



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Doctorado en Ciencias Biológicas PEDECIBA
Subárea Zoología

Biodiversidad y conservación de

Cyanocyclus

(Bivalvia, Cyrenidae) en Uruguay

MSc. Cristhian Clavijo

Orientador: Dra. Graciela García
Co-orientador: Dra. Sonia Barbosa

Tribunal: Dr. Sergio Martínez
Dr. Miguel Simó
Dr. Alvaro Soutullo

Agradecimientos

Con el corazón quiero expresar mi gratitud a dos valientes mujeres, Graciela y Sonia, quienes me orientaron en esta etapa académica brindándome ejemplo, apoyo y aliento, consejos y el espacio para desarrollar esta tesis. Graciela me abrió su laboratorio hace ya 10 años y me permitió desarrollar mis posgrados teniéndome infinita paciencia. Sonia, desde que yo era estudiante de grado, me adoptó como uno más de sus múltiples hijos académicos y me ha transmitido algo de su energía corajosa. Néstor Ríos ofició como un tercer orientador en las sombras. Con amistad supo marcar errores y celebrar descubrimientos.

Agradezco a los miembros del tribunal (Sergio Martínez, Alvaro Soutullo y Miguel Simó) por haber priorizado la corrección de esta tesis a sus actividades, por sus aportes y consejos. Cristian Ituarte, Maria Cristina Mansur, Igor Miyahira, Rogerio Santos, Fabrizio Scarabino, Gabriel Laufer, Wilson Serra, Marcelo Loureiro y Claudia Callil compartieron conversaciones que me enriquecieron y enriquecieron esta tesis. Néstor Ríos, Wilson Serra, Marcelo Loureiro, Sabina Wlodek, Nadia Bou, Juan Carlos Clavijo, Gastón Martínez, Jorge Liotta, Damian Voglino, Rodrigo Silva, Claudia Callil, Rogerio Santos, Rebeca Carballo, Camila Toledo quienes colaboraron con las tareas de campo.

Este doctorado contó con la financiación de PEDECIBA a través de las alícuotas de estudiante y las becas concursables para cursos y pasantías en el exterior. La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS_NAC_2014_1_102612. Además parte de los insumos de laboratorio fueron financiados con el proyecto CSIC iniciación 2015 C656-348. El trabajo de campo fue parcialmente financiado por los proyectos: Collaborative research: US-Uruguay-Brazil IRES AMPLIFIED: Ampullariidae Model using Phylogeography, Laboratory Integration with Field Investigations into Ecology and Diversity (National Science Foundation), proyecto CSIC iniciación Biodiversidad, estrategia reproductiva y conservación de Cyanocyclas (Bivalvia, Corbiculidae) en Uruguay (2015 C656-348, CSIC), Estudio de Ecosistemas acuáticos y asociados de la cuenca del río Cuareim/Quarai, Uruguay-Brasil (OEA) y Monitoreo del Parque Nacional Esteros de Farrapos e Islas del Río Uruguay (MNHN-SNAP). La Sociedad Brasileira de Malacología, el Laboratorio ECOBIV (UFMG) y la REGENEC (Red de Genética de la Conservación) financiaron viajes a diferentes encuentros académicos que me permitieron presentar y discutir resultados de esta tesis.

Nadia fue fundamental en todas las etapas sobre todo en la redacción final de la tesis donde nuestra casa se llenó de la energía de Mateo. Ella sabiamente supo contener la entropía que generó Mateo en esta etapa para que yo pudiera condensar un texto que diera cuenta de mis investigaciones durante esta tesis. El amor y energía de Nadia y Mateo han sido siempre un viento fresco que me animó en los momentos en que estaba más perdido con la tesis. No dejo de agradecer a mi familia y a todas las familias que como la mía estimulan y apoyan a sus hijos, hermanos y nietos a seguir sus sueños, cada vez será necesario más biólogos para asegurar el tan necesario vinculo armonioso entre la humanidad y el resto de la naturaleza.

Índice

Resumen	1
Capítulo I Introducción general	
1.1 Conservación de bivalvos de agua dulce.....	2
1.2 El género <i>Cyanocyclus</i> en Uruguay taxonomía y conservación.....	3
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos e Hipótesis.....	5
1.4 Estructura de la tesis.....	7
Capítulo II Poblaciones de <i>Cyanocyclus</i> en Uruguay	
2.1 Introducción.....	8
2.2 Materiales y métodos.....	9
2.3 Resultados.....	11
2.4 Discusión.....	18
Capítulo III Sistemática molecular y filogeografía de <i>Cyanocyclus</i> basada en el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I COI y región ribosomal 28S nuclear	
3.1 Introducción.....	20
3.1.1. Sistemática molecular y filogeografía como herramientas de conservación.....	20
3.1.2 Antecedentes de sistemática molecular de <i>Cyanocyclus</i>	20
3.2 Materiales y métodos.....	22
3.2.1 Muestras utilizadas.....	22
3.2.2 Extracción del ADN.....	23
3.2.3 Amplificación del ADN.....	23
3.2.4 Alineamiento y edición de secuencias.....	24
3.2.5 Análisis filogenético.....	25
3.2.6 Análisis filogeográfico.....	25
3.3 Resultados.....	26

3.3.1 Análisis de secuencias y polimorfismo de ADN mitocondrial.....	26
3.3.2 Distancias genéticas en el gen mitodondrial COI.....	27
3.3.3 Análisis filogenéticos basados en el gen mitocondrial COI.....	27
3.3.4 Análisis filogeográfico.....	31
3.3.5 Análisis de secuencias y polimorfismo de ADN nuclear.....	35
3.4 Discusión.....	37

Capítulo IV Herencia mitocondrial en *Cyanocyclus limosa*

4.1 Introducción.....	40
4.2 Materiales y métodos.....	41
4.3 Resultados y discusión.....	42

Capitulo V Selección de sitios prioritarios para la conservación de bivalvos dulceacuícolas en Uruguay

5.1 Introducción.....	46
5.2 Materiales y métodos.....	48
5.3 Resultados.....	49
5.4 Discusión.....	55

Capítulo VI Conclusiones y perspectivas

6.1 Taxonomía del género <i>Cyanocyclus</i>	57
6.2 Herencia mitocondrial en el género <i>Cyanocyclus</i>	57
6.3 Conservación de <i>Cyanocyclus</i> en Uruguay.....	57
6.4 Perspectivas.....	59

Bibliografía.....	60
--------------------------	-----------

Anexo I.....	67
---------------------	-----------

Anexo II.....	70
----------------------	-----------

Anexo III.....	73
-----------------------	-----------

Resumen

A pesar de ser el grupo de organismos más amenazados a nivel mundial los bivalvos dulceacuícolas continúan recibiendo muy pocos esfuerzos de conservación. América del Sur, con 168 especies de bivalvos dulceacuícolas registradas, es el continente con menor conocimiento sobre el estado de conservación de estas especies. La existencia de múltiples áreas inexploradas, los problemas de definición taxonómica, así como la escasa información sobre distribución geográfica y tamaños poblacionales actuales, características reproductivas, de dispersión, genética e historia de vida, han dificultado la comprensión de entidades específicas, dificultando aún más la evaluación de su riesgo de extinción. En el caso específico del género *Cyanocyclus* (Cyrenidae: Bivalvia), en las últimas décadas se ha observado una disminución drástica en la distribución. Las características reproductivas, formas de dispersión y genéticas han dificultado la comprensión de las entidades específicas dentro de este género, dificultando aún más la comprensión de su grado de su riesgo de extinción. El objetivo de esta tesis fue identificar y describir ecológica y genéticamente las poblaciones de especies de *Cyanocyclus* en Uruguay con el fin de aportar herramientas para un plan de conservación de estas especies. Además de visitar las localidades conocidas con registros recientes de *Cyanocyclus* se realizaron muestreos sistematizados en más de cien sitios de todo el Uruguay con el fin de ubicar nuevas poblaciones de *Cyanocyclus*. Como resultado en la actualidad se conocen 18 localidades con presencia del género *Cyanocyclus*. En 16 localidades se ha encontrado *Cyanocyclus limosa*; en una *C. guahybensis*, otra localidad con *C. fortis* (junto a *C. limosa*) y en otra localidad se encontró *Cyanocyclus* sp especie potencialmente nueva. Los estudios filogenéticos y filogeográficos incluyeron 94 secuencias del gen mitocondrial COI y 25 secuencias de la región ribosomal 28S nuclear. Como resultado de los análisis filogenéticos se consideran válidas cinco especies *Cyanocyclus limosa*, *C. paranensis*, *C. undulata* y *C. guahybensis*. Los ejemplares provenientes del río Tacuarí corresponderían a una sexta especie aún no descrita. En base a los resultados obtenidos y la ampliación de los estudios genéticos la forma de herencia mitocondrial dentro del género es discutida. Finalmente con los datos obtenidos durante las campañas de muestreo se definió un indicador de comunidad de bivalvos dulceacuícolas que permitió priorizar siete sitios para la conservación de estas especies en Uruguay.

Capítulo I

Introducción general

1.1 Conservación de bivalvos de agua dulce

Los bivalvos de agua dulce son el grupo de organismos más amenazados a nivel mundial (Lydeard *et al.* 2004) con casi el 40% de las especies cerca de la amenaza, amenazados o extintos (Lopes-Lima *et al.* 2018). América del Sur, con 168 especies de bivalvos dulceacuícolas registradas (Pereira *et al.* 2014), es el continente con menor conocimiento del estado de conservación de estas especies (Lopes-Lima *et al.* 2018). Áreas inexploradas, problemas taxonómicos, escasa información sobre distribución geográfica y tamaños poblacionales actuales y conocimiento sobre la historia de vida imposibilitan evaluar el grado de amenaza de las especies (Miyahira *et al.* 2017, Torres *et al.* 2017). Como ejemplo de la situación continental Clavijo & Scarabino (2013) categorizan el 93% de las especies de bivalvos nativos de Uruguay como amenazadas, basados en cuatro criterios: asignación previa a una categoría de amenaza de UICN, área de distribución en el país menor a 20000 km², decrecimiento de más de 20% en el tamaño poblacional en los últimos 20 años y especies identificadas como amenazadas en estudios previos. Dado que los bivalvos son los organismos bentónicos con mayor biomasa de los sistemas de aguas continentales y juegan un importante rol en las redes tróficas, claridad del agua, oxigenación de sedimentos y como hábitat de otros animales (Bonetto & Tassara 1987, Haag 2012), su disminución o desaparición tiene implicaciones graves en los sistemas de aguas continentales (Howard & Cuffey 2006).

