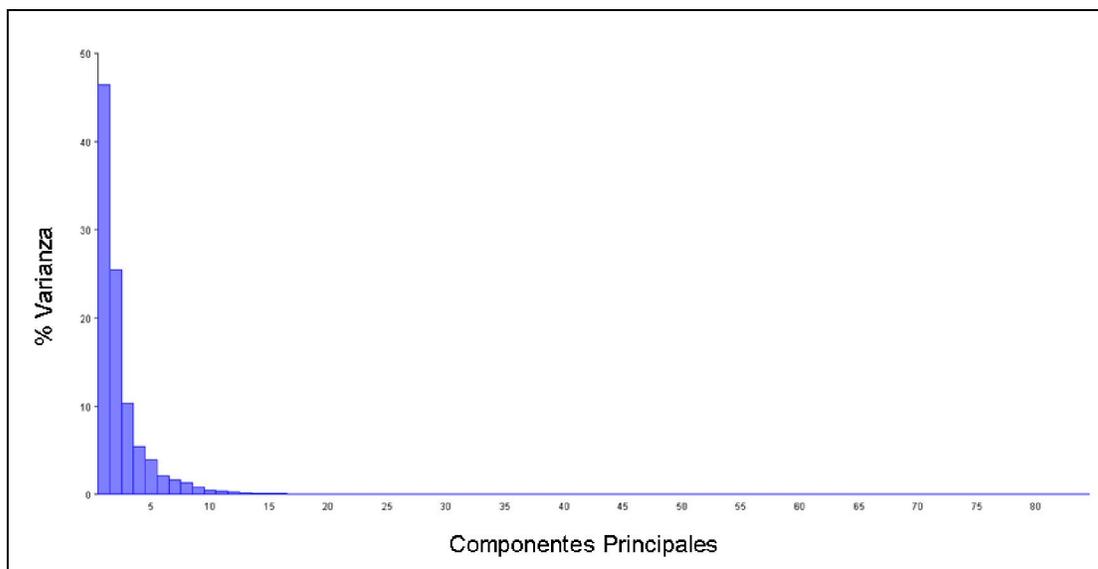
**Figura 4.2.** Material fósil y reciente de las especies de mejillines utilizadas en este estudio. Arriba, vista externa de la valva de (A) *Brachidontes lepida*; (B) sintipo de *B. rodriguezii*; (C) sintipo de *B. darwinianus* y (D) *Perumytilus purpuratus* (Clado Sur). Abajo, configuración de “landmarks” y “semi-landmarks” en el contorno de la valva. Barra: 1 cm.



**Figura 4.3.** Morfología de la valva de un mejillín. Barra: 0.5cm.

## RESULTADOS

La regresión entre la forma (coordenadas alineadas de Procrustes) y el estimador del tamaño “*centroid size*” no fue estadísticamente significativa (10000 permutaciones aleatorias,  $p=0,0631$ ), indicando que no hay evidencias de alometría en las muestras. En la figura 4.5 se resume la variación de la forma de la valva en los diferentes componentes principales (CPs), de los cuales, los primeros 4 explicaron el 87.6% de la variación total, los demás CPs no se tuvieron en cuenta ya que su contribución fue menor o igual al 5 % de la varianza total (Balzarini et al., 2008; Zeldich et al., 2004) (Tabla 4.4).

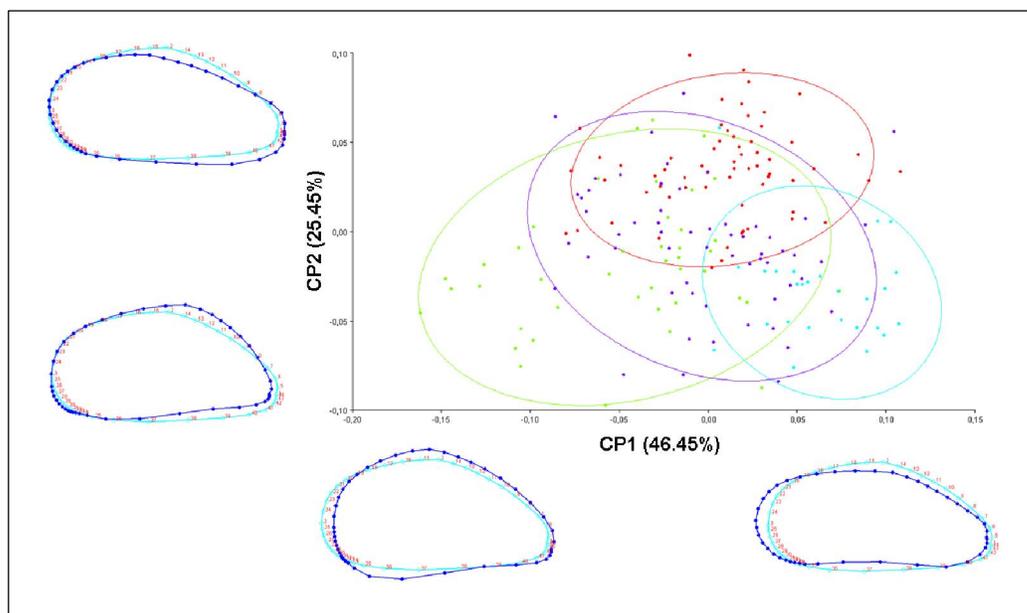


**Figura 4.4.** Porcentaje de varianza de la forma de la valva explicada por los componentes principales.

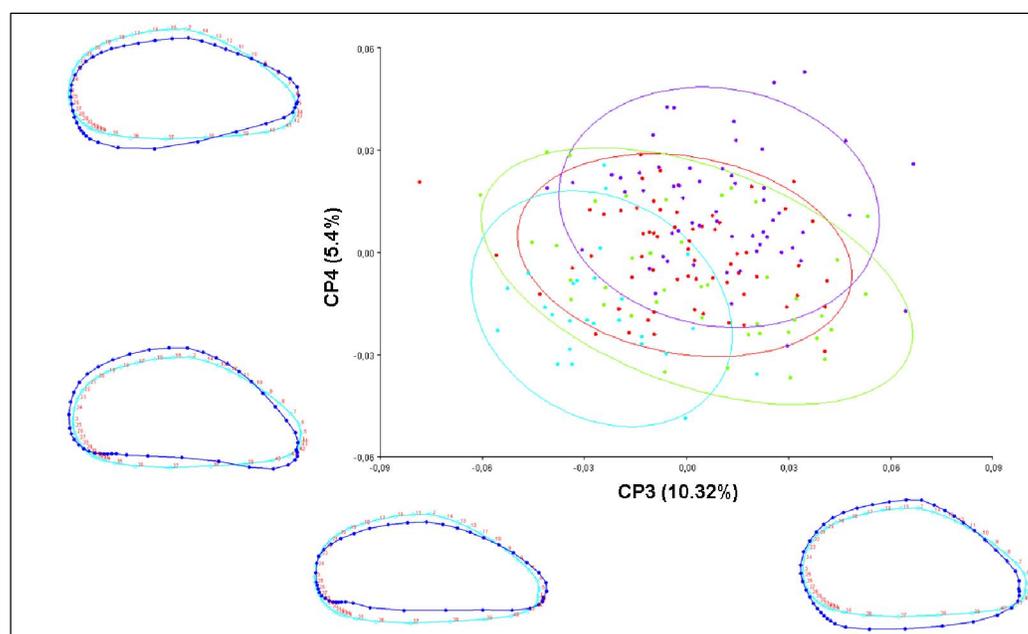
**Tabla 4.4.** Análisis de componentes principales. Se muestran sólo los cuatro primeros componentes que explican más del 5% de varianza total. Los autovalores son la proporción de la variabilidad total explicada por cada componente.

	<i>Autovalores</i>	Varianza (%)	Acumulativo (%)
1	0,00300494	46,457	46,457
2	0,00164644	25,454	71,911
3	0,00066804	10,328	82,239
4	0,00034994	5,410	87,649

En líneas generales, el espectro de variación de las especies de *Brachidontes* s.l. va desde valvas alargadas con umbos subterminales hasta valvas redondeadas con umbos terminales (Fig. 4.5). Asimismo, se puede observar que mientras la forma de *B. lepida* no presenta mucha variación, *B. darwinianus* exhibe una gran variación en la forma de la valva. Sin embargo, la baja variabilidad en *B. lepida* puede deberse también al bajo número de ejemplares analizados. La interpretación geométrica de los extremos positivos del CP1 (46,45%) estuvo asociado a valvas estilizadas y a una posición del umbo subterminal, donde se observa a *B. lepida*, mientras que los extremos negativos se asociaron a valvas globulares y a un umbo con posición terminal (Fig. 4.5). El CP2 explicó el 25,45% de la variación, manifestada principalmente por una menor curvatura del ligamento provocado por un desplazamiento anterior del umbo en los valores positivos, donde se observa a *B. rodriguezii*, mientras que en los valores negativos, las valvas presentaron una mayor curvatura del ligamento provocada por un retracción del umbo (Fig. 4.5). El CP3 explicó el 10,32% de la varianza total y estuvo asociado con la amplitud de la valva (en el sentido dorso-ventral); sobre los valores positivos las valvas fueron más anchas, mientras que sobre los valores negativos las valvas fueron más angostas (Fig. 4.6). Finalmente, el CP4 contribuyó a explicar el 5,41% de la varianza; los valores positivos estuvieron representados por la zona ventral curva hacia abajo y un umbo apuntando hacia arriba, mientras que los valores negativos, estuvieron representados por una zona ventral curvada hacia arriba y un umbo apuntando hacia abajo (Fig. 4.6). Sin embargo, el CP3 y CP4 explican muy poco de la varianza y no logran separar bien a las especies.



**Figura 4.5.** Análisis de componentes principales CP1 y CP2. Los colores corresponden a las distintas especies: celeste, *B. lepida*; rojo, *B. rodriguezii*; verde, *B. darwinianus*; violeta, *P. purpuratus*. Sobre los ejes se observa la deformación de la valva (línea azul) con respecto al promedio total de la forma (línea celeste).