Para desarrollar programas efectivos de conservación, que reviertan el riesgo de extinción, es necesaria información sobre: 1) taxonomía; 2) distribución y preferencia de hábitat; 3) estructura y dinámica poblacional; 4) ciclo de vida y reproducción y 5) amenazas (Geist 2010). Además se deben planificar medidas de conservación *in situ* y educar a la población en general y los tomadores de decisión en particular. En este marco las investigaciones que incluyan diferentes tipos de informaciones, biogeográficas, morfológicas y genéticas son una herramienta fundamental para la conservación. Además de definir problemas taxonómicos, identificar unidades de conservación, estos estudios, pueden explicar

el alcance y la organización de la diversidad genética en las poblaciones y su dinámica espacio-temporal siendo entonces herramientas poderosas para sugerir estrategias de conservación sostenibles (Geist 2010). A pesar de esto los estudios de genética de la conservación en moluscos son escasos (Torres-Florez *et al.* 2018).

Dentro de las bivalvos de agua dulce de Uruguay varios autores han resaltado la desaparición de especies del género *Cyanocyclus* (Blainville, 1818) (Cyrenidae) (Veitenheimer-Mendes & Olazarri 1983, Mansur & Garces 1988, Scarabino 2004, Scarabino & Mansur 2008). Esta desaparición, estaría asociada a la invasión de especies del género *Corbicula* (Bivalvia: Cyrenidae) (Veitenheimer-Mendes & Olazarri 1983, Mansur & Garces 1988, Scarabino 2004, Scarabino & Mansur 2008). En base a los antecedentes bibliográficos e información de campo, Scarabino & Clavijo (2009) incluyeron las especies del género *Cyanocyclus* presentes en Uruguay en la lista de especies prioritarias para la conservación.

En un estudio reciente Clavijo & Carranza (2018)(Anexo III) indican que la distribución del género *Cyanocyclus* en Uruguay se ha reducido drásticamente encontrándose ejemplares vivos en el 7,1 % de las localidades históricas revisitadas (75% de ellas). A pesar de esta drástica situación ninguna especie de *Cyanocyclus* ha sido evaluada por UICN.

1.2 El género *Cyanocyclus* en Uruguay taxonomía y conservación

El género *Cyanocyclus* es endémico de América del Sur, abarcando su distribución la cuenca del Río de la Plata, las cuencas Atlánticas uruguaya y brasilera y parte de la cuenca sur del Amazonas (Parodiz 1969); existen además reportes de registros para la cuenca del Orinoco (Simone 2006). Dentro de este género se han descrito cerca de una decena de especies con localidad tipo en el bajo río Uruguay y Río de la Plata (Pilsbry 1896, Marshall 1924, Marshall 1927), la mayoría de las cuales pasaron a ser sinónimas de dos especies: *Cyanocyclus limosa* (Maton, 1811) y *Cyanocyclus paranensis* (d'Orbigny, 1835) (Parodiz & Hennings 1965). Estudios morfológicos, anatómicos, morfométricos y de filogenias moleculares (Citocromo oxidasa subunidad I) recientes (Clavijo 2014), permiten discriminar al menos cinco especies presentes en Uruguay: *Cyanocyclus limosa* (Maton, 1811), *Cyanocyclus paranensis* (d'Orbigny, 1835), *Cyanocyclus fortis* (Marshall, 1924), *Cyanocyclus exquisita* (Marshall, 1924) y *Cyanocyclus guahybensis* (Marshall, 1927). La validez de otros dos morfotipos: *C. felipponei* (Marshall, 1924) y *C. simplex* (Marshall, 1927) no se ha podido confirmar por no tener material para ser incluidos en filogenias moleculares y se consideran presumiblemente extintos (Clavijo 2014).

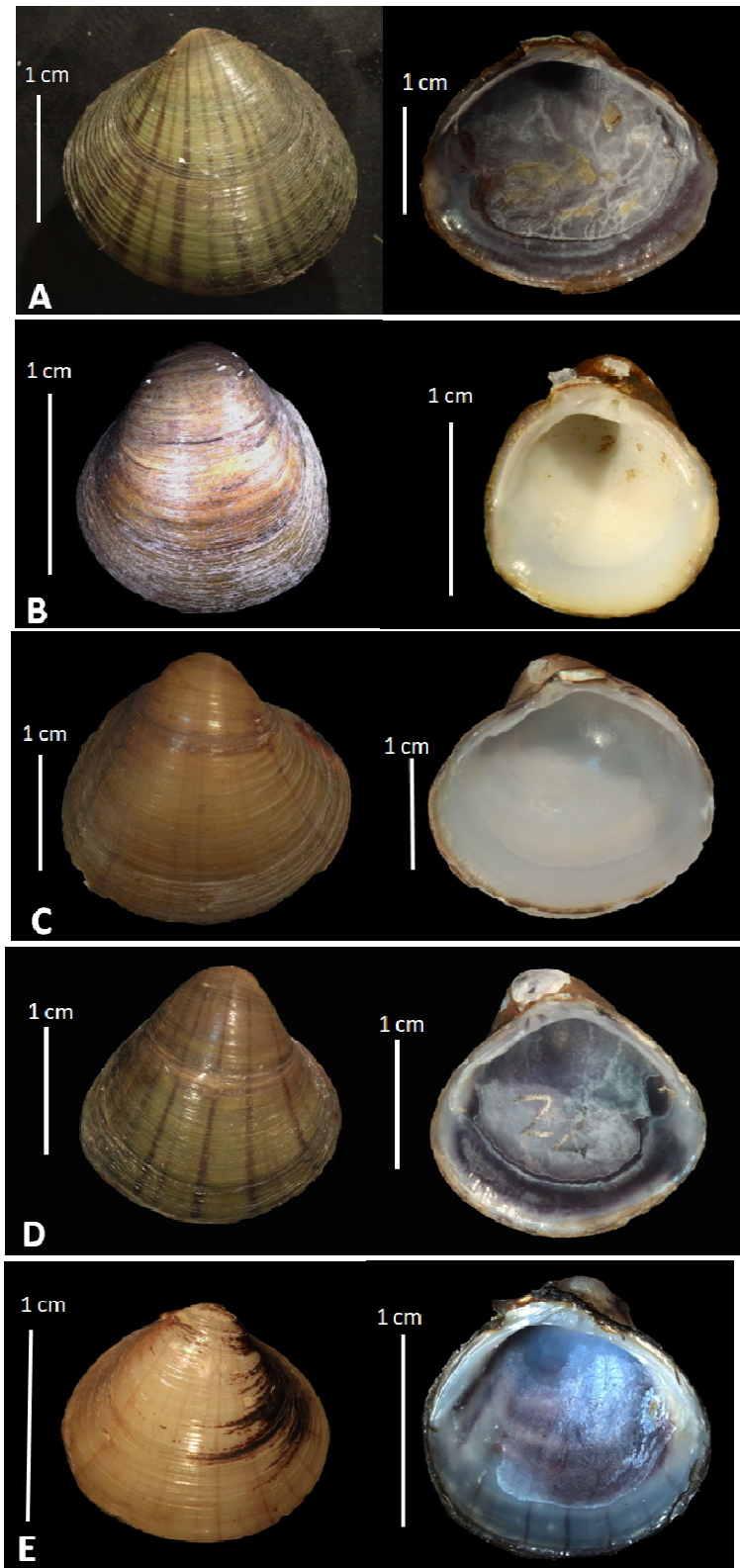


Figura 1.1. Especies del género *Cyanocyclus* (Blainville, 1818) presentes en Uruguay y consideradas válidas por Clavijo (2014). A) *Cyanocyclus limosa*, B) *Cyanocyclus paranensis*, C) *Cyanocyclus exquisita*, D) *Cyanocyclus fortis*, E) *Cyanocyclus guahybensis*.

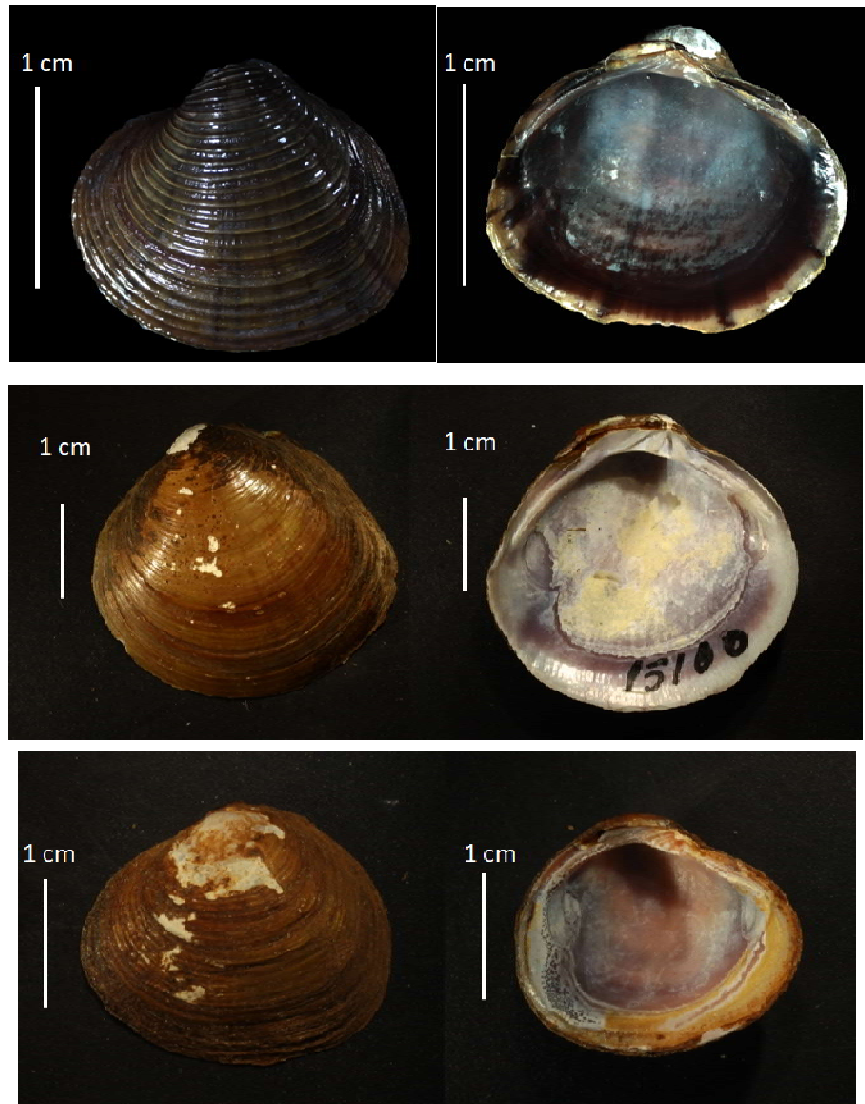


Figura 1.2. Especies del género *Cyanocyclas* (Blainville, 1818) consideradas sinónimas junior de *Cyanocyclas exquisita* por Clavijo (2014) (*Cyanocyclas undulata*, arriba) o sin determinar su validez (*Cyanocyclas felipponei* en el centro y *Cyanocyclas simplex*, abajo).