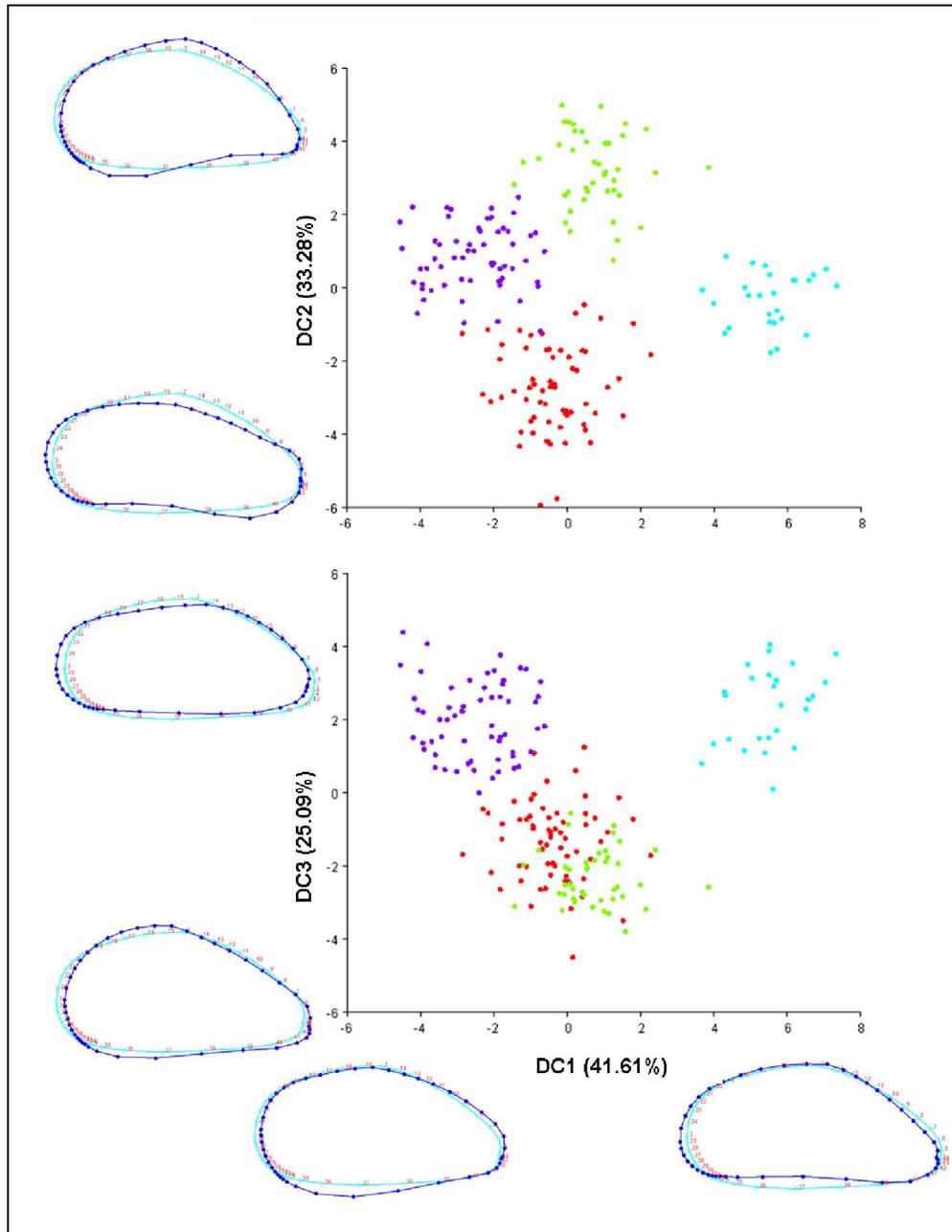


**Figura 4.6.** Análisis de componentes principales CP3 y CP4. Los colores corresponden a las distintas especies: celeste, *B. lepida*; rojo, *B. rodriguezii*; verde, *B. darwinianus*; violeta, *P. purpuratus*. Sobre los ejes se observa la deformación de la valva con respecto al promedio total de la forma en línea celeste.

Los primeros 10 CPs explicaron el 98% de la varianza total, y fueron utilizados para conducir un análisis discriminante canónico (ADC, Tabla 4.5). La interpretación geométrica del eje canónico 1 (DC1), se asoció con un cambio en la curvatura de la zona ventral de la valva y con el ángulo que forma el umbo con el ligamento. Sobre los valores positivos se observa a *B. lepida* (material fósil) exhibiendo una compresión en dirección antero-dorsal y ventral, generando una valva tipo sub-triangular con una zona ventral curvada ligeramente hacia adentro (Fig. 4.7), mientras que sobre los valores negativos se encuentra *P. purpuratus* con un valva tipo ovalada, con una zona ventral curvada ligeramente hacia afuera. Este eje, el que explica la mayor parte de la varianza (44,61%), separa el material fósil de las especies actuales. El eje canónico 2 (DC2, 33,28%) se asoció a la forma del umbo y a la amplitud de la valva. Sobre los valores positivos se observa a *B. darwinianus* exhibiendo un umbo terminal y una valva globular, mientras que sobre los valores negativos se ubicó *B. rodriguezii* exhibiendo un umbo sub-terminal y una valva alargada (Fig. 4.7). Por último, el eje canónico 3 (DC3, 25,09%) se asoció a la curvatura de la zona dorsal de la valva; en los valores positivos se agruparon *P. purpuratus* y *B. lepida* exhibiendo una zona antero-dorsal redondeada y una zona postero-dorsal recta, mientras que sobre los valores negativos se ubicaron *B. darwinianus* y *B. rodriguezii* con una zona antero-dorsal recta y una zona postero-dorsal redondeada (Fig. 4.7). Con respecto al material tipo incluido en los análisis, el sintipo de *B. rodriguezii* se ubicó dentro de la nube de puntos del material de la especie y lo mismo ocurrió con el ejemplar tipo de *B. darwinianus*.

**Tabla 4.5.** Análisis discriminante Canónico (variables canónicas= número de grupos -1).

	<i>Autovalores</i>	<i>Varianza (%)</i>	<i>Acumulativo (%)</i>
1	6,39408975	41,614	41,614
2	5,11475332	33,288	74,902
3	3,85639806	25,098	100,000



**Figura 4.7.** Análisis discriminante canónico. Los porcentajes de la varianza utilizados para detectar la máxima discriminación entre los grupos están entre paréntesis sobre cada eje. Los colores corresponden a las distintas especies: celeste, *B. lepida*; rojo, *B. rodriguezii*; verde, *B. darwinianus*; violeta, *P. purpuratus*. Sobre los ejes se observa la deformación de la valva (línea azul) con respecto al promedio total de la forma (línea celeste).

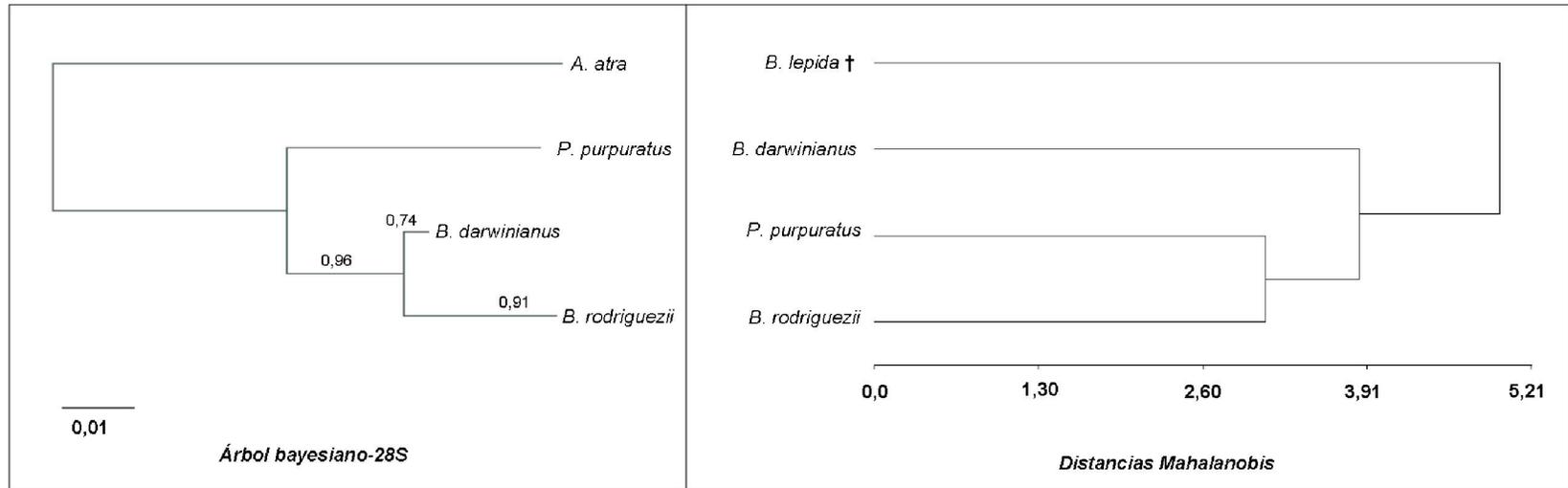
En promedio, la función discriminante asignó correctamente el 92,06% de los individuos (Tabla 4.6). El dendrograma calculado sobre la matriz de distancias de Mahalanobis mostró que cada especie tiene una forma característica de valva con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ; Tabla 4.7; Fig. 4.8). Asimismo, se observa que *B. rodriguezii* y *P. purpuratus* son más similares en la forma de la valva entre sí que con el resto de las especies. La especie más similar en la forma de la valva a este grupo es *B. darwinianus*. De todas las especies consideradas, *B. lepida* (material fósil) es el más divergente en cuanto a la forma de la valva. Sin embargo, cuando se tiene en cuenta el árbol basado en datos genéticos, en el cual no pudo agregarse el material fósil por la imposibilidad de tomar muestras de ADN, se observa un patrón diferente. *B. rodriguezii* y *B. darwinianus* están más relacionadas filogenéticamente entre sí que con *P. purpuratus* (ver capítulo 2 para más detalle).

**Tabla 4.6.** Tabla de clasificación cruzada.

Grupo	<i>B. rodriguezii</i>	<i>B. darwinianus</i>	<i>B. lepida</i>	<i>P. purpuratus</i>	Total	Error (%)
<i>B. rodriguezii</i>	51	0	0	2	53	3,77
<i>B. darwinianus</i>	2	44	2	2	50	12,00
<i>B. lepida</i>	0	1	25	0	26	3,85
<i>P. purpuratus</i>	2	5	0	50	57	12,28
Total	55	50	27	54	186	8,60

**Tabla 4.7.** Distancias de Mahalanobis (debajo de la diagonal) entre grupos y valores de p (sobre la diagonal).

	<i>B. rodriguezii</i>	<i>B. darwinianus</i>	<i>B. lepida</i>	<i>P. purpuratus</i>
<i>B. rodriguezii</i>	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
<i>B. darwinianus</i>	6,2618	-	<0,0001	<0,0001
<i>B. lepida</i>	7,5881	8,0564	-	<0,0001
<i>P. purpuratus</i>	5,4904	5,9005	8,4449	-



**Figura 4.8.** Árbol bayesiano basado en el marcador nuclear 28S y árbol basado en la distancia de Mahalanobis basados en datos morfogeométricos. El valor ubicado sobre la rama del árbol genético corresponde a la probabilidad bayesiana posterior que le da soporte al nodo. La línea vertical representa el criterio de corte  $p < 0,05$ .

## DISCUSIÓN

El análisis morfogeométrico diferenció las cuatro especies incluidas en este estudio, *B. lepida*, *B. rodriguezii*, *B. darwinianus* y *Perumytilus purpuratus*, asignando correctamente el 92,06% de los individuos. Aguirre et al. (2006a), utilizando un número menor de “landmarks” y “semi-landmarks” no encontraron diferencias entre *B. rodriguezii*, *B. darwinianus* y *B. purpuratus*. En base a ese resultado sugirieron que *B. rodriguezii* y *B. darwinianus* podrían ser considerados sinónimos de *B. purpuratus*. Coincidentemente con los resultados de mi estudio, van der Mollen et al. (2012), a partir de un análisis de contorno (análisis elíptico de Fourier) y Adami et al. (2013) en base a observaciones de caracteres cualitativos, encontraron diferencias significativas entre *B. rodriguezii* y *P. purpuratus*. El análisis discriminante canónico muestra que las especies Recientes (*B. rodriguezii*, *B. darwinianus* y *P. purpuratus*) son más similares entre sí que con *B. lepida*. Los resultados morfogeométricos no soportan la consideración de *B. lepida* como subespecie de *B. rodriguezii*.