Las especies de *Cyanocyclas* son hermafroditas de tipo simultáneo e incuban embriones y larvas en ambas hemibranquias internas hasta ser liberados como individuos juveniles (Ituarte 1984). El hecho de ser hermafroditas simultáneos habilita la posibilidad de autofecundación, lo que fue registrado por Ituarte (1986) luego de la observación de un ovocito en segmentación en tránsito por la última porción del ducto principal de la fracción femenina.

Por otro lado, los análisis filogenéticos basados en COI revelaron en *Cyanocyclas limosa* la existencia de dos sub-clados monofiléticos y muy divergentes, lo que podría deberse

a la presencia de entidades (poblaciones, especies) crípticas o a la existencia de heteroplasmia (Clavijo 2014). La heteroplasmia es una particular forma de herencia mitocondrial en la que existen dos variantes de ADN mitocondrial y en moluscos bivalvos dioicos se da por la presencia y transmisión de un linaje paternal y otro matrilineal (Zouros *et al.* 1992). La interpretación errónea de los datos genéticos mitocondriales en grupos con heteroplasmia puede contribuir a la confusión en la interpretación de relaciones filogenéticas entre especies (Breton *et al.* 2007).

1.3 Objetivos

En el escenario que se plantea son urgentes nuevos esfuerzos dedicados a identificar, evaluar y conservar poblaciones de *Cyanocyclus*, en especial de *C. exquisita*, *C. fortis* y *C. paranensis*; confirmar la identidad genética de ejemplares de los morfotipos de *C. felipponei* y *C. simplex*, así como resolver la diversidad genética dentro de cada especie y la formas de herencia mitocondrial. Asimismo resulta fundamental contar con las herramientas que permitan orientar la creación de una red de sitios de conservación de bivalvos que incluyan las especies de *Cyanocyclus*.

1.3.1 Objetivo general

Identificar y describir, genética y ecológicamente, las poblaciones de *Cyanocyclus* en Uruguay con el fin de aportar herramientas para un plan de conservación de estas especies.

1.3.2 Objetivos específicos e hipótesis

Objetivo específico 1

Identificar y describir ecológicamente las poblaciones de especies de *Cyanocyclus* en Uruguay

Hipótesis 1

Existen otras poblaciones de *Cyanocyclus* en Uruguay además de las hoy ya conocidas

Objetivo específico 2

Determinar a través del análisis sistemático y genético-poblacional la existencia de monofilia recíproca y el posible aislamiento reproductivo entre los grupos en estudio

Hipótesis 2

Los morfotipos de *Cyanocyclus* en estudio son especies válidas constituyendo grupos de monofilia recíproca y aislados reproductivamente.

Objetivo específico 3

Comprender la herencia mitocondrial de *Cyanocyclus limosa*

Hipótesis 3

Cyanocyclus limosa presenta heteroplasma

Objetivo específico 4

Generar herramientas para la conservación para las especies de *Cyanocyclus* en Uruguay

1.4 Estructura de la tesis

En el **Capítulo II** se describen las poblaciones de *Cyanocyclus* registradas en Uruguay producto de un intensivo y sistemático muestreo en más de 100 localidades de todo el país. El análisis filogenético y filogeográfico de las especies y poblaciones de *Cyanocyclus* utilizando el gen COI (mitocondrial) y la región ribosomal 28S (nuclear) es abordado en el **Capítulo III**. En el **Capítulo IV** se estudia la herencia mitocondrial de *Cyanocyclus limosa*. Un indicador de sitios de prioridad para la conservación de bivalvos dulceacuícolas que permita la conservación de estos organismos, en especial las especies del género *Cyanocyclus* es presentado en el **Capítulo V**. Finalmente en las **Conclusiones (Capítulo VI)** se integran y destacan los resultados de la tesis con el fin de contribuir a la conservación de las especies de *Cyanocyclus* de Uruguay.

Capítulo II

Poblaciones de *Cyanocyclus* en Uruguay

2.1 Introducción

El estudio de bivalvos dulceacuícolas de América del Sur ha sido generalmente enfocado en taxonomía y distribución. Ocasionalmente, en este tipo de trabajos, figuran datos del tipo de ambiente en el que habitan y menos frecuentemente datos sobre tamaños poblacionales. El género *Cyanocyclus* no es una excepción, a pesar de existir más de 30 trabajos sobre el mismo, los datos sobre tamaños poblacionales son escasos. Para el río Paraná solo hay referencia a la abundancia de *C. limosa* y *C. paranensis* en términos de “escasa” en un estudio realizado en la laguna Setúbal (Santa Fe, Argentina) (Bonetto & Ezcurra 1962). Los antecedentes para Uruguay son contradictorios, mientras Baraibar (1961) dice que *C. limosa* es una especie relativamente abundante y característica de los fondos de gran parte de nuestra red fluvial, Figueiras (1965) dice que *Cyanocyclus* presenta colonias reducidas y poblaciones con escaso número de individuos. Ninguno de estos autores menciona datos cuantitativos. Para *C. guahybensis* en Rio Grande do Sul sí existen datos de abundancia en diferentes estudios en el sistema de lagunas costeras y el lago Guaíba. Entre estos datos se destacan densidades de 2496 ind/m² (Focht & Veitenheimer-Mendes 2001) y 5372 ind/m² (Lanzer & Schafer 1985). El único estudio con datos de abundancia en la cuenca del río Uruguay fue realizado por Bonetto & Di Persia (1975) quienes estudiaron la abundancia de bivalvos a lo largo del arroyo Ayuí, afluente del río Uruguay (Entre Ríos, Argentina) y registraron una densidad máxima de *C. limosa* de 7 ind/m².

En Uruguay la distribución histórica del género *Cyanocyclus* abarcaba todas las cuencas del Uruguay (Figueiras 1965, Olazarri 1968). Luego de la llegada de las especies invasoras del género *Corbicula* varios autores alertaron de la desaparición o desplazamiento de las especies nativas por las exóticas (Veitenheimer-Mendes & Olazarri 1983, Lanzer & Schafer 1985, Mansur & Garces 1988). Recientemente Clavijo & Carranza (2018) registraron una drástica disminución de aproximadamente el 90% en la distribución del género *Cyanocyclus* en Uruguay. En la actualidad sólo se conocen ocho sitios con registros de *Cyanocyclus* (Clavijo 2014). En este contexto se hace urgente localizar y monitorear las poblaciones de *Cyanocyclus* presentes en Uruguay.

2.2 Materiales y métodos

Se revisitaron las ocho localidades con registros de *Cyanocyclas* relevadas por Clavijo (2014) con excepción de Salamanca (río Cuareim) dada la dificultad de su acceso (Tabla 2.2). Además se realizó el muestreo en dos nuevas localidades: río Tacuarí, Ruta 18 y laguna Arnaud, ya que en estos sitios se encontraron poblaciones de *Cyanocyclas* (Serra com. pers.) que no fueron incluidas en Clavijo (2014) (Tabla 2.2).

La búsqueda de nuevas poblaciones de especies de *Cyanocyclas* en Uruguay se realizó entre 2015 y 2018 mediante un muestreo sistemático en 107 localidades. Para uniformizar la distribución de las localidades y evitar sesgos geográficos se utilizó la grilla de cartas del Servicio Geográfico Militar del Uruguay ubicando las localidades cada tres cartas, comenzando desde la A17 (Laguna Merín). Excepcionalmente y debido a la dificultad de acceso o eventualidades al momento del muestreo, algunas cartas no fueron muestreadas, siendo en lo posible sustituidas por otras próximas (Figura 2.1, Anexo I).

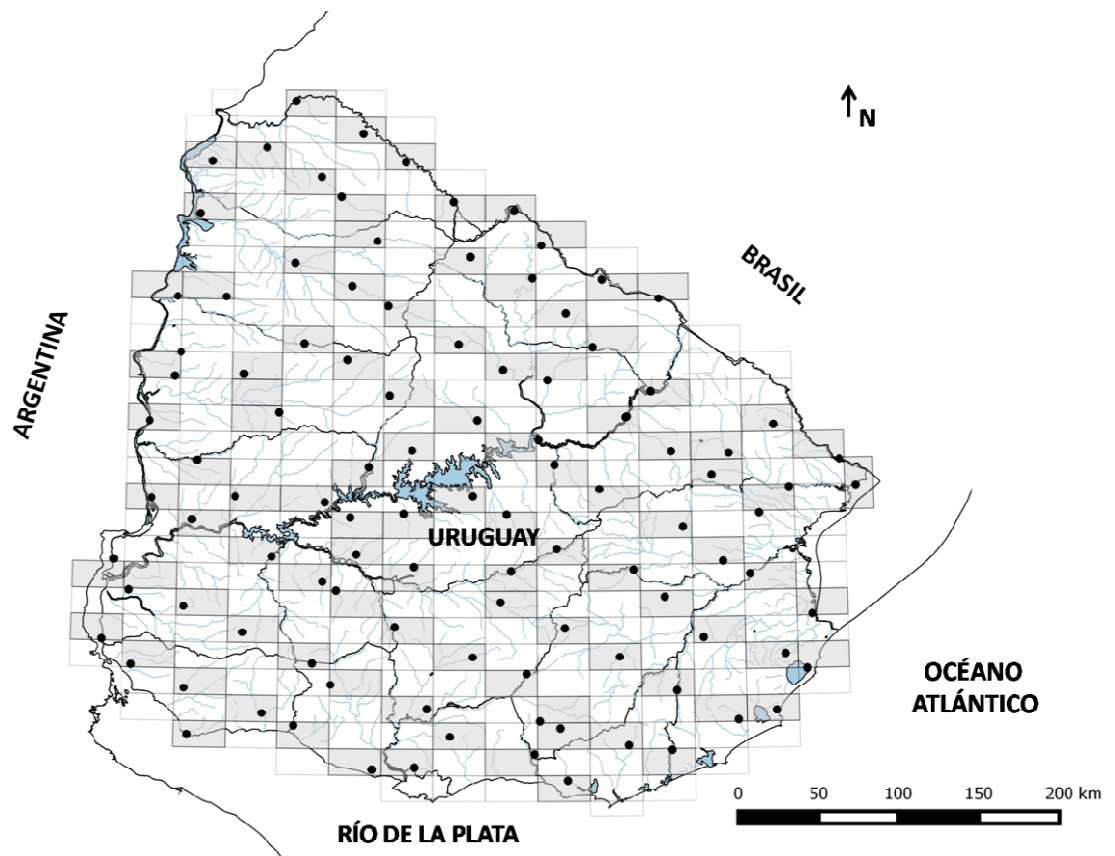


Figura 2.1. Localidades relevadas en muestreo sistemático. Ver detalles en Anexo I.

Adicionalmente a los esfuerzos de muestreos sistemáticos, y en especial en búsqueda de ejemplares de especies con escasos registros: *C. exquisita*, *C. felipponei*, *C. fortis*, *C. paranensis* y *C. simplex*; se realizaron campañas de colectas enfocadas en el bajo río Uruguay, bajo Río Negro y Río de la Plata interior, muestreando en 14 localidades, algunas de las cuales fueron visitadas en más de una ocasión (Figura 2.2).

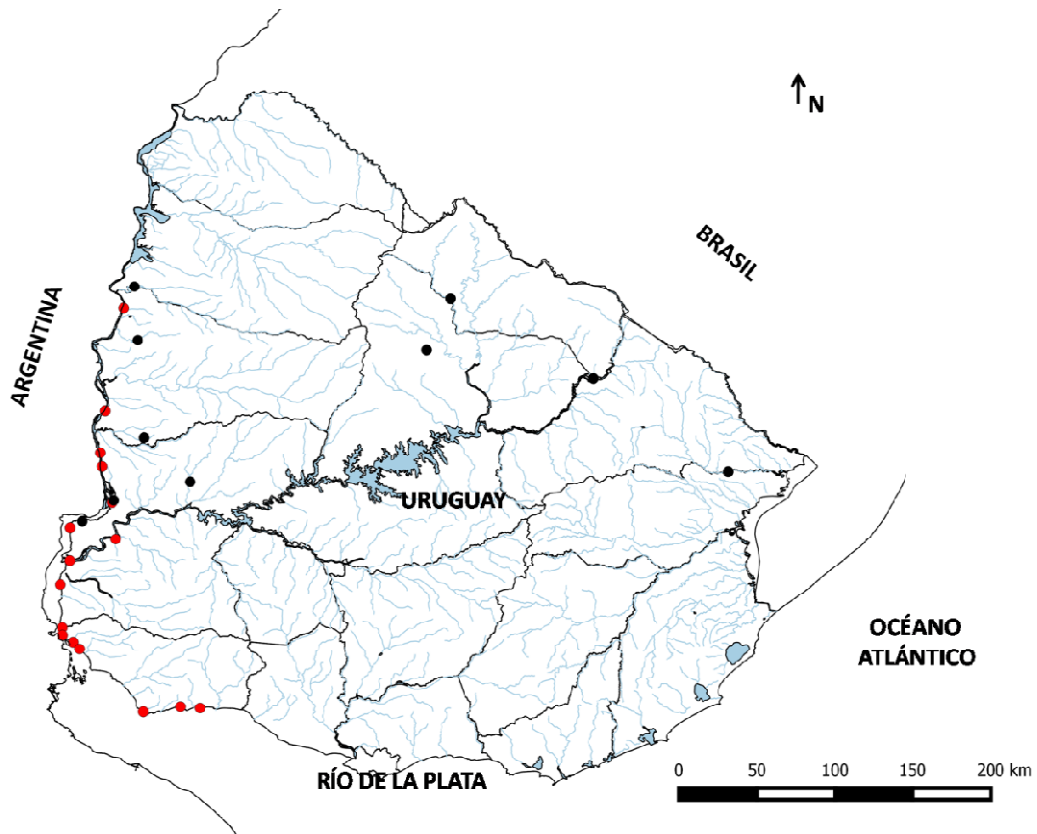


Figura 2.2. Localidades revisitadas (puntos negros) y otras localidades relevadas en el bajo río Uruguay, Río Negro y Río de la Plata interior (puntos rojos). Ver detalles en Anexo I.

En cada muestreo se realizó un esfuerzo de una hora con el método de “pies y manos”, método ampliamente usado con bivalvos de agua dulce por ser efectivos para detectar especies de baja abundancia (Smith 2006). Este método consiste en recorrer la superficie del fondo enterrando los dedos de la mano o planta del pie en el sustrato detectando así los ejemplares de bivalvos.

Todos los individuos recolectados vivos fueron identificados en base a Clavijo (2014), pesados, medidos y finalmente devueltos al agua. Por cada población un máximo de cinco ejemplares fueron conservados en alcohol 95° para estudios moleculares. En caso de que durante el tiempo de muestreo no se encontraran ejemplares vivos se realizaba una búsqueda

de valvas por la orilla (30 minutos/hombre). Sí se registraban valvas de *Cyanocyclus* se repetía el esfuerzo de muestreo de una hora, en caso contrario se consideraba *Cyanocyclus* ausente, (Figura 2.3). Para cada localidad con más de 30 individuos de alguna de las especies fue calculado el promedio y la moda de talla.

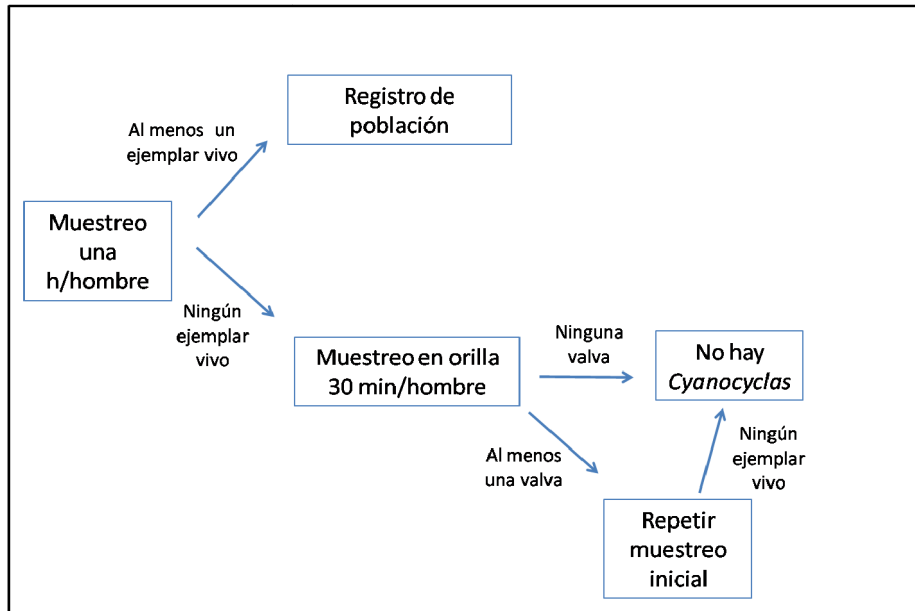


Figura 2.3. Esquema de muestreo utilizado para estudiar la presencia de *Cyanocyclus* en cada localidad.

2.3 Resultados

Solo se volvieron a encontrar ejemplares de *Cyanocyclus* en cinco de las localidades revisadas (Arroyo Guaviyú, Paso Mazangano, Bahía de Yaguareté, Arroyo Batoví y Laguna Arnaud) (Figura 2.4). En el caso de Yaguareté, donde se habían registrado cuatro especies de *Cyanocyclus*, solo se volvieron a registrar *C. limosa* y *C. fortis*, faltando *C. exquisita* y *C. paranensis* (Tabla 2.1). Se registraron ejemplares de *Cyanocyclus* en 13 nuevas localidades de las 107 muestreadas (Tabla 2.2 y Figuras 2.4 y 2.5).

Tabla 2.1. Estado de las poblaciones revisitadas. A°= arroyo, P°= paso, R= ruta.

Localidad	Presencia/Ausencia	Observaciones
A° Guaviyú, R.3 (Paysandú)	Se registraron ejemplares de <i>C. limosa</i>	Sin presencia de <i>Corbicula</i>
A° Don Esteban, R.3 (Río Negro)	No se encontraron ejemplares	Presencia de <i>Corbicula fluminea</i> . El día del muestreo había una abundante floración de cianobacterias. Se constató en otros bivalvos que tenían sifones y branquias cubiertos por las cianobacterias
Río Uruguay, desembocadura A° Yaguareté (Río Negro)	Se registraron ejemplares de <i>C. limosa</i> y <i>C. fortis</i>	No se registraron ejemplares de <i>C. exquisita</i> ni <i>C. paranensis</i> . Localidad visitada en tres oportunidades con un esfuerzo de muestreo de 16 horas
Río Uruguay, Nuevo Berlín (Río Negro)	No se encontraron ejemplares	En esta localidad se registró un ejemplar de <i>C. fortis</i> en 2012. Presencia de <i>Corbicula fluminea</i>
Río Negro, P° Mazangano (Tacuarembó)	Se registraron ejemplares de <i>C. limosa</i>	Presencia de <i>Corbicula</i> sp.
Río Tacuarembó, P° Manuel Díaz (Rivera)	No se encontraron ejemplares	Esta población se basaba en el registro en 2008 de más de 100 ejemplares ubicados en un brazo. Actualmente se registra <i>Corbicula fluminea</i> . En 2008 no había <i>Corbicula</i> , en las revisitas (2013 y 2017) sí.
Laguna Arnaud (Treinta y Tres)	Se registraron ejemplares de <i>C. guahybensis</i>	Zona de recreación. Presencia de <i>Corbicula</i> sp.
Río Tacuarí, R.18 (Cerro Largo/Treinta y Tres)	No se encontraron ejemplares	Población registrada por Wilson Serra. Zona de recreación y extracción de áridos. Presencia de <i>Corbicula</i> sp.
A° Batoví, R.59 (Tacuarembó)	Se registraron ejemplares de <i>C. limosa</i>	En 2012 no había <i>Corbicula</i> , en la revisita (2017) sí.
A° Celestino, R.3 (Paysandú)	No se encontraron ejemplares	Esta población se basaba en el registro de tres ejemplares.

Tabla 2.2. Localidades del muestreo sistemático con presencia de *Cyanocyclas*. A°= arroyo, P°= paso, R= ruta.