Los árboles basados en información molecular y morfogeométrica difirieron en la forma que agruparon las especies. En el fenograma construido en base a distancias morfogeométricas se observa a *P. purpuratus* y *B. rodriguezii* agrupados, mientras que en el filograma construido a partir de datos moleculares *B. rodriguezii* se agrupa con *B. darwinianus*. Aun cuando los caracteres morfológicos diferencian las tres especies recientes, no capturan las relaciones filogenéticas entre ellas. No obstante, esto no es evidencia para rechazar la hipótesis de que alguna de las tres especies de *Brachidontes* que hoy habitan la región de interés esté relacionada de manera directa con *B. lepida*. Tal relación es, sin embargo, muy poco probable en el caso de *P. purpuratus*, con un patrón de distribución asociado a una conexión transpacífica (Capítulo 2).

Aún cuando *B. rodriguezii* y *B. lepida* no aparecen estrechamente relacionadas en el fenograma construido con caracteres cuantitativos, se asemejan entre sí en algunos caracteres cualitativos a los que los taxónomos consideran conservativos. Un carácter compartido por *B. lepida* y *B. rodriguezii*, en base al cual se las consideró relacionadas, es la expansión del borde anterior del la valva, ventral con respecto al umbo, que les da un aspecto “modioliforme”. El análisis MG logra capturar este rasgo en el segundo componente de la función discriminante. El aspecto modioliforme se presenta en muy pocos Brachidontinae vivientes, incluyendo a

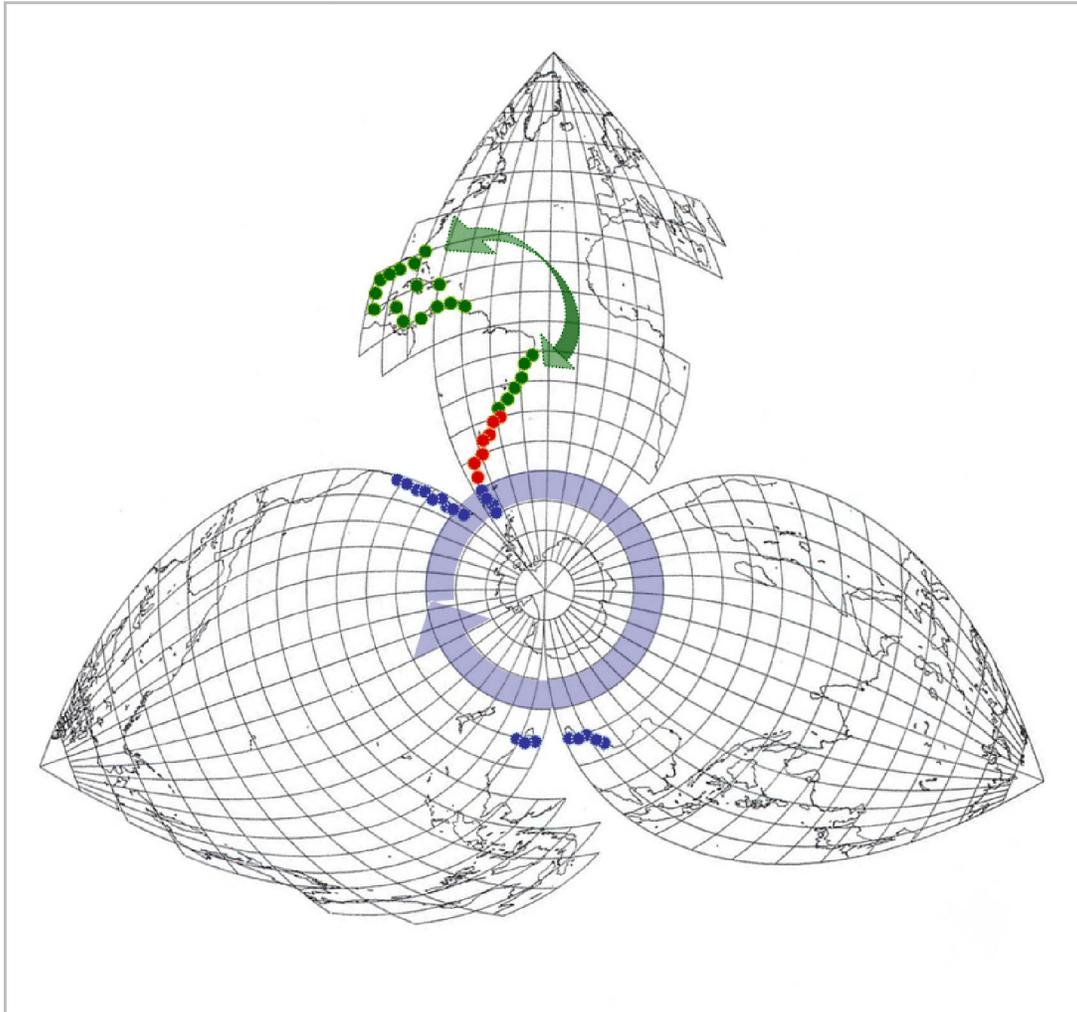
---

*Geukensia*, que previo a la disponibilidad de secuencias moleculares era considerado un miembro de los Modiolinae, y al menos dos especies vivientes de *Brachidontes*: *B. rodriguezii* y *B. modiolus*. Esta última, del Atlántico noroccidental, no tiene una relación filogenética cercana con *B. rodriguezii* (Capítulo 3). Es interesante señalar que, aunque fragmentarios, hay varios registros fósiles de Patagonia que aparentemente corresponden a Brachidoninae con rostro modioliforme, mas antiguos que *B. lepida*: *B. ortmanni* del Mioceno temprano, Formación Centinela y Formación Bajo el Gualicho (Chiesa et al., 1995); *Brachidontes andinus* del Oligoceno tardío-Mioceno temprano, Monte Triste, Chubut (Ortmann, 1900); y material identificado como *Modiolus* sp. del Paleoceno tardío, Formación Salamanca (Río Chico, Chubut). El estudio comparativo de esta serie de registros y sus posibles relaciones esta más allá de los objetivos de esta tesis, pero sin duda amerita atención.

*Brachidontes darwinianus*, distribuída en las costas de Uruguay y Brasil, es una especie primariamente estuarial (Avelar y Narchi, 1983; Nalesso et al., 1990). Parte de la biota de la provincia Paranaiana es típica de ambientes estuarinos (Martínez y del Río, 2005; Pérez et al., 2011), lo que podría indicar un escenario potencial para la especiación de *B. darwinianus*. *Brachidontes darwinianus*, sin embargo, no está relacionado con *B. lepida* en los caracteres cuantitativos analizados en este estudio, ni en los caracteres cualitativos que sugieren una relación entre *B. rodriguezii* y *B. lepida*.

El registro fósil de *Brachidontes rodriguezii* se extiende al Pleistoceno superior (Richards y Craig, 1963; Rutter et al., 1990), tal vez hasta el anteúltimo inter-glacial (190-240 kya) si su presencia en el cordón IV de Bahía Bustamante fuera confirmada (Anexo A3). La escasa representación del Plioceno para la costa del Atlántico sudoccidental (del Río et al., 2013) dificulta el estudio de las conexiones entre la fauna del Mioceno marino, bien representado, y la biota reciente en general, y en particular de la relación putativa entre *B. rodriguezii* y *B. lepida*.

## CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN



Los estudios filogeográficos de la biota del Atlántico sudoccidental son aun incipientes; la biogeografía del mar argentino ha tenido un énfasis en aspectos descriptivos. El objetivo general de este estudio fue contribuir a documentar los patrones filogeográficos en la región utilizando como caso de estudio los mejillines (Bivalvia: Mytilidae: Brachidontinae). Estos pequeños bivalvos son un modelo conveniente en razón de ser ubicuos, con densas poblaciones de varias especies nominales fácilmente accesibles a lo largo de ambas costas de Sud y Centroamérica. El primer objetivo específico fue clarificar el status de las especies de Sudamérica austral (Brasil, Uruguay, Chile y Argentina), ya que la plasticidad fenotípica de las valvas (en las que se basa la taxonomía tradicional) ha sido motivo de mucha confusión. El análisis filogeográfico requirió, además, resolver aspectos generales de la filogenia de los Brachidontinae. Los patrones de distribución observados sugirieron una serie de hipótesis para distintos miembros de este grupo: conexiones trans-pacíficas, antitropicalidad en el Atlántico occidental y ancestría regional. Esta riqueza de patrones e hipótesis contribuye al merito del sistema de estudio elegido.

Este estudio confirma la presencia en la región de interés de seis especies de Brachidontinae, cuyos rangos de distribución fueron ampliados y especificados a partir de colecciones de museo y nuevos materiales: *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1842) desde el golfo Nuevo (43° S, Argentina) hasta Santa Catarina (28° S, Brasil), *B. solisianus* (d'Orbigny, 1842) desde Ceará (3° S) hasta Río Grande (32° S) (Brasil), *B. darwinianus* (d'Orbigny, 1842) en ambientes estuarinos desde Bahía (13° S, Brasil) hasta Montevideo (34° S, Uruguay), *B. granulatus* a lo largo de las costas de Chile central y Perú y, finalmente *Perumytilus "purpuratus"* Lamarck (1819) que consiste de dos componentes genéticamente distinguibles, uno circunscripto a la Provincia Biogeográfica Magallánica (templado-fría) y el otro a la Provincia Chileno-Peruana (templado-cálida). *Brachidontes blakeanus*, de las islas Malvinas, fue reclasificada como *Philobrya blakeana* (Melvill y Standen, 1914) *comb. nov.* (Familia Philobryidae) como parte de este estudio.

Las poblaciones del componente templado-frío de *Perumytilus* mostraron evidencia de estar en expansión poblacional y tener poca diferenciación genética, a pesar de su amplia distribución. La expansión poblacional de *Perumytilus* en el litoral patagónico habría tenido lugar durante el Pleistoceno Superior, coincidentemente con lo observado en algunas especies de otros grupos. Por el contrario, las poblaciones de *B. darwinianus*, *B. rodriguezii* y *Perumytilus* de la

región templado-calida del Pacífico mostraron signos de estructuración genética y un tamaño poblacional estable. La estructuración observada en *B. darwinianus* podría estar relacionada con el hecho de que esta especie es típica de ambientes estuariales, a menudo discontinuos y separados entre sí por extensas líneas de costa marina que podrían actuar como barreras a la dispersión. En el caso de *B. rodriguezii*, la diferenciación encontrada estaría relacionada con que entre las poblaciones existen grandes extensiones de costa con hábitats no adecuados para los mejillines (playas arenosas y planos de marea fangosos). *Brachidontes solisianus*, por otra parte, mostró poca diferenciación genética; su expansión poblacional habría tenido lugar durante el Holoceno.

La reconstrucción filogenética indica que los Brachidontinae son monofiléticos e incluyen tres clados: [i] *Austromytilus* + *Mytilisepta* (generalmente considerado como un miembro de los Septiferinae) + *Perumytilus*, [ii] *Brachidontes* s.l. (incluyendo a *Hormomya*) + *Mytilaster*, y [iii] *Ischadium* + *Geukensia*.

Los miembros del primer clado se distribuyen a lo largo de las costas templadas del Océano Pacífico e incluyen a *Perumytilus* “*purpuratus*” (que como se indicó más arriba incluye dos componentes genéticamente diferenciados), *Austromytilus rostratus* (Dunker, 1857), *Mytilisepta virgata* (Wiegmann, 1837) y *Mytilisepta bifurcata auct.* La divergencia entre *Perumytilus* (Sudamérica) y *Austromytilus* (Australia) se asocia a un hipotético evento de dispersión en un escenario temprano de la Deriva de los Vientos Occidentales (“*West Wind Drift*”) durante el Oligoceno tardío o Mioceno temprano, posterior a los eventos de fragmentación de Gondwana. Se postula la hipótesis de que la diferenciación del componente templado-frío se originó de poblaciones del centro-norte de Chile, adaptándose a un régimen térmico más frío y expandiéndose gradualmente a lo largo de las costas de la Patagonia. Durante los avances glaciales del Pleistoceno (el último correspondiente al Último Máximo Glacial) las poblaciones del sur de Chile fueron presumiblemente extirpadas, y las poblaciones del centro de Chile y del Atlántico sudoccidental permanecieron separadas por largos periodos. Cuando las masas de hielo retrocedieron, el rango del componente magallánico presumiblemente se retroexpandió hacia el Pacífico rodeando el extremo sur del continente. Finalmente se habría establecido una zona de contacto secundario entre los dos componentes (templado-frío y templado-calido) dentro de un rango latitudinal relativamente estrecho, entre Valdivia (39° 48 'S)

y Concepción (36° 49' S). La expansión hacia el norte en la región templado-cálida del Atlántico sudoccidental puede haber sido limitada por el bloqueo de alta densidad resultante de la interacción con *Brachidontes rodriguezii*. Esto explicaría la paradoja de una “especie” distribuida a lo largo de las costas templado-frías y cálidas del Pacífico, pero solo presente en la región templado-fría del Atlántico de Sudamérica austral.

La literatura taxonómica implica una relación hipotética estrecha entre la especie estuarial *B. darwinianus* y el “complejo *exustus*”, este último distribuido en el golfo de México, el Caribe y el Pacífico tropical americano. A pesar de la similitud fenotípica entre ambas, los análisis basados en información molecular no mostraron una relación cercana, restando soporte a la hipótesis de un patrón de distribución antitropical. Por el contrario, *Brachidontes solisianus* (Brasil) y *B. “exustus I”* (golfo de México y Caribe) son especies hermanas distribuidas respectivamente hacia el sudeste y el noroeste de una discontinuidad correspondiente a la desembocadura del Río Amazonas, que podría estar actuando como una barrera. El origen de este patrón habría comenzado con la formación del Amazonas hace aproximadamente 10 Ma, que aisló de manera parcial a las poblaciones ubicadas a ambos lados de la gran pluma fluvial. El proceso de especiación habría finalizado hace 2,6 MA, coincidentemente con un aumento de la descarga fluvial de la cuenca amazónica.

Se ha hipotetizado que *Brachidontes rodriguezii*, relativamente aislado dentro del clado, habría evolucionado en la región a partir de formas fósiles descritas para el mar Enterrriense (Mioceno). Sin embargo, los análisis morfogeométricos no dan soporte a la designación de *B. lepida* (Mioceno) como subespecie de *B. rodriguezii*, como había sido sugerido en la literatura taxonómica. Ambas deben ser consideradas especies distintas. Las diferencias morfogeométricas sobre el contorno de la valva no reflejan las relaciones filogenéticas en este grupo, por lo que no es posible inferir sobre la relación de las especies actuales con la especie fósil. La escasez de depósitos marinos pliocenos en la región dificulta la investigación paleontológica de conexiones putativas.

La diversidad de patrones observada en los mejillines de las costas de Sudamérica estaría moldeada una parte por procesos ecológicos como la competencia interespecífica y la adaptación a distintos regímenes térmicos y de salinidad, y por otra por contingencias históricas como la fragmentación de Gondwana, el inicio de la WWD, la formación del Río Amazonas y la

transgresión marina Enterriense. Este collage de patrones indica que la uniformidad aparente de las comunidades intermareales dominadas por mejillines oculta una diversidad de interacciones entre factores ecológicos e históricos. Se enfatiza la importancia del uso de datos filogenéticos en la interpretación de las reglas que gobiernan el ensamble de las comunidades ecológicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adami, M.L., Pastorino, G., Orensanz, J.M., 2013. Phenotypic differentiation of ecologically-significant *Brachidontes* species co-occurring in intertidal mussel beds from the southwestern Atlantic. *Malacologia* 56, 59-67.
- Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D.E., 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71, 5-16.
- Addinsoft, T.M., 2013. XLSTAT 2013, Data analysis and statistics software for Microsoft Excel, Paris, France.
- Aguirre, M.L., 1994. Type specimens of Quaternary marine bivalves from Argentina. *Ameghiniana* 31, 347-374.
- Aguirre, M.L., 2003. Late Pleistocene and Holocene palaeoenvironments in Golfo San Jorge, Patagonia: molluscan evidence. *Marine Geology* 194, 3-30.
- Aguirre, M.L., Farinati, E.A., 1997. Paleobiogeografía de las faunas de moluscos marinos del Neógeno y Cuaternario del Atlántico Sudoccidental. *Revista de la Sociedad Geológica de España* 12, 93-112.
- Aguirre, M.L., Negro-Sirch, Y., Richiano, S., 2005. Late Quaternary molluscan assemblages from the coastal area of Bahía Bustamante (Patagonia, Argentina): Paleoecology and palaeoenvironments. *Journal of South American Earth Sciences* 20, 13-32.
- Aguirre, M.L., Perez, S.I., Negro-Sirch, Y., 2006a. Morphological variability of *Brachidontes* Swainson (Bivalvia, Mytilidae) in the marine Quaternary of Argentina (SW Atlantic). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 239, 100-125.
- Aguirre, M.L., Richiano, S., Negro-Sirch, Y., 2006b. Palaeoenvironments and palaeoclimates of the Quaternary molluscan faunas from the coastal area of Bahía Vera-Camarones (Chubut, Patagonia). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 229 251-286.
- Aguirre, M.L., Hlebszevitsch-Savalsky, J.C., Dellatorre, F., 2008. Late Cenozoic invertebrate paleontology of Patagonia and Tierra del Fuego, with emphasis on mollusks. *Developments in Quaternary Science* 11, 285-324.
- Aguirre, M.L., Richiano, S., Álvarez, M.F., Eastoe, C., 2009. Quaternary molluscan fauna from the littoral area of northern Santa Cruz (Patagonia, Argentina). *Geobios* 42, 411-434.

- Aljanabi, S.M., Martínez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25, 4692–4693.
- Avelar, W.E.P., Narchi, W., 1983. Behavioral aspects of *Brachidontes darwinianus darwinianus* (Orbigny, 1846) and *Brachidontes solisianus* (Orbigny, 1846) (Bivalvia, Mytilidae) in response to a salinity gradient. *Iheringia (Zool.)* 63, 125-132.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography. The history and formation of species.* Harvard University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Avise, J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36, 3-15.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Niegel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489-522.
- Balech, E., Ehrlich, M.D., 2008. Esquema Biogeográfico del Mar Argentino. *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero* 19, 45-75.
- Ballard, J.W.O., Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.
- Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J.A., Robledo, C.W., 2008. *Infostat. Manual del Usuario.* Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Bandelt, H.J., Forster, P.I., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Beaulieu, J.M., Ree, R.H., Cavender-Bares, J., Weiblen, G.D., Donoghue, M.J., 2012. Synthesizing phylogenetic knowledge for ecological research. *Ecology* 93, S4–S13.
- Berg, L.S., 1933. Die bipolare Verbreitung der Organismen und die Eiszeit. *Zoogeographica* 1, 444-484.
- Bernard, F.R., 1983. Catalogue of the living BIVALVIA of the eastern Pacific Ocean: Bering Strait to Cape Horn. *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatics Science*, p. 102.
- Bertness, M.D., Crain, C.M., Silliman, B.R., Bazterrica, M.C., Reyna, M.V., Hidalgo, F., Farina, J.K., 2006. The communities structure of western Atlantic Patagonian Rocky Shores. *Ecological Monographs* 76, 439-460.

- Bertorelle, G., Slatkin, M., 1995. The number of segregating sites in expanding human populations, with implications for estimates of demographic parameters. *Molecular Biology and Evolution* 12, 887-892.
- Beu, A.G., 2006. Marine Mollusca of oxygen isotope stages of the last 2 million years in New Zealand. Part 2. Biostratigraphically useful and new Pliocene to recent bivalves. *Journal of the Royal Society of New Zealand* 36, 151-338.
- Beu, A.G., 2009. Before the ice: Biogeography of Antarctic Paleogene molluscan faunas. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 284, 191–226.
- Bookstein, F.L., 1991. *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bookstein, F.L., Chernoff, B., Elder, R.L., Humphries, J.M.J., Smith, G.R., Strauss, R.E., 1985. *Morphometrics in evolutionary biology*. Academy of Natural Sciences Press, Philadelphia.
- Boore, J.L., Medina, M., Rosenberg, L.A., 2004. Complete sequences of the highly rearranged molluscan mitochondrial genomes of the Scaphopod *Graptacme eborea* and the bivalve *Mytilus edulis*. *Molecular Biology and Evolution* 21, 1492-1503.
- Boraso de Zaixso, A., 2013. *Elementos para el estudio de las macroalgas de Argentina*. Universidad Nacional de la Patagonia, Comodoro Rivadavia (Argentina).
- Briggs, J.C., Bowen, B.W., 2012. A realignment of marine biogeographic provinces with particular reference to fish distributions. *Journal of Biogeography* 39, 12-30.
- Briggs, J.C., Bowen, B.W., McClain, C., 2013. Marine shelf habitat: biogeography and evolution. *Journal of Biogeography* 40, 1023–1035.
- Briones, C., Guiñez, R., Garrido, O., Oyarzún, P.A., Toro, J.E., Pérez, M., 2012. Sperm polymorphism and genetic divergence in the mussel *Perumytilus purpuratus*. *Marine Biology* 159, 1865-1870.
- Brown, W.M., 1985. The mitochondrial genome of animals. En: MacIntyre, R.J. (Ed.), *Molecular evolutionary genetics*. Plenum, New York, pp. 95-130.
- Bucklin, A., Steinke, D., Blanco-Bercial, L., 2011. DNA Barcoding of Marine Metazoa. *Annual Review of Marine Science* 3, 471-508.

- Burridge, C.P., 2002. Antitropicality of pacific fishes: molecular insights Environmental Biology of Fishes 65, 151-164.
- Burridge, C.P., White, R.W.G., 2000. Molecular phylogeny of the antitropical subgenus *Goniistius* (Perciformes: Cheilodactylidae: Cheilodactylus): evidence for multiple transequatorial divergences and non-monophyly. Biological Journal of the Linnean Society 70, 435–458.
- Burridge, C.P., McDowall, R.M., Craw, D., Wilson, M.V.H., Waters, J.M., 2012. Marine dispersal as a pre-requisite for Gondwanan vicariance among elements of the galaxiid fish fauna. Journal of Biogeography 39, 306-321.
- Campbell, D.C., 2000. Molecular Evidence on the Evolution of the Bivalvia. En: Harper, E.M., Taylor, J.D., Crame, J.A. (Eds.), The Evolutionary Biology of the Bivalvia. Geological Society of London, Special Publications, pp. 31-46.
- Cavender-Bares, J., Ackerly, D.C., Kozak, K.H., 2012. Integrating ecology and phylogenetics: the footprint of history in modern-day communities. Ecology 93, S1–S3.
- Ceballos, S.G., Lessa, E.P., Victorio, M.F., Fernández, D.A., 2011. Phylogeography of the sub-Antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus*: evidence of population expansion. Marine Biology 159, 499-505.
- Chiesa, J.O., Parma, S.G., Camacho, H.H., 1995. Invertebrados marinos de la Formación El Chacay (Eoceno) provincia de Santa Cruz, Argentina. Sistemática y bioestratigrafía. Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Buenos Aires, Parte II: Monografía 11, 17-68.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9, 1657-1660.
- Coan, E.V., Scott, P.V., Bernard, F.R., 2000. Bivalve Seashells of Western North America: Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Arctic Alaska. The Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara.
- Coan, E.V., Valentich-Scott, P., 2012. Bivalve Seashells of Tropical West America. Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Northern Peru. Santa Barbara Musuem.
- Colgan, D.J., da Costa, P., 2013. Invasive and non-invasive lineages in *Xenostrobus* (Bivalvia: Mytilidae). Molluscan Research 33, 272-280.