Localidad	Cuenca	Especie presente	N° de individuos	Amenazas
Río Cuareim, P° Pacheco	Cuareim	<i>C. limosa</i>	1	Presencia de <i>Corbicula</i>
Río Arapey, P° del Horno	Arapey	<i>C. limosa</i>	1	Presencia de <i>Corbicula</i> a menos de 2 km
A° Sopas, P° Cementerio	Arapey	<i>C. limosa</i>	3	Presencia de <i>Corbicula</i> y <i>Limnoperna</i>
A° Sopas, P° del corral de piedra	Arapey	<i>C. limosa</i>	10	Presencia de <i>Corbicula</i>
Laguna marginal P° Aguiar, Río Negro	Alto Río Negro	<i>C. limosa</i>	30	Extracción de áridos, uso recreativo, extracción de leña, <i>Corbicula</i> registrada en el curso del río del mismo paso.
Río Tacuarí, R.8	Río Tacuarí	<i>Cyanocyclas sp.</i>	92	Uso recreativo, extracción de leña, presencia de <i>Corbicula</i> .
A° Blanquillo, R.42	Medio Río Negro	<i>C. limosa</i>	7	Uso recreativo, extracción de leña
A° Minas de Callorda	Medio Río Negro	<i>C. limosa</i>	41	Presencia de <i>Corbicula</i>
A° Tomas Cuadra, R.14	Río Yí	<i>C. limosa</i>	1	Presencia de <i>Corbicula</i>
A° Porongos, R.14	Río Yí	<i>C. limosa</i>	16	Uso recreativo, extracción de leña, presencia de <i>Corbicula</i> . Uso intensivo de cuenca
A° Guaviyú, R.3 (Paysandú)	Río Uruguay	<i>C. limosa</i>	31	Uso recreativo, extracción de leña, presencia de <i>Corbicula</i> Uso intensivo de cuenca
Río Daymán, P° del Parque, R.4	Río Daymán	<i>C. limosa</i>	58	Presencia de <i>Corbicula</i>
A° Negro, R.3	Río Uruguay	<i>C. limosa</i>	1	Extracción de leña, presencia de <i>Corbicula</i> . Uso intensivo de cuenca

Considerando las nuevas poblaciones y las localidades revisitadas donde se encontraron ejemplares en la actualidad, se conocen 18 localidades con presencia del género *Cyanocyclus*, 16 con *C. limosa*, una con *C. guahybensis*, una con *C. fortis* (junto a *C. limosa*) y una con *Cyanocyclus* sp. (Tablas 2.1 y 2.2). Las especies *C. paranensis* y *C. exquisita* registradas únicamente de la localidad bahía de Yaguareté (Clavijo 2014) no se han vuelto a registrar.

Considerando las principales cuencas de Uruguay, la cuenca del río Uruguay es la que más localidades con *Cyanocyclus* tiene (9) seguida por el río Negro (7) y la laguna Merín (2). No se registran poblaciones de *Cyanocyclus* en las cuencas del Océano Atlántico, Río de la Plata ni cuenca del río Santa Lucía. Observando en detalle la cuenca con mayor número de localidades es la del río Arapey (3 localidades); las cuencas del río Cuareim, Río Negro alto, río Yí tienen dos localidades cada una (Figura 2.4).

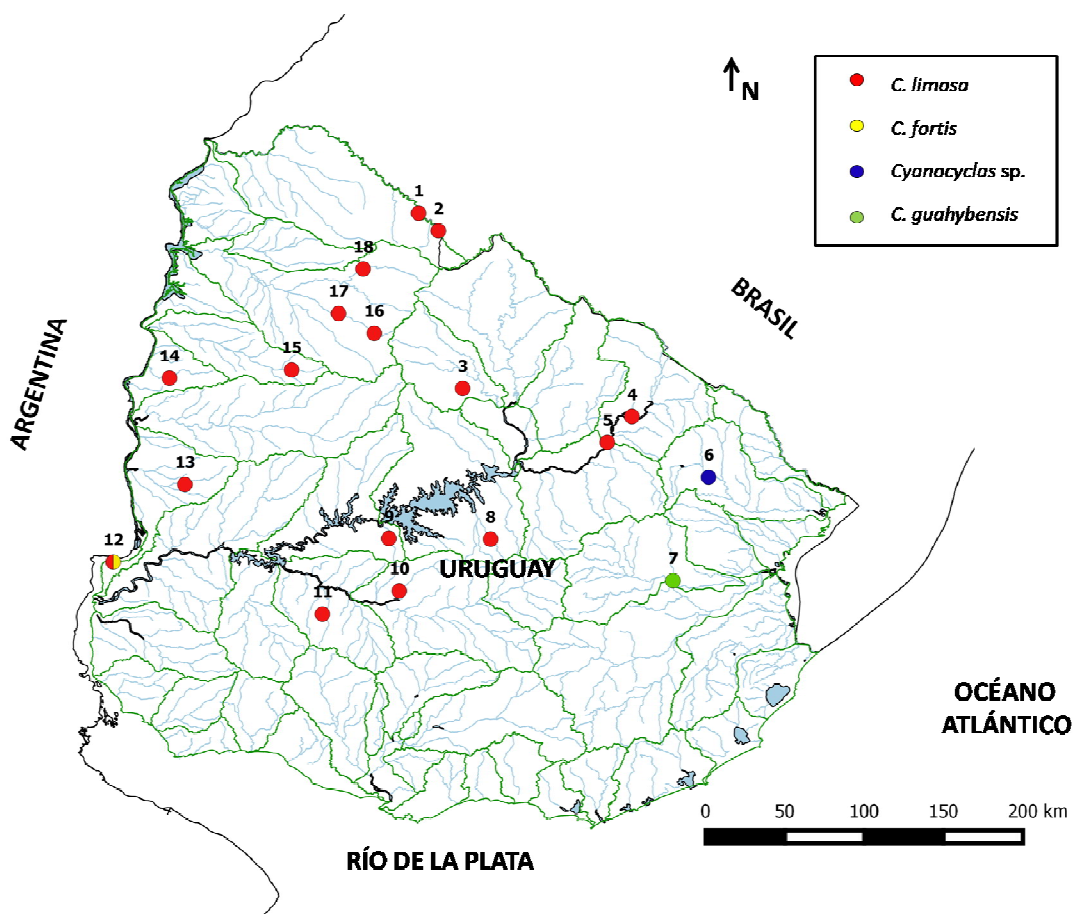


Figura 2.4. Localidades con presencia actual de *Cyanocyclus* en Uruguay. En verde se señalan los límites de subcuencas a nivel nacional. 1) río Cuareim, P° Pacheco; 2) río Cuareim, laguna Salamanca; 3) A° Batoví, R.59; 4) Río Negro, P° Mazangano; 5) Río Negro, P° Aguiar; 6) río Tacuarí, R.8; 7) laguna Arnaud; 8) A° Blanquillo, R.42; 9) A° Minas de Callorda; 10) A° Tomás Cuadra R.14; 11) A° Porongos, R.14; 12) río Uruguay, bahía de Yaguareté; 13) A Negro, R.3; 14) A° Guaviyú, R.3; 15) río Daymán, Paso del Parque. 16) A° Sopas, P° Cementerio; 17) A° Sopas, P° Corral de Piedra; 18) río Arapey, P° del Horno. A°= arroyo, P°= paso, R= ruta.

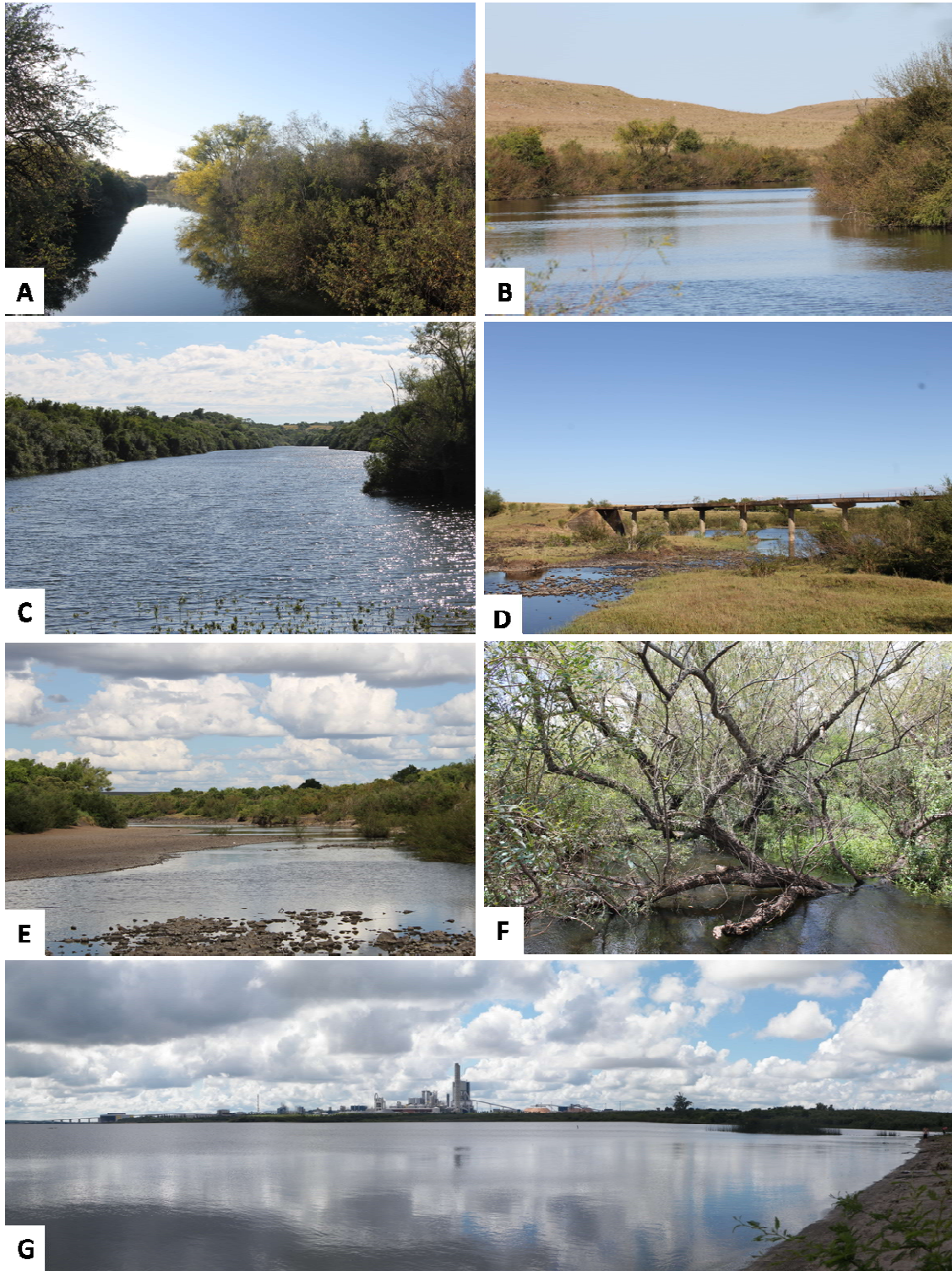


Figura 2.5. Ambientes de algunas localidades muestreadas con presencia de *Cyanocyclops* en Uruguay. A) A° Blanquillo; B) A° Minas de Callorda; C) A° Sopas, P° Cementerio; D) A° Sopas, P° del Corral de Piedras; E) Río Arapey, P° del Horno; F) Río Daymán, P° del Parque; G) Río Uruguay, Bahía de Yaguareté. A°= arroyo, P°= paso.