- Compagnucci, R.H., 2011. Atmospheric circulation over Patagonia from the Jurassic to present: a review through proxy data and climatic modelling scenarios. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 229-249.
- Cooke, G.M., Chao, N.L., Beheregaray, L.B., 2012. Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). *Journal of Biogeography* 39, 724-738.
- Crampton, J.S., 1995. Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia* 28, 179-186.
- Crisci, J.V., Katinas, L., Posadas, P., 2000. Introducción a la teoría y práctica de la Biogeografía Histórica. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires.
- Croizat, L., Nelson, G., Rosen, D.E., 1974. Centers of origin and related concepts. *Systematic Zoology* 23, 265–287.
- Curtin, T.B., 1986a. Physical observations in the plume region of the Amazon River during peak discharge. 2. Water masses. *Continental Shelf Research* 6, 53–71.
- Curtin, T.B., 1986b. Physical observations in the plume region of the Amazon River during peak discharge. 3. Currents. *Continental Shelf Research* 6, 73–86.
- d'Orbigny, A., 1842. Mollusques. *Voyage dans l'Amérique Méridionale* P. Bertrand, Paris.
- d'Orbigny, A., 1846. Mollusques. *Voyage dans l'Amérique Méridionale*. P. Bertrand, Paris.
- Darling, K.F., Wade, C.M., Steward, I.A., Kroon, D.R.D., Brown, A.J.L., 2000. Molecular evidence for genetic mixing of Arctic and Antarctic subpolar populations of planktonic foraminifers. *Nature* 405, 43-47.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772.
- de Aranzamendi, M.C., Bastida, R., Gardenal, C.N., 2011. Different evolutionary histories in two sympatric limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) in the South-western Atlantic coast. *Marine Biology* 158, 2405-2418.
- del Río, C.J., 1991. Revisión sistemática de los Bivalvos de la Formación Paraná (Mioceno Medio), Provincia de Entre Ríos - Argentina. *Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Monografías* 7, 11-93.
- del Río, C., Martínez, S.A., 1998. Moluscos marinos miocenos de la Argentina y del Uruguay. *Monografías de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* p. 95.

- del Río, C.J., Griffin, M., McArthur, J.M., Martínez, S., Thirlwall, M.F., 2013. Evidence for early Pliocene and late Miocene transgressions in southern Patagonia (Argentina):  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ages of the pectinid "*Chlamys*" *actinodes* (Sowerby). *Journal of South American Earth Sciences* 47, 220-229.
- Di Giuseppe, G., Barbieri, M., Vallesi, A., Luporini, P., Dini, F., 2013. Phylogeographical pattern of *Euplotes nobilii*, a protist ciliate with a bipolar biogeographical distribution. *Molecular Ecology* 22, 4029-4037.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W., 2011. InfoStat. Grupo InfoStat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., Dveksler, G.S., 1993. General concepts for PCR primer design. *Genome Research* 3, 30-37.
- Distel, D., 2000. Phylogenetic Relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggest convergence in Mytilid body plans. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15, 25-33.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4, e88.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/mss075.
- Ekman, S., 1953. Zoogeography of the sea. Sidgwick & Jackson, London.
- Excoffier, L., Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564-567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G., Bult, C., 1995. Testing significance of congruence. *Cladistics* 10, 315-319.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

- Fernández, M., Jaramillo, E., Marquet, P.A., Moreno, C.A., Navarrete, S.A., Ojeda, F.P., Valdovinos, C.R., Vásquez, J.A., 2000. Diversity, dynamics and biogeography of Chilean benthic nearshore ecosystems: an overview and guidelines for conservation. *Revista Chilena de Historia Natural* 73, 797-830.
- Ferson, S., Rohlf, F.J., Koehn, R.K., 1985. Measuring Shape Variation of Two-dimensional Outlines. *Systematic Biology* 34, 59-68.
- Feruglio, E., 1950. Descripción Geológica de la Patagonia. Dirección General de Yacimientos Petrolíferos Fiscales, Buenos Aires (Argentina).
- Fleming, C.A., 1959. Notes on New Zealand Recent and Tertiary mussels (Mytilidae). *Transactions of the Royal Society of New Zealand* 87, 165-178.
- Folguera, A., Orts, D., Spagnuolo, M., Vera, E.R., Litvak, V., Sagripanti, L., Ramos, M.E., Ramos, V.A., 2011. A review of Late Cretaceous to Quaternary palaeogeography of the southern Andes. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 250-268.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294-299.
- Fraser, C.I., Nikula, R., Spencer, H.G., Waters, J.M., 2009. Kelp genes reveal effects of subantarctic sea ice during the Last Glacial Maximum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 3249-3253.
- Fraser, C.I., Thiel, M., Spencer, H.G., Waters, J.M., 2010. Contemporary habitat discontinuity and historic glacial ice drive genetic divergence in Chilean kelp. *BMC Evolutionary Biology* 10, 203.
- Fraser, C.I., Nikula, R., Ruzzante, D.E., Waters, J.M., 2012. Poleward bound: biological impacts of Southern Hemisphere glaciation. *Trends in Ecology & Evolution* 27, 462-471.
- Fraser, C.I., Zuccarello, G.C., Spencer, H.G., Salvatore, L.C., Garcia, G.R., Waters, J.M., 2013. Genetic Affinities between Trans-Oceanic Populations of Non-Buoyant Macroalgae in the High Latitudes of the Southern Hemisphere. *PLoS ONE* 8, e69138. doi: 10.1371/journal.pone.0069138.
- Fray, C., Ewing, M., 1963. Pleistocene sedimentation and fauna of the Argentine Shelf. I. Wisconsin Sea Level as Indicated in Argentine Continental Shelf Sediments. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 115, 113-152.

- Freeland, J.R., Petersen, S.D., Kirk, H., 2011. *Molecular Ecology*. Wiley-Blackwell.
- Fu, Y., 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Funk, D.J., Omland, K.E., 2003. Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34, 397-423.
- Futuyma, D.J., 2005. *Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Garrido-Ramos, M.A., Stewart, D.T., Sutherland, B.W., Zouros, E., 1998. The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome Research* 41, 818-824.
- Goetze, E., 2005. Global population genetic structure and biogeography of the oceanic copepods *Eucalanus hyalinus* and *E. spinifer*. *Evolution* 59, 2378-2398.
- González-Wevar, C.A., Nakano, T., Cañete, J.I., Poulin, E., 2010. Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 115-124.
- González-Wevar, C.A., Nakano, T., Cañete, J.I., Poulin, E., 2011. Concerted genetic, morphological and ecological diversification in *Nacella* limpets in the Magellanic Province. *Molecular Ecology* 20, 1936-1951.
- Gordillo, S., 1999. Holocene molluscan assemblages in the Magellan region. *Scientia Marina* 63, 15-22.
- Gordillo, S., Coronato, A.M.J., Rabassa, J.O., 2005. Quaternary molluscan faunas from the island of Tierra del Fuego after the Last Glacial Maximum. *Scientia Marina* 69, 337-348.
- Gordillo, S., Cusminsky, G., Bernasconi, E., Ponce, J.F., Rabassa, J.O., Pino, M., 2010. Pleistocene marine calcareous macro- and micro-fossils of Navarino Island (Chile) as environmental proxies during the last interglacial in southern South America. *Quaternary International* 221, 159-174.
- Goso, H., Bossi, J.C., 1966. Cenozoico. En: Bossi, J.C. (Ed.), *Geología del Uruguay*. Universidad de la República, Montevideo, pp. 259-305.

- Goto, T.V., Tamate, H.B., Hanzawa, N., 2011. Phylogenetic characterization of three morphs of mussels (*Bivalvia*, *Mytilidae*) inhabiting isolated marine environments in Palau Islands. *Zoological Science* 28, 568-579.
- Grant, W.S., Leslie, R.W., 2001. Inter-ocean dispersal is an important mechanism in the zoogeography of hakes (Pisces: *Merluccius* spp.). *Journal of Biogeography* 28, 699-721.
- Grant, W.S., Bowen, B.W., 2006. Living in a tilted world: climate change and geography limit speciation in Old World anchovies (*Engraulis*, *Engraulidae*). *Biological Journal of the Linnean Society* 88, 673–689.
- Gregory-Wodzicki, K.M., 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin* 112, 1091-1105.
- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W., Hebert, P.D.N., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 968-971.
- Haller, M.J., 1978. Estratigrafía de la región al poniente de Puerto Madryn, Provincia del Chubut, República Argentina., *Actas VII Congreso Geológico Argentino*, Buenos Aires, pp. 285-297.
- Halvorsen, K.A.T., Árnason, E., Smith, P.J., Mork, J., 2012. Mitochondrial DNA differentiation between the antitropical blue whiting species *Micromesistius poutassou* and *Micromesistius australis*. *Journal of Fish Biology* 81, 253–269.
- Harpending, H.C., 1994. Signature of Ancient Population Growth in a Low-resolution Mitochondrial DNA Mismatch Distribution. *Human Biology* 66, 591-600.
- Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R., Stoneking, M., 1993. The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology* 34, 483-496.
- Hasegawa, M., Kishino, H., Yano, T., 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22, 160-174.
- Heads, M., 2005. Towards a panbiogeography of the seas. *Biological Journal of the Linnean Society* 84, 675-723.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270, 313-322.

- Helmuth, B., 2009. From cells to coastlines: How can we use physiology to forecast the impacts of climate change? *Journal of Experimental Biology* 212, 753-760.
- Herm, D., 1969. Marines Pliozän und Pleistozän in Nord- und Mittel-Chile unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung der Mollusken-Faunen. *Zitteliana* 2, 1-159.
- Herrera, S., Shank, T.M., Sanchez, J.A., 2012. Spatial and temporal patterns of genetic variation in the widespread antitropical deep-sea coral *Paragorgia arborea*. *Molecular Ecology* 21, 6053-6067.
- Hewitt, G.M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 359, 183-195.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F., Yoder, A.D., 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54 291-301.
- Hilbish, T.J., Mullinax, A., Dolven, S.I., Meyer, A., Koehn, R.K., Rawson, P.D., 2000. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Marine Biology* 136, 69-77.
- Hillis, D.M., Dixon, M.T., 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66, 411-453.
- Holm, S., 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6, 65-70.
- Hoorn, C., 1993. Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the depositional history of Northwestern Amazonia - results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 105, 267-309.
- Hoorn, C., 1994. Fluvial palaeoenvironments in the Amazonas Basin (Early Miocene to early Middle Miocene, Colombia): *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 109, 1-54.
- Hoorn, C., 1996. Miocene deposits in the Amazonian foreland basin. *Science* 273, 122-123.
- Hosoi, M., Hosoi-Tanabe, S., Sawada, H., Ueno, M., Toyohara, H., Hayashi, I., 2004. Sequence and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the large subunit rRNA gene of bivalve: Simple and widely applicable technique for multiple species identification of bivalve larva. *Fisheries Science* 70, 629-637.

- Hubbs, C.L., 1952. Symposium on problems of bipolarity and of pan-temperate faunas. Antitropical distribution of fishes and other organisms. Proceedings of the Seventh Pacific Science Congress of the Pacific Science Association. Meteorology and oceanography. Wellington, New Zealand, pp. 324-330.
- Huber, M., 2010. Compendium of bivalves. A full-color guide to 3,300 of the world's marine bivalves. A status on Bivalvia after 250 years of research. ConchBooks, Hackenheim.
- Huson, D.H., Richter, D.C., Rausch, C., DeZulian, T., Franz, M., Rupp, R., 2007. Dendroscope—An interactive viewer for large phylogenetic trees, BMC. Bioinformatics 8, 460.
- Innes, D.J., Bates, J.A., 1999. Morphological variation of *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in eastern Newfoundland. Marine Biology 133, 691-699.
- Isacks, B.L., 1988. Uplift of the Central Andean Plateau and bending of the Bolivian Orocline. Journal of Geophysical Research: Solid Earth 93, 3211-3231.
- Jackson, J.B.C., O' Dea, A., 2013. Timing of the oceanographic and biological isolation of the Caribbean Sea from the tropical eastern Pacific Ocean. Bulletin of Marine Science 89, 779–800.
- Jordan, D.S., 1908. The law of the geminate species. The American Naturalist 42, 73–80.
- Joyeux, J.C., Floeter, S.R., Ferreira, C.E.L., Gasparini, J.L., 2001. Biogeography of tropical reef fishes: the South Atlantic puzzle. Journal of Biogeography 28, 831-841.
- Jozefowicz, C.J., Ó Foighil, D., 1998. Phylogenetic Analysis of Southern Hemisphere Flat Oysters Based on Partial Mitochondrial 16S rDNA Gene Sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 10, 426-435.
- Kelaher, B.P., Castilla, J.C., Prado, L., York, P., Schwindt, E., Bortolus, A., 2007. Spatial variation in molluscan assemblages from coralline turfs of Argentinean Patagonia. Journal of Molluscan Studies 73, 139-146.
- Kelly, R.P., Palumbi, S.R., 2010. Genetic Structure Among 50 Species of the Northeastern Pacific Rocky Intertidal Community. PLoS One 5, 8594.
- Kenchington, E.L.R., Landry, D., Bird, C.J., 1995. Comparison of taxa of the mussel *Mytilus* (Bivalvia) by analysis of the nuclear small-subunit rRNA gene sequence. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52, 2613-2620.

- Kiel, S., Nielsen, S.N., 2010. Quaternary origin of the inverse latitudinal diversity gradient among southern Chilean mollusks. *Geology* 38, 955-958.
- Kimura, M., 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature* 217, 624-626.
- Kimura, M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120.
- Klingenberg, C.P., 2008. MorphoJ. Faculty of Life Sciences, University of Manchester. Available at: [www.flywings.org.uk/MorphoJ\\_guide/frameset.htm?index.htm](http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_guide/frameset.htm?index.htm).
- Koressaar, T., Remm, M., 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289-1291.
- Koufopanou, V., Reid, D.G., Ridgway, S.A., Thomas, R.H., 1999. A molecular phylogeny of the patellid limpets (Gastropoda: Patellidae) and its implications for the origins of their antitropical distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11, 138-156.
- Krapivka, S., Toro, J.E., Alcapán, A.C., Astorga, M., Presa, P., Pérez, M., Guíñez, R., 2007. Shell-shape variation along the latitudinal range of the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis* (Hupe 1854). *Aquaculture Research* 38, 1770-1777.
- Kuklinski, P., Barnes, D.K.A., 2010. First bipolar benthic brooder. *Marine Ecology Progress Series* 401, 15-20.
- Kyriakou, E., Zouros, E., Rodakis, G.C., 2010. The atypical presence of the paternal mitochondrial DNA in somatic tissues of male and female individuals of the blue mussel species *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Research Notes* 3, 222.
- Lamarck, J.B.P., 1819. *Histoire naturelle des animaux sans vertébrés*, Verdieve, Paris.
- Lee, T., Ó Foighil, D., 2004. Hidden Floridian biodiversity: mitochondrial and nuclear gene trees reveal four cryptic species within the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. *Molecular Ecology* 13, 3527-3542.
- Lee, T., Ó Foighil, D., 2005. Placing the floridian marine genetic disjunction into regional evolutionary context using the scorched mussel, *Brachidontes exustus*, species complex. *Evolution* 59, 2139–2158.
- Lemey, P., Salemi, M., Vandamme, A.M., 2009. *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Lessios, H.A., 2008. The Great American Schism: Divergence of Marine Organisms After the Rise of the Central American Isthmus. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39, 63-91.
- Levin, L.A., 2006. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integrative and Comparative Biology* 46, 282-297.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A Software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lindberg, D.R., 1991. Marine biotic interchange between the northern and southern hemispheres. *Paleobiology* 17, 308-324.
- Littlewood, D.T.J., 1994. Molecular phylogenetics of cupped oysters based on partial 28S rRNA gene sequences. *Journal of Molecular and Phylogenetics and Evolution* 3, 221-229.
- Liuzzi, M.G., López Gappa, J., 2008. Macrofaunal assemblages associated with coralline turf: species turnover and changes in structure at different spatial scales. *Marine Ecology Progress Series* 363, 147-156.
- Luiz, O.J., Floeter, S.R., Rocha, L.A., Ferreira, C.E.L., 2013. Perspectives for the lionfish invasion in the South Atlantic: Are Brazilian reefs protected by the currents? *Marine Ecology Progress Series* 485, 1-7.
- Mabuchi, K., Nakabo, T., Nishida, M., 2004. Molecular phylogeny of the antitropical genus *Pseudolabrus* (Perciformes: Labridae): evidence for a Southern Hemisphere origin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32, 375-382.
- Macaya, E.C., Zuccarello, G.C., 2010. Genetic structure of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* along the southeastern Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 420, 103-112.
- Mahalanobis, P.C., 1948. Historic note on the  $D^2$  statistic. *Sankhya* 9, 237-240.
- Malumián, N., Nández, C., 2011. The Late Cretaceous-Cenozoic transgressions in Patagonia and the Fuegian Andes: foraminifera, palaeoecology, and palaeogeography. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 269-288.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.
- Marko, P.B., 2002. Fossil calibration of molecular clocks and the divergence times of geminate species pairs separated by the Isthmus of Panama. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2005-2021.

- Márquez, F., Robledo, J., Escati Peñaloza, G., van der Molen, S., 2010. Use of different geometric morphometrics tools for the discrimination of phenotypic stocks of the striped clam *Ameghinomya antiqua* (Veneridae) in San Jose Gulf, Patagonia, Argentina. *Fisheries Research* 101, 127-131.
- Martínez, S., del Río, C., 2002a. Las Ingresiones marinas del Neógeno en el sur de Entre Ríos (Argentina) y Litoral Oeste de Uruguay y su contenido malacológico. *Miscelánea* 14, 13 - 26.
- Martínez, S., del Río, C.J., 2002b. Late Miocene Molluscs from the Southwestern Atlantic Ocean (Argentina and Uruguay): A Palaeobiogeographic Analysis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 188, 167-187.
- Martínez, S., del Río, C., 2005. Las Ingresiones marinas del Neógeno en el sur de Entre Ríos (Argentina) y Litoral Oeste de Uruguay y su contenido malacológico. *Miscelánea* 14, 13 - 26.
- Martínez, S., del Río, C., 2006. The Family Volutidae (Mollusca-Gastropoda) in the Tertiary of Patagonia (Argentina). *Journal of Paleontology* 80, 919-945.
- Matsumoto, M., 2003. Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorphia (Bivalvia) from mtDNA COI sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27, 429-440.
- Mc Donald, J.H., Kreitman, M., 1991. Adaptive protein evolution at the *Adh* locus in *Drosophila*. *Nature* 351, 652-654.
- Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L., 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Genetics* 71, 491-499.
- Melvill, J.C., Standen, R., 1914. Notes on Mollusca collected in the North-west Falklands by Mr. Rupert Vallentin, F.L.S., with descriptions of six new species. *Annals and Magazine of Natural History* 8, 110-137.
- Montecinos, A., Broitman, B.R., Faugeron, S., Haye, P.A., Tellier, F., Guillemin, M.L., 2012. Species replacement along a linear coastal habitat: phylogeography and speciation in the red alga *Mazzaella laminarioides* along the south east pacific. *BMC Evolutionary Biology* 12, 97.
- Montes, C., Cardona, A., McFadden, R., Moron, S.E., Silva, C.A., Restrepo-Moreno, S., Ramirez, D.A., Hoyos, N., Wilson, J., Farris, D., Bayona, G.A., Jaramillo, C.A., Valencia, V., Bryan, J., Flores, J.A., 2012. Evidence for middle Eocene and younger land

- emergence in central Panama: Implications for Isthmus closure. *Geological Society of America Bulletin* 124, 780-799.
- Morariu, V.I., Srinivasan, B.V., Raykar, V.C., Duraiswami, R., Davis, L.S., 2008. Automatic online tuning for fast Gaussian summation. *Advances in Neural Information Processing Systems* 69, 1113-1120.
- Morrone, J.J., 2004. Panbiogeografía, componentes bióticos y zonas de transición. *Revista Brasileira de Entomologia* 48, 149-162.
- Mouquet, N., Devictor, V., Meynard, C.N., Munoz, F., Bersier, L.F., Chave, J., Couteron, P., Dalecky, A., Fontaine, C., Gravel, D., Hardy, O.J., Jabot, F., Lavergne, S., Leibold, M., Mouillot, D., Münkemüller, T., Pavoine, S., Prinzing, A., Rodrigues, A.S.L., Rohr, R.P., Thébault, E., Thuiller, W., 2012. Ecophylogenetics: advances and perspectives. *Biological Reviews* 87, 769–785.
- Nakamura, K., Tetsuo, D., Kokubugata, G., Forster, P.I., Wilson, G., Peng, C.-I., Yokota, M., 2011. Molecular phylogeography reveals an antitropical distribution and local diversification of *Solenogyne* (Asteraceae) in the Ryukyu Archipelago of Japan and Australia. *Biological Journal of the Linnean Society* 105, 197–217.
- Nalesso, R.C., Duarte, L.F.L., Mendes, E.G., 1990. Influência da salinidade e exposição ao ar na distribuição dos mexilhões *Brachidontes darwinianus* e *B. solisianus* em estuários do litoral do Estado de São Paulo. *Anais do II Simpósio de Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileiro* 3.
- Naughton, K.M., O'Hara, T.D., Appleton, B., Cisternas, P.A., 2014. Antitropical distributions and species delimitation in a group of ophiocomid brittle stars (Echinodermata: Ophiuroidea: Ophiocomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2014.05.020>.
- Navarrete, S.A., Castilla, J.C., 2003. Experimental determination of predation intensity in an intertidal predator guild: dominant versus subordinate prey. *Oikos* 100, 251-262.
- Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 5269-5273.
- Nelson, G., Platnick, N., 1981. *Systematics and biogeography*. Columbia University Press, Nueva York.