El promedio de individuos por localidad fue de 21 ejemplares. La mitad de las localidades presentaron menos de 10 ejemplares, con tres localidades donde se encontró un sólo ejemplar (Paso Pacheco, Paso del Horno y arroyo Tomás Cuadra). El máximo registrado fue de 92 ejemplares (río Tacuarí, ruta 8) (Figura 2.6, Tabla 2.2).

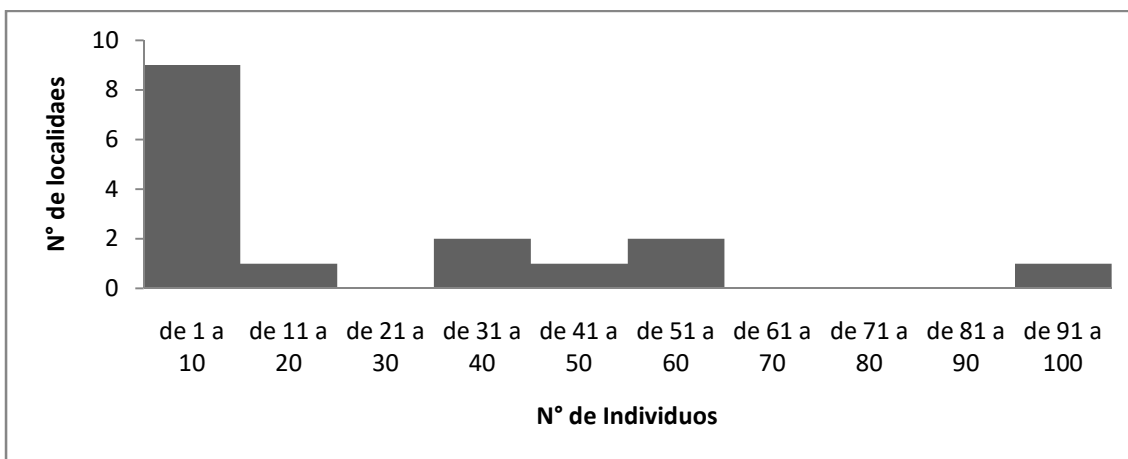


Figura 2.6. Localidades uruguayas con registro de *Cyanocyclas* ordenadas por número de individuos.

De las cinco localidades con al menos 30 individuos en cuatro se encontraba *C. limosa* y en una *Cyanocyclas* sp. El individuo más pequeño capturado midió 5.06 mm y el mayor 21.58 mm. Con excepción de la población del río Daymán donde se esboza un comportamiento bimodal, en el resto de las poblaciones se observa una sola moda. Las poblaciones de Minas de Callorda y Aguiar son similares, presentando el mayor número de individuos entre los 18 y 20 mm y un promedio idéntico (18.20 mm), mientras que en las poblaciones de Guaviyú y Tacuarí la mayoría de los individuos midieron entre 14 y 16 mm. Finalmente la población de Paso del Parque fue la de menor moda (12 a 14 mm) y promedio (10.44 mm) (Figura 2.7).

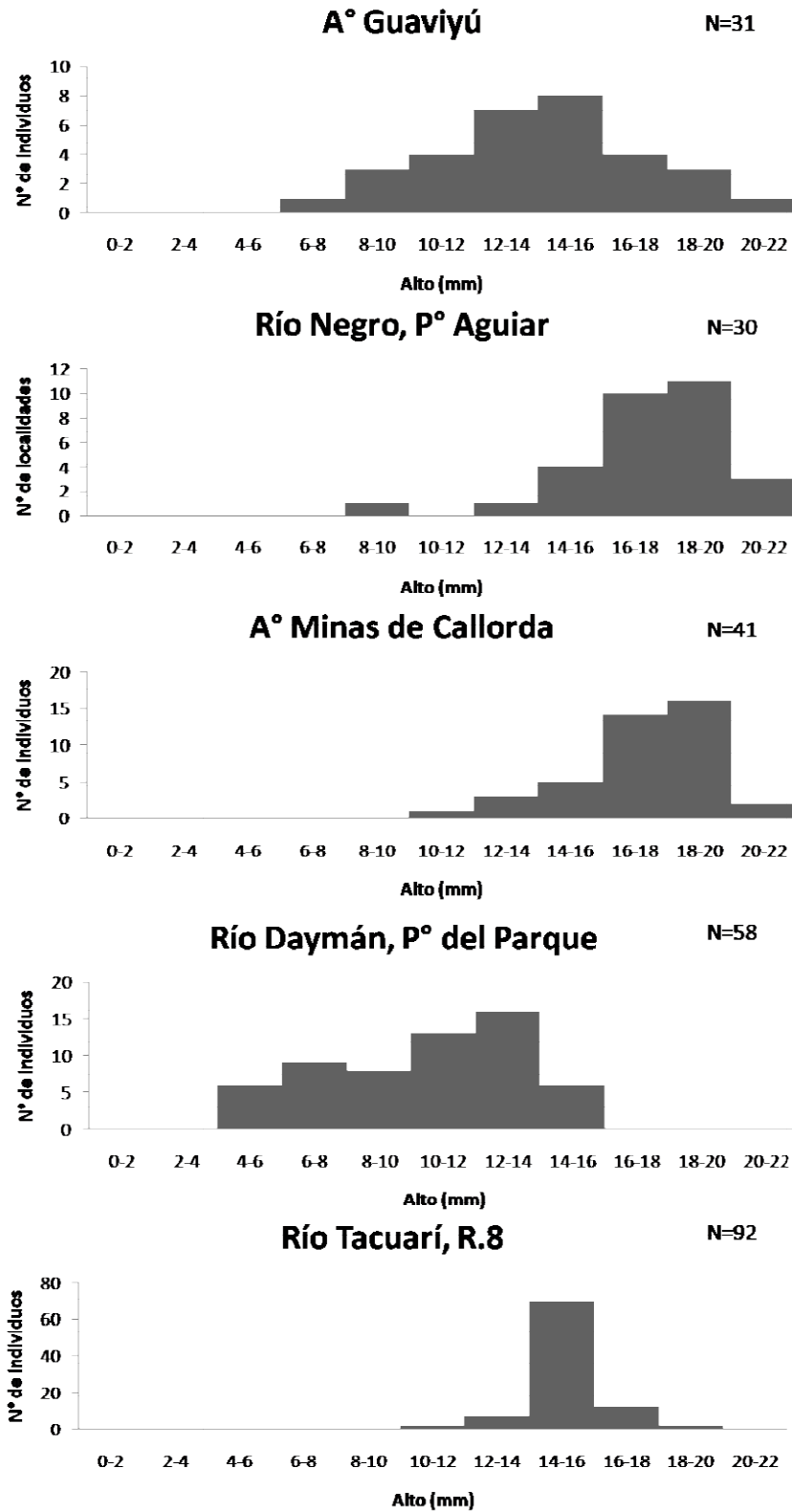


Figura 2.7. Histogramas de tallas (mm) en localidades uruguayas con al menos 30 individuos de *Cyanocyclas*. Guviyú, Aguiar y P° del Parque corresponden a *C. limosa*; Tacuarí corresponde a *Cyanocyclas* sp.

2.4 Discusión

La especie más ampliamente distribuida del género en Uruguay es *C. limosa* que se registra en 16 localidades, ocho de ellas con al menos 10 individuos. *Cyanocyclus guahybensis*, *C. fortis* y *Cyanocyclus* sp. están actualmente presentes en una sola localidad cada una. Para las otras dos especies del género *C. exquisita* y *C. paranensis* no se han vuelto a registrar ejemplares y sus últimos registros son de la bahía de Yaguareté en los años 2012 y 2009 respectivamente. La mayoría de las localidades corresponden a la cuenca del río Negro o río Uruguay aguas arriba del embalse de Salto Grande.

La ausencia de registros en las cuencas Atlántica, del río Santa Lucía y del Río de la Plata contrastan con registros históricos en esas cuencas (Clavijo & Carranza 2018). Lo mismo sucede con el río Cebollatí, en donde Olazarri (1968) había registrado *Cyanocyclus limosa* (posteriormente asignada a *C. guahybensis* por Clavijo 2014). Tampoco se registraron poblaciones de *Cyanocyclus* en la cuenca del Queguay, río del que no existen registros históricos (Clavijo & Carranza 2018).

Cyanocyclus guahybensis se registra en la localidad de Arnaud, próxima al río Olimar, cuenca de la laguna Merín. Otras tres poblaciones en Rio Grande do Sul son conocidas de la especie *C. guahybensis* además de la localidad uruguaya, una en el lago Guaíba y otras dos en lagunas del sistema río Tramandaí (Clavijo 2014).

La identidad específica de *Cyanocyclus* sp. será discutida en el capítulo III de esta tesis y en conclusiones. Hasta el momento se conocen dos localidades con registros de este morfotipo, ambas en el río Tacuarí; una de ellas fue revisitada sin registrarse ejemplares.

La ausencia de poblaciones en el bajo río Uruguay, bajo río Negro y Rio de la Plata interior de donde hasta los años 60' se conocían poblaciones de *C. exquisita*, *C. felipponei*, *C. fortis*, *C. limosa* y *C. paranensis* (Clavijo & Carranza 2018), dan cuenta de la disminución drástica que ha tenido el género en el Cono Sur. A fines de los años 1980 Amestoy & Spinetti (1989) realizaron muestreos de bivalvos en 19 localidades del río Uruguay entre Fray Bentos y Punta Gorda, registrando diez especies pero ninguna del género *Cyanocyclus*, lo que indica que ya en esa época las poblaciones de *Cyanocyclus* en el río eran al menos escasas. En contraste, recientemente fue registrada una población de *Cyanocyclus fortis* en la playa Ñandubaysal (Entre Ríos, Argentina) frente a Fray Bentos (I. González com. Pers.).

Si bien aún no son claras las causas de esta desaparición, Clavijo & Carranza (2018) hipotetizan una combinación del efecto negativo directo de la competencia entre *Corbicula* y *Cyanocyclus* con un escenario variable de degradación ambiental asociada a contaminación del agua o cambios en la dinámica de sedimentos.