- Nelson, C.S., Cooke, P.J., 2001. History of oceanic front development in the New Zealand sector of the Southern Ocean during the Cenozoic- a synthesis. *New Zealand Journal of Geology & Geophysics* 44, 535-553.
- Nikula, R., Fraser, C.I., Spencer, H.G., Waters, J.M., 2010. Circumpolar dispersal by rafting in two subantarctic kelp-dwelling crustaceans. *Marine Ecology Progress Series*. 405, 221-230.
- Nixon, K.C., Wheeler, Q.D., 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 621, 1-223.
- Olivier, S.R., Escofet, A., Orensanz, J.M., Pezzani, S.E., Turro, A.M., Turro, M.E., 1966a. Contribución al conocimiento de las comunidades bénticas de Mar del Plata. I. El litoral rocoso entre Playa Grande y Playa Chica *Anales Comisión de Investigaciones Científicas*, Buenos Aires 7, 185-206.
- Olivier, S.R., Escofet, A., Orensanz, J.M., Pezzani, S.E., Turro, A.M., Turro, M.E., 1966b. Contribución al conocimiento de las comunidades bénticas de Mar del Plata. I. El litoral rocoso entre Playa Grande y Playa Chica. *Anales Comisión de Investigaciones Científicas*, Buenos Aires 7, 185-206.
- Olsson, A.A., 1961. Mollusks of the tropical eastern Pacific. Panamic- Pacific Pelecypoda. Ithaca, New York.
- Ort, B.S., Pogson, G.H., 2007. Molecular population genetics of the male and female mitochondrial DNA molecules of the California sea mussel, *Mytilus californianus*. *Genetics* 177, 1087-1099.
- Ortlieb, L., Díaz, A., Guzmán, N., 1996. A warm interglacial episode during oxygen isotope stage 11 in northern Chile. *Quaternary Science Reviews* 15, 857-871.
- Ortmann, A., 1900. Synopsis of the collections of invertebrate fossils made by the Princeton Expedition to southern Palagonia. *The American Journal of Science* 10, 368-381.
- Owada, M., 2007. Functional morphology and phylogeny of the rock-boring bivalves *Leiosolenus* and *Lithophaga* (Bivalvia: Mytilidae): a third functional clade. *Marine Biology* 150, 853-860.

- Owada, M., Hoeksema, B.W., 2011. Molecular phylogeny and shell microstructure of *Fungiacava eilatensis* Goreau et al. 1968, boring into mushroom corals (Scleractinia: Fungiidae), in relation to other mussels (Bivalvia: Mytilidae). *Contributions to Zoology* 80, 169-178.
- Palmer, M., Pons, G.X., Linde, M., 2004. Discriminating between geographical groups of a Mediterranean commercial clam (*Chamelea gallina* (L.): Veneridae) by shape analysis. *Fisheries Research* 67, 93-98.
- Park, J., Ó Foighil, D., 2000. Sphaeriid and Corbiculid Clams Represent Separate Heterodont Bivalve Radiations into Freshwater Environments. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14, 75-88.
- Parks, D.H., Porter, M., Churcher, S., Wang, S., Blouin, C., Whalley, J., Brooks, S., Beiko, R.G., 2009. GenGIS: A geospatial information system for genomic data. *Genome Research* 19, 1896-1904.
- Pérez, L.M., Griffin, M., Gente Iturrería, S.F., 2011. Pectínidos de la Formación Paraná (Mioceno) Entre Ríos, Argentina. *Serie correlación geológica* 27, 66-75.
- Pérez, M., Guíñez, R., Llanova, A., Toro, J.E., Astorga, M., Presa, P., 2008. Development of microsatellite markers for the ecosystem bioengineer mussel *Perumytilus purpuratus* and cross-priming testing in six Mytilinae genera. *Molecular Ecology Resources* 8, 449–451.
- Pérez-García, C., Cambeiro, J.M., Morán, P., Pasantes, J.J., 2010a. Chromosomal mapping of rDNAs, core histone genes and telomeric sequences in *Perumytilus purpuratus* (Bivalvia: Mytilidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 395, 199-205.
- Pérez-García, C., Guerra-Varela, J., Morán, P., Pasantes, J.J., 2010b. Chromosomal mapping of rRNA genes, core histone genes and telomeric sequences in *Brachidontes puniceus* and *Brachidontes rodriguezii* (Bivalvia, Mytilidae). *BMC Genetics* 11, 109.
- Peters, A.F., Breeman, A.M., 1992. Temperature responses of disjunct temperate brown algae indicate long-distance dispersal of microthalli across the Tropics. *Journal of Phycology* 28, 428-438.
- Philippi, R.A., 1893. Descripción de algunos fósiles Terciarios de la República Argentina. *Anales del Museo Nacional de Chile, Tercera sección Minería, Geología y Paleontología*, pp. 1–16.

- Plazzi, F., Ceregato, A., Taviani, M., Passamonti, M., 2011. A molecular phylogeny of bivalve mollusks: ancient radiations and divergences as revealed by mitochondrial genes. *PLoS ONE* 6, e27147. doi:27110.21371/journal.pone.0027147.
- Polzin, T., Daneschmand, S.V., 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31, 12-20.
- Ponce, J.F., Rabassa, J., Coronato, A., Borrromei, A.M., 2011. Palaeogeographical evolution of the Atlantic coast of Pampa and Patagonia from the last glacial maximum to the Middle Holocene. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 363–379.
- Provan, J., Bennett, K., 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia.
- Rabassa, J., Coronato, A., Bujalesky, G., Salemme, M., Roig, C., Meglioli, A., Heusser, C., Gordillo, S., Roig, F., Borrromei, A., Quattrocchio, M., 2000. Quaternary of Tierra del Fuego, southernmost South America: an updated review. *Quaternary International* 68-71, 217-240.
- Rabassa, J., Coronato, A.M., Salemme, M., 2005. Chronology of the late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences* 20, 81-103.
- Rabassa, J., Coronato, A., Martínez, O., 2011. Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 316-335.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D., Drummond, A.J., 2013. Tracer v1.5, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramírez, M.E., Osorio, C., 2000. Patrones de distribución de macroalgas y macroinvertebrados intermareales de la isla Robinson Crusoe, archipiélago de Juan Fernández, Chile. *Investigación Marina (Valparaíso)* 28, 1-13.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J., 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2092-2100.
- Randall, J.E., 1982. Examples of antitropical and antiequatorial distribution of Indo-West-Pacific fishes. *Pacific Science* 35, 197-209.

- Rawson, P.D., Hilbish, T.J., 1995. Evolutionary Relationships among the Male and Female Mitochondrial DNA Lineages in the *Mytilus edulis* Species Complex. *Molecular Biology and Evolution* 12, 893-901.
- Richards, H.G., Craig, J.R., 1963. Pleistocene sedimentation and fauna of the Argentine Shelf. II. Pleistocene mollusks from the continental shelf of Argentina. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 115, 113-152.
- Richtsmeier, J.T., DeLeon, V.B., Lele, S.R., 2002. The promise of geometric morphometrics. *American Journal of Physical Anthropology* 119, 63–91.
- Ríos, E.C., 1994. Seashells of Brazil. Museu Oceanográfico da FURG, Rio Grande do Sul.
- Ríos, E.C., 2009. Compendium of Brazilian Seashells. Evangraf, Rio Grande, Brasil.
- Ríos, C., Mutschke, E., Morrison, E., 2003. Biodiversidad bentónica sublitoral en el estrecho de Magallanes, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 38, 1-12.
- Rocha, L.A., 2003. Patterns of distribution and processes of speciation in Brazilian reef Wshes. *J Biogeogr* 30, 1161–1171.
- Rodríguez Rey, G.T., 2010. Estrutura populacional e filogeografia da lagosta *Scyllarides brasiliensis* Rathbun, 1906. Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil.
- Rogers, A.R., Harpending, H., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552–569.
- Rohlf, F.J., 1996. Morphometric spaces shape, components, and the effects of linear transformations. En: Marcus, L., Corti, M., Loy, A., Naylor, G.P., Slice, D. (Eds.), *Advances in Morphometrics*. Springer US, pp. 117-129.
- Rohlf, F.J., 2010. tpsRelw: Relative warps analysis. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York.
- Rohlf, F.J., Archie, A.W., 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Cuculidae). *Systematic Zoology* 33, 302–317.
- Rohlf, F.J., Slice, D., 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of “landmarks”. *Systematic Zoololgy* 39, 40–59.
- Rohlf, F.J., Marcus, L.F., 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecology & Evolution* 8, 129-132.

- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Rosenberg, N.A., Nordborg, M., 2002. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 3, 380-390.
- Rostami, K., Peltier, W.R., Mangini, A., 2000 Quaternary marine terraces, sea-level changes and uplift history of Patagonia, Argentina: comparisons with predictions of the ICE-4G (VM2) model of the global process of glacial isostatic adjustment. *Quaternary Science Reviews* 19, 1495-1525.
- Rufino, M.M., Gaspar, M.B., Pereira, A.M., Vasconcelos, P., 2007. The use of shape to distinguish *Chamelea gallina* and *Chamelea striatula* (Bivalvia: Veneridae): linear and geometric morphometric methods. *Journal of Morphology* 267, 1433–1440.
- Rutter, N., Radtke, U., Schnack, E.J., 1990. Comparison of ESR and amino-acid data in correlating and dating Quaternary littoral zones along the Patagonian coast. *Journal of Coastal Research* 6, 391-411.
- Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Gosse, J.C., Cussac, V.E., Habit, E., Zemplak, T.S., Adams, E.D.M., 2008. Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology* 17, 2234-2244.
- Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Macchi, P.J., Alonso, M., Barriga, J.P., 2011. Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: the roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 514–529.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanmartín, I., Ronquist, F., 2004. Southern Hemisphere Biogeography Inferred by Event-Based Models: Plant versus Animal Patterns. *Systematic Biology* 53, 216-243.
- Santaclara, F.J., Espineira, M., Cabado, A.G., Aldaroso, A., González-Lavian, N., Vieites, J.M., 2006. Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8461-8470.