El proceso de drástica disminución histórica que el género *Cyanocyclus* ha sufrido (Veitenheimer & Olazarri 1983, Lanzer & Schafer 1985, Mansur & Garces 1988 y Clavijo & Carranza 2018) no se ha detenido. Desde 2013 se ha registrado la desaparición de seis poblaciones (Tacuarembó, Don Esteban, Río Daymán, Celestino, Tacuari R.18, Nuevo Berlín) y la desaparición de registros de *C. exquisita* y *C. paranensis*. Para confirmar la completa desaparición de estas poblaciones o especies se deben realizar esfuerzos periódicos y sistemáticos durante años. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza define un taxón como extinto cuando no queda ninguna duda razonable de que el último individuo existente ha muerto (UICN 2012). Se presume que un taxón está extinto cuando la realización de prospecciones exhaustivas de sus hábitats, conocidos y/o esperados, en los momentos apropiados (diarios, estacionales, anuales), y a lo largo de su área de distribución histórica, no ha podido detectar un solo individuo. Las prospecciones deberán ser realizadas en períodos de tiempo apropiados al ciclo de vida y formas de vida del taxón (UICN 2012). El último registro de *Cyanocyclus felipponei* data de 1968, tiempo prudente para haber registrado algún ejemplar. De confirmarse la validez de esta especie mediante estudios moleculares sería el primer caso de extinción de un bivalvo dulceacuícola de América del Sur.

En este escenario se vuelve relevante continuar con la búsqueda de nuevas poblaciones, mantener un monitoreo sobre las poblaciones registradas y buscar alguna protección para las mismas dentro y fuera de las áreas protegidas hoy vigentes tanto en Uruguay como dentro de su rango de distribución.

Capítulo III

Sistemática molecular y filogeografía de *Cyanocyclas* basada en el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I COI y región ribosomal 28S nuclear

3.1 Introducción

3.1.1. Sistemática molecular y filogeografía como herramientas de conservación

Los estudios de sistemática molecular y filogeografía son fundamentales para comprender y gestionar la biodiversidad. Por un lado permiten establecer de forma objetiva límites entre las entidades específicas a conservar, lo que es fundamental ya que no se puede conservar aquello que no somos capaces de identificar en particular a nivel taxonómico de especie (Mace 2004). Por otro, la información que aportan la sistemática molecular y la filogeografía permite establecer relaciones e historias evolutivas entre grupos de especies, poblaciones e individuos. Además estos estudios genéticos permiten evidenciar la erosión de la biodiversidad como por ejemplo en la pérdida de haplotipos. (Frankham et al. 2008). Marcadores como el gen de la Citocromo oxidasa c subunidad I (COI) utilizado como “código de barras” han permitido aportar información tanto de la separación de las entidades específicas como de las relaciones entre grupos e historias evolutivas de organismos pertenecientes a la misma especie (Hebert *et al.* 2003). Marcadores más conservados como el gen nuclear 28S permiten estudiar cambios ocurridos más profundamente en el árbol de la vida ya que los genes y regiones nucleares tienen tasas de acumulación de mutaciones entre 5 y 10 veces menores que el genoma mitocondrial (Farias et al. 2001). La combinación de estos marcadores permitiría entonces resolver a diferentes escalas evolutivas las diferencias encontradas en un grupo de organismos dado.

3.1.2 Antecedentes de sistemática molecular de *Cyanocyclas*

La taxonomía del género *Cyanocyclas* Férussac, 1818 ha sido históricamente compleja. En el siglo XIX y principios del XX fueron descritas más de una decena de especies para el bajo río

Uruguay y Río de la Plata (Maton 1811, d'Orbigny 1835, Deshayes 1854, Pilsbry 1896, Larrañaga 1923, Marshall 1924, 1927) las que posteriormente fueron sinonimizadas a dos especies: *C. paranensis* y *C. limosa* por Parodiz & Hennings (1965). Varios autores contemporáneos hipotetizaron la existencia de especies válidas entre las sinonimizadas (Figueiras 1965, Olazarri 1966) e incluso análisis morfométricos posteriores indicaban claramente diferencias entre las especies sinonimizadas (ver Garces *et al.* 1989). A pesar de esto, la autoridad de Parodiz fue respetada.

A pesar de su relevancia para resolver problemas taxonómicos los antecedentes sobre filogenia molecular del género *Cyanocyclus* son escasos (Park & Ó Foighil 200, Clavijo 2014). Las especies del género *Cyanocyclus* son hermafroditas simultáneos, autosuficientes (Ituarte 1986) e incuban embriones y larvas en ambas hemibranchias internas hasta ser liberados como individuos juveniles (Ituarte 1984). En base a estas características Parodiz (1963), Figueiras (1965) y Parodiz & Hennings (1965) propusieron que las poblaciones de *Cyanocyclus* tienen una baja variabilidad intrapoblacional y una alta variabilidad entre poblaciones. Con el fin de testear esta hipótesis, casi 50 años después, Clavijo (2014) realizó estudios de sistemática molecular basados en la subunidad I del gen de la citocromo oxidasa en 38 individuos provenientes de 12 localidades de Uruguay y Brasil. En ese estudio se comprobó que la variabilidad intrapoblacional era baja, sin embargo la variabilidad interpoblacional no fue la esperada, ya que si bien se encontró variabilidad, un mismo haplotipo se registró en localidades separadas por cientos de kilómetros (Clavijo 2014).

En el mismo estudio se encontró que la especie *Cyanocyclus limosa* se separa en dos clados, cada uno con buen soporte, y entre ellos se encontraban clados de otras especies de *Cyanocyclus* por lo que *C. limosa* aparece como una especie parafilética. Ante las incoherencias filogenéticas encontradas, se plantea la hipótesis de estar ante un caso de especies crípticas o alternativamente la posible existencia de heteroplasma (Clavijo 2014), ya descrita para otros bivalvos (Breton *et al.* 2007).

Debido a la incertidumbre de la filogenia de *Cyanocyclus* y a la necesidad de definir las unidades de manejo para su conservación, el objetivo de este capítulo es resolver los problemas taxonómicos identificados comprobando la existencia de monofilia recíproca entre las especies de *Cyanocyclus* en base a marcadores mitocondrial y nuclear.

3.2 Materiales y Métodos

3.2.1 Muestras utilizadas

Para el estudio se utilizaron individuos provenientes de muestreos en Uruguay (ver capítulo II, Figura 3.1, Anexo II). Adicionalmente se realizaron extracciones de cinco muestras identificadas como *Cyanocyclas felipponei*, cinco de *C. simplex* provenientes del Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN, Argentina) y cinco muestras identificadas como *Cyanocyclas delicata* provenientes del Museo Nacional de Historia Natural (MHNH, Uruguay).

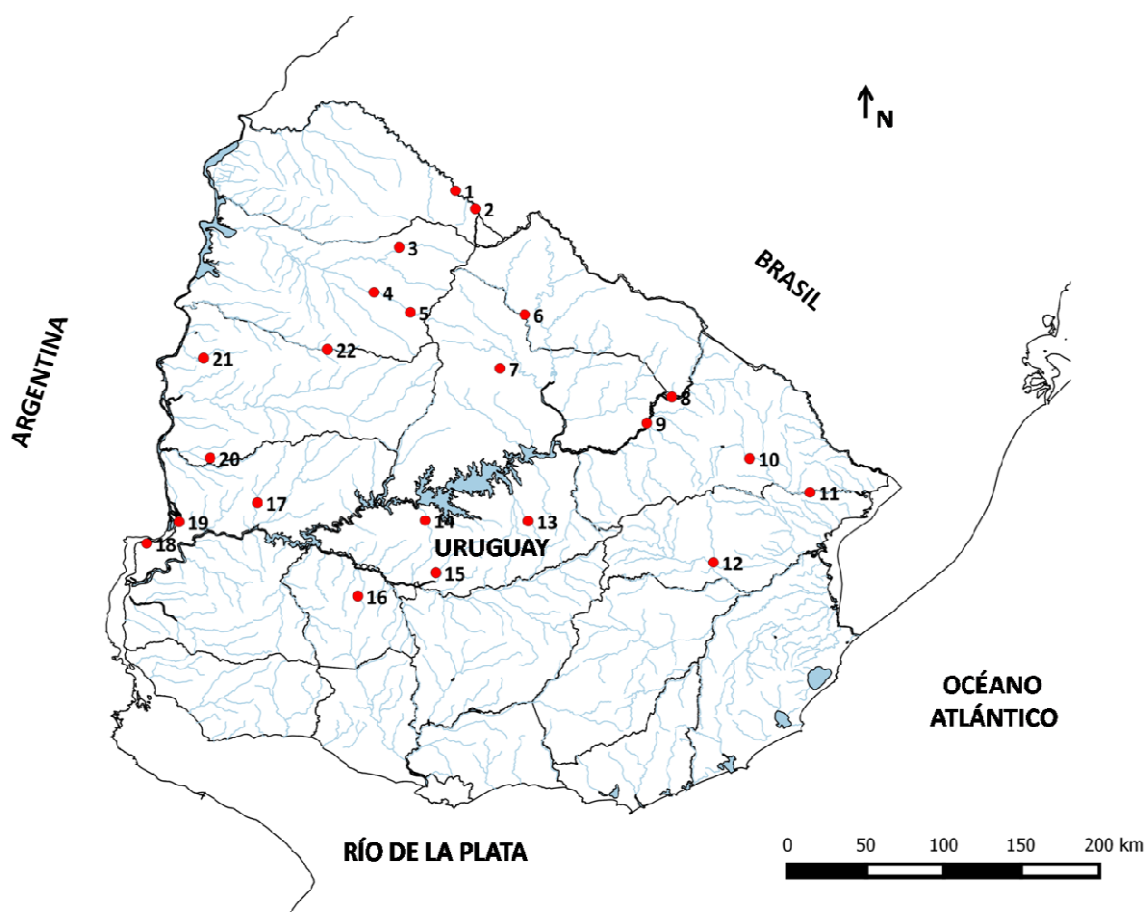


Figura 3.1. Localidades de los ejemplares uruguayos de *Cyanocyclas* utilizados en este estudio. 1) río Cuareim, P° Pacheco; 2) río Cuareim, laguna Salamanca; 3) río Arapey, P° del Horno; 4) A° Sopas, P° Cementerio; 5) A° Sopas, P° Corral de Piedra; 6) río Tacuarembó, P° Manuel Díaz; 7) A° Batoví, R.59; 8) Río Negro, P° Mazangano; 9) Río Negro, P° Aguiar; 10) río Tacuarí, R.8; 11) río Tacuarí, R.18; 12) laguna Arnaud; 13) A° Blanquillo, R.42; 14) A° Minas de Callorda; 15) A° Tomás Cuadra R.14; 16) A° Porongos, R.14; 17) A° Don Esteban, P° de las Piedras; 18) río Uruguay, bahía de Yaguareté; 19) río Uruguay, Nuevo Berlín; 20) A° Celestino, R.3; 21) A° Guaviyú, R.3; 22) río Daymán, Paso del Parque. A°= arroyo, P°= paso, R= ruta.