- Santos, C.R.M., Dincao, F., 2004. Crustáceos no cerrito Ariano Souza, Rio Grande, Rio Grande do Sul e distribuição de *Callinectes sapidus* (Brachyura, Portunidae). *Iheringia, Série Zoologia*, Porto Alegre 94, 73-76.
- Scarabino, F., 2003. Lista sistemática de los Bivalvia marinos y estuarinos vivientes de Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 8, 229-259.
- Scarabino, F., Zaffaroni, J.C., Clavijo, C., Carranza, A., Nin, M., 2006. Bivalvos marinos y estuarinos de la costa uruguaya: faunística, distribución, taxonomía y conservación. En: Menafra, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F., Conde, D. (Eds.), *Bases para la Conservación y el Manejo de la Costa Uruguaya*. Vida Silvestre Publicaciones, Montevideo, pp. 157-170.
- Scarabino, V., 1977. Moluscos del Golfo San Matías (Prov. De Río Negro, Rep. Argentina). *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay (Montevideo)* 4, 177-286.
- Schellmann, G., Radtke, U., 1997. Techniques applied to mollusk shells from South America (Chile, Argentina) and implications for palaeo sea-level curve. *Quaternary Science Reviews* 16, 465-475.
- Scher, H.D., Martin, E.E., 2006. Timing and climatic consequences of the opening of Drake Passage. *Science* 312, 428-430.
- Schwaninger, H., 2008. Global mitochondrial DNA phylogeography and biogeographic history of the antitropically and longitudinally disjunct marine bryozoan *Membranipora membranacea* L. (Cheilostomata): Another cryptic marine sibling species complex? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49, 893-908.
- SEGEMAR, 2000. Mapa geológico de la República Argentina, escala 1:2.500.000. Instituto de Geología y Recursos Naturales, Buenos Aires, Argentina.
- Selkoe, K.A., Toonen, R.J. 2011. Marine connectivity: a new look at pelagic larval duration and genetic metrics of dispersal. *Marine Ecology Progress Series* 436, 291-305.
- Shilts, M.H., Pascual, M.S., Ó Foighil, D., 2007. Systematic, taxonomic and biogeographic relationships of Argentine flat oysters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 467-473.
- Silliman, B.R., Bertness, M.D., Altieri, A.H., Griffin, J.N., Bazterrica, M.C., Hidalgo, F.J., Crain, C.M., Reyna, M.V., 2011. Whole-community facilitation regulates biodiversity on Patagonian rocky shores. *PLoS ONE* 6, e24502.

- Silvestro, D., Michalak, I., 2012. RaxMLGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution* 12, 335-337.
- Skibinski, D.O.F., Gallagher, C., Beynon, C.M., 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368, 817-818.
- Skibinski, D.F., Gallagher, C., Beynon, C.M., 1994b. Sex-Limited Mitochondrial DNA Transmission in the Marine Mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138, 801-809.
- Slatkin, M., 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47, 264-279.
- Slice, D.E., Bookstein, F.L., Marcus, L.E., Rohlf, F.J., 1996. Appendix I: a glossary for geometric morphometrics. En: Marcus L.E., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D. (eds) *Advances in morphometrics*. New York: Plenum Press, pp. 531–551.
- Sousa, R., Freire, R., Rufino, M., Méndez, J., Gaspar, M., Antunes, C., Guilhermino, L., 2007. Genetic and shell morphological variability of the invasive bivalve *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) in two Portuguese estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 74, 166-174.
- Stamatakis, A., 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690.
- Stampar, S.N., Maronna, M.M., Vermeij, M.J., Silveira, F.L., Morandini, A.C., 2012. Evolutionary diversification of banded tube-dwelling anemones (Cnidaria; Ceriantharia; *Isarachnanthus*) in the Atlantic Ocean. *PLoS One* 7, e41091.
- Steiner, G., Hammer, S.E., 2000. Molecular phylogeny of the Bivalvia inferred from 18S rDNA sequences, with particular reference to the Pteriomorpha. En: Harper, E., Crame, A. (Eds.). *Geological Society of London, Special Publications*, London, pp. 11-29.
- Stepanjants, S.D., Cortese, G., Kruglikova, S.B., Bjørklund, K.R., 2006. A review of bipolarity concepts: History and examples from Radiolaria and Medusozoa (Cnidaria). *Marine Biology Research* 2, 200-241.
- Stepien, C.A., Rosenblatt, R.H., 1996. Genetic divergence in antitropical pelagic marine fishes (*Trachurus*, *Merluccius*, and *Scomber*) between North and South America. *Copeia* 3, 586-598.
- Stone, R., 2013. Battle of the Americas. *Science* 341, 230-233.

- Swofford, D.L., 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tajima, F., 1983. Evolutionary Relationship of DNA Sequences in Finite Populations. *Genetics* 105, 437-460.
- Tajima, F., 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123, 585-595.
- Tam, Y.K., Kornfield, I., Ojeda, F.P., 1996. Divergence and zoogeography of mole crabs, *Emerita* spp. (Decapoda: Hippidae), in the Americas. *Marine Biology* 125, 489-497.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Tanaka, M.O., Magalhães, C.A., 1999. Morphometric species recognition in *Brachidontes darwinianus* and *Brachidontes solisianus* (Bivalvia: Mytilidae). *Veliger* 42, 267-274.
- Tanaka, M.O., Magalhães, C.A., 2002. Edge effects and succession dynamics in *Brachidontes* mussel beds. *Marine Ecology Progress Series* 237, 151-158.
- Tavaré, S., 1985. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA Sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17, 57-86.
- Taylor, R.W., Turnbull, D.M., 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics* 6, 289-402.
- Tellier, F., Meynard, A.P., Correa, J.A., Faugeron, S., Valero, M., 2009. Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or parapatry? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53, 679-693.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619-633.

- Terranova, M.S., Lo Brutto, S., Arculeo, M., Mitton, J.B., 2007. A mitochondrial phylogeography of *Brachidontes variabilis* (Bivalvia: Mytilidae) reveals three cryptic species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45, 289-298.
- Tevesz, M.J.S., 1977. Taxonomy and ecology of the Philobryidae and Limopsidae (Mollusca: Pelecypoda). *Postilla* 171, 1-64.
- Thiel, M., Gutow, L., 2005. The ecology of rafting in the marine environment. II. The rafting organisms and community. *Oceanogr. Annual Review of Marine Science* 43, 279-418.
- Thiel, M., Ullrich, N., 2002. Hard rock versus soft bottom: the fauna associated with intertidal mussel beds on hard bottoms along the coast of Chile, and considerations on the functional role of mussel beds. *Helgol Marine Research* 56, 21-30.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25, 4876-4882.
- Tourinho, J.L., Solé-Cava, A.M., Lazoski, C., 2012. Cryptic species within the commercially most important lobster in the tropical Atlantic, the spiny lobster *Panulirus argus*. *Marine Biology* 159, 1897-1906.
- Trovant, B., Ruzzante, D.E., Basso, N.G., Orensanz, J.M., 2013. Distinctness, phylogenetic relations and biogeography of intertidal mussels (*Brachidontes*, Mytilidae) from the south-western Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 1843-1855.
- Valdano, S.G., Di Rienzo, J.A., 2007. Discovering meaningful groups in hierarchical cluster analysis. An extension to the multivariate case of a multiple comparison method based on cluster analysis. *Inter Stat*, pp. 28.
- van der Molen, S., Márquez, F., Idaszkin, Y.L., Adami, M., 2012. Use of Shell-shape to discriminate between *Brachidontes rodriguezii* and *Brachidontes purpuratus* species (Mytilidae) in the transition zone of their distributions (South-western Atlantic). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93, 803-808.
- Vargas Millacheo, J.A., 2009. Determinación del modo de herencia del adn mitocondrial en larvas de *Perumytilus purpuratus*, a partir de la formación de familias genéticas. *Escuela de acuicultura y pesquerías. Universidad Austral De Chile, Puerto Montt*, p. 48.

- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T., Gutiérrez-García, T.A., 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural* 82, 277-297.
- Verissimo, A., McDowell, J.R., Graves, J.E., 2010. Global population structure of the spiny dogfish *Squalus acanthias*, a temperate shark with an antitropical distribution. *Molecular Ecology* 19, 1651-1662.
- Vermeij, G.J., 1991. When Biotas Meet: Understanding Biotic Interchange. *Science* 253, 1099-1104.
- Vermeij, G.J., 1992. Trans-equatorial connections between biotas in the temperate eastern Atlantic. *Marine Biology* 112, 343-348.
- Vianna, P., Schama, R., Russo, C.A.M., 2003. Genetic divergence and isolation by distance in the West Atlantic sea anemone *Actinia bermudensis* (McMurrich, 1889). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 297, 19-30.
- Wares, J.P., Cunningham, C.W., 2001. Phylogeography and historical ecology of the north atlantic intertidal. *Evolution* 55, 2455–2469.
- Waters, J.M., 2007. Driven by the West Wind Drift? A synthesis of southern temperate marine biogeography, with new directions for dispersalism. *Journal of Biogeography* 35, 417-427.
- Waters, J.M., 2008. Marine biogeographical disjunction in temperate Australia: historical landbridge, contemporary currents, or both? *Diversity and Distributions* 14, 692-700.
- Waters, J.M., 2011. Competitive exclusion: phylogeography's 'elephant in the room'?. *Molecular Ecology* 20, 4388-4394.
- Waters, J.M., Fraser, C.I., Hewitt, G.M., 2013. Founder takes all: density-dependent processes structure biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution* 28, 78-85.
- Watterson, G.A., 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7, 256-276.
- Webb, D.S., 1995. Biological implications of the Middle Miocene Amazon Seaway. *Science* 269.

- Webb, C.O., Ackerly, D.D., McPeck, M.A., Donoghue, M.J., 2002. Phylogenies and community ecology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 33, 475-505.
- Wesselingh, F.P., Salo, J.A., 2006. Miocene perspective on the evolution of the Amazonian Biota. *Scripta Geologica* 133, 439-458.
- White, L.R., McPherson, B.A., Stauffer, J.R., 1996. Molecular genetic identification tools for the unionids of French Creek, Pennsylvania. *Malacologia* 38, 181–202.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols A guide to Methods and Applications*. Academic Press, pp. 315-322.
- Williams, S.T., Reid, D.G., Littlewood, D.T.J., 2003. A molecular phylogeny of the Littorininae (Gastropoda: Littorinidae): unequal evolutionary rates, morphological parallelism, and biogeography of the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28, 60-86.
- Wood, A.R., Apte, S., MacAvoy, E.S., Gardner, J.P.A., 2007. A molecular phylogeny of the marine mussel genus *Perna* (Bivalvia: Mytilidae) based on nuclear (ITS1&2) and mitochondrial (COI) DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 685-698.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annual Eugethcs* 15, 323–354.
- Xia, X., 2013. DAMBE5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 30, 1720-1728
- Xia, X., Lemey, P., 2009. Assessing substitution saturation with DAMBE. En: Philippe Lemey, Marco Salemi and Anne-Mieke Vandamme (Eds.), *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge University Press, pp. 615-630.
- Xue, D., Wang, H., Zhang, T., Gao, Y., Zhang, S., Xu, F., 2012. Morphological and genetic identification of the validity of the species *Atrina chinensis* (Bivalvia: Pinnidae). *Journal of Shellfish Research* 31, 739-747.
- Yrigoyen, M., 1969. Problemas estratigráficos del Terciario de Argentina. *Ameghiniana* 6, 315-328.

- Zelaya, D.G., 2005. The bivalves from the Scotia Arc islands: species richness and faunistic affinities. *Scientia Marina* 69, 113–122.
- Zelaya, D.G., 2009. Bivalvia. En: Häussermann, V., Försterra, G. (Eds.), *Marine Benthic Fauna of Chilean Patagonia*, Nature in Focus, Puerto Montt, pp. 426–454.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D., Fink, W.L., 2004. *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier, New York.
- Zeng, Y., Zheng, T., Yu, Y., Chen, B., He, J., 2010. Relationships between Arctic and Antarctic *Shewanella* strains evaluated by a polyphasic taxonomic approach. *Polar Biology* 33, 531-541.
- Zouros, E., Freeman, K.R., Ball, A.O., Pogson, G.H., 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359, 412-414.
- Zuccarello, G.C., West, J.A., Kikuchi, N., 2008. Phylogenetic relationships within the Stylonematales (Stylonematophyceae, Rhodophyta): biogeographic patterns do not apply to *Stylonema alsidii*. *Journal of Phycology* 44, 384-393.

## **TRABAJOS DE RESPALDO**