3.2.2 Extracción del ADN

El ADN se extrajo de muestras de musculatura del pie conservadas en etanol 95°, siguiendo un protocolo de precipitación de proteínas y de ADN con altas concentraciones de cloruro de sodio y etanol absoluto modificado de Medrano *et al.* (1990). El proceso requiere de alrededor de una semana con tres días de trabajo. En el primer día se realizaron dos lavados del tejido con un mililitro de buffer STE 1X (50 mM Tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA pH 8; 1 % SDS y 100 mM NaCl) pH 8 en frío (4 °C), luego se le agregó 550 µl de buffer de lisis pH 8 (50 mM Tris-Cl pH 8, 50 mM EDTA pH 8, 1 % SDS y 100 mM NaCl) y finalmente 11 µl de Proteinasa K (10 mg/ml). A continuación se homogeneizó mecánicamente el tejido y se lo dejó incubando durante una noche en estufa a 55°C. En el segundo día, una hora antes de finalizar la incubación se le agregó 6 µl de ARNasa (10mg/ml). Finalizada la incubación, se centrifugó por 10 minutos a 12.000 rpm, a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se le agregó 350µl de NaCl 5M para obtener una concentración final de NaCl 2M, esta mezcla fue centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm a temperatura ambiente. El sobrenadante resultante fue transferido a un nuevo tubo y se le agregó el doble de volumen de etanol absoluto en frío, estas dos mezclas no se homogeneizan, formando dos fases. El tubo con la mezcla fue agitado lentamente, para mezclar las dos fases y fue dejado por 48 horas a 4°C a fin de que el ADN completara la precipitación. En el tercer día la muestra fue centrifugada durante 30 minutos a 12.000 rpm, a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces el precipitado con Etanol 70 %, luego de cada lavado se realizó una centrifugación de 5 minutos a 6.000 rpm, a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se dejó secando durante una hora en estufa a 55 °C, luego se resuspendió en 100 µl de buffer TE 1X (10 mM Tris-Cl pH 8, 1 mM EDTA) y finalmente, luego de un baño a 65°C durante 20 minutos, se conservó a -20°C. La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %, teñido con Bromuro de Etidio.

3.2.3 Amplificación del ADN

Las amplificaciones "*in vitro*" se realizaron mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para el gen citocromo oxidasa c subunidad I (mtCOI) se utilizó los oligonucleótidos LCO1490 y HCO2198 generados por Folmer *et al.* (1994) y ya probados para Cyrenidae por Lee *et al.* (2005). Para realizar la reacción de amplificación se utilizó un termociclador automático (PTC-

100, MJ Research, Inc.). Para un volumen de 20 µl se utilizó como molde 2 µl de ADN genómico extraído de las muestras analizadas y 18 µl de una mezcla de reacción (13,6 µl H₂O, 2 µl de buffer 10X, 0,8 µl de MgCl₂, 0,4 de dNTPs 10 mM, 0,5 µl de cada oligonucleótido (LCO1490 y HCO2198), y 0,2 µl de polimerasa Taq (5U/µl). El programa de ciclos utilizado consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95°C durante cinco minutos, y luego 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante un minuto, *Annealing* a 45°C durante un minuto, Extensión a 72°C por dos minutos. Por último el programa realizó una extensión final a 72°C por siete minutos.

La mezcla utilizada para la amplificación para la región 28S de la subunidad mayor de ADN ribosomal fue la misma que para el gen COI pero utilizando los oligonucleótidos D1F y D6R utilizados por Park & Ó Foighil (2000), para resolver la sistemática de bivalvos dulceacuícolas heterodontos. El programa de ciclos utilizado consistió en un paso inicial de desnaturalización a 94°C durante cuatro minutos, y luego 36 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 40 segundos, *Annealing* a 55°C durante 40 segundos, Extensión a 72°C por un minuto y 40 segundos. Por último el programa realizó una extensión final a 72°C por diez minutos.

Los productos de PCR se verificaron mediante geles de agarosa 1 % teñidos con Bromuro de Etidio y fueron secuenciados en los servicios comerciales de MacroGen Inc., Seúl, Corea.

3.2.4 Alineamiento y edición de secuencias

Utilizando el software Mega, Versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013) las secuencias obtenidas fueron editadas a mano, en base a los respectivos cromatogramas. A estas secuencias se le sumaron 38 secuencias de COI utilizadas por Clavijo (2014). Secuencias de otros géneros de Cyrenidae y otras familias de bivalvos dulceacuícolas (para ambos marcadores) fueron utilizadas como grupos externos y obtenidas en el GenBank (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Lista de taxa obtenidos del GenBank utilizados en este estudio, con sus respectivos códigos de acceso para el gen Citocromo c mitocondrial (mtCOI) y región ribosomal 28S nuclear respectivamente.

Orden	Familia	Especie	Marcador	Número de Acceso
Veneroidea	Cyrenidae	<i>Polymesoda caroliniana</i>	28S	KX713425.1
Veneroidea	Cyrenidae	<i>Polymesoda maritima</i>	28S	AF 131010.1
Veneroidea	Cyrenidae	<i>Corbicula fluminea</i>	28S	AF 131009.1
Veneroidea	Cyrenidae	<i>Cyanocyclas limosa</i>	28S	AF 131012.1
Veneroidea	Cyrenidae	<i>Cyanocyclas limosa</i>	COI	AF196277.1
Veneroidea	Cyrenidae	<i>Polymesoda caroliniana</i>	COI	AF196276.1
Unionoidea	Mycetopodidae	<i>Anodontites elongata</i>	COI	JN243888.1
Unionoidea	Hyriidae	<i>Diplodon deceptus</i>	COI	AF231744.1

Asimismo para los análisis del gen 28S se incluyó una secuencia de *Cyanocylas limosa* proveniente de GenBank. Todas las secuencias fueron alineadas en el mismo programa con Clustal W (Thompson *et al.* 1997).

3.2.5 Análisis filogenético

Antes de realizar los análisis filogenéticos, para cada uno de ellos e incluyendo las secuencias utilizadas fueron realizadas prueba de modelos de evolución molecular para el *set* de datos con el programa MEGA Versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Las distancias pareadas entre grupos y dentro de grupos fueron calculadas con el mismo programa.

En base a las secuencias obtenidas se construyeron árboles filogenéticos por métodos basados en modelos de evolución molecular (máxima verosimilitud y unión de vecinos), y no basados en modelos de evolución (máxima parsimonia). Para la construcción de árboles se usaron como grupo externo secuencias de especies de bivalvos de *Corbicula* y *Polymesoda* (Cyrenidae).

La búsqueda del árbol más parsimonioso se realizó en dos etapas, en la primera se construyó un árbol en base al algoritmo de intercambio de vecinos más cercanos (Nei & Kumar 2000), y posteriormente se aplicó el algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting*. La estabilidad del árbol fue testada con un test *bootstrap* de 1000 pseudoréplicas; estos análisis fueron implementados en el programa MEGA, Versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013).

El análisis de máxima verosimilitud se realizó en el programa MEGA, Versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013) en base al modelo de Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993). El árbol inicial para la búsqueda heurística fue obtenido tras aplicar el algoritmo BioNJ (Gascuel 1997) a la matriz de distancias pareadas estimadas usando *Maximum Composite Likelihood*. Posteriormente el árbol fue refinado usando el algoritmo de intercambio de vecinos cercanos. La estabilidad del árbol fue testada con un test *bootstrap* de 1000 pseudoréplicas; estos análisis fueron implementados en el programa MEGAm Versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013).

3.2.6 Análisis filogeográfico

Los haplotipos dentro del género *Cyanocylas* fueron determinados usando el programa DNASP (Librado & Rozas 2009). En base a esta definición de haplotipos se construyó una red de haplotipos usando el programa Network 4.6.1.2 (Bandelt *et al.* 1999) para dicho análisis se utilizó el algoritmo *median-joining* (Bandelt *et al.* 1999).

3.3 Resultados

3.3.1 Análisis de secuencias y polimorfismo de ADN mitocondrial

Para los análisis fueron utilizadas en total 94 secuencias de la subunidad I de la Citocromo oxidasa (COI). El fragmento de COI estudiado consistió en 611 pares de bases. Dentro del género *Cyanocyclas* se encontraron 93 sitios variables y 85 sitios informativos (Tabla 3.2). *Cyanocyclas limosa* fue la especie con más sitios variables (47), de los cuales 41 fueron parsimoniosamente informativos; menos variables resultaron *C. exquisita*, *C. fortis* y *C. guahybensis* (11, 6 y 3 sitios variables respectivamente). En total se identificaron 34 haplotipos, 21 de ellos corresponden a *C. limosa*. Para *C. exquisita* y *C. fortis* se registraron cuatro haplotipos por especie, tres para *C. guahybensis* mientras que *Cyanocyclas* sp. y *C. paranensis* solo presentaron un haplotipo cada una de ellas (Tabla 3.2 y 3.4). En relación a las muestras de museo, a pesar de varios intentos y de llegar a obtener secuencias posteriormente se probó que lo que se había amplificado en estas muestras era contaminación de algas crisófitas o ascomicetes.

Tabla 3.2. Parámetros estadísticos de diversidad genética para el género *Cyanocyclas* y las especies estudiadas de Uruguay.

	n	Pares de Bases	Sitios Variables	Sitios parsimoniosamente informativos	Nº de Haplotipos
Género <i>Cyanocyclas</i>	94	611	93	85	34
<i>C. limosa</i>	51	611	47	41	21
<i>C. guahybensis</i>	14	611	3	2	3
<i>C. fortis</i>	12	611	6	6	4
<i>C. exquisita</i>	9	611	11	8	4
<i>Cyanocyclas</i> sp.	7	611	0	0	1
<i>C. paranensis</i>	1	611	-	-	1

3.3.2 Distancias genéticas en el gen mitocondrial COI

Las distancias genéticas pareadas entre especies de *Cyanocyclus* varió entre 0.024 y 0.062 (Tabla 3.3). La mínima distancia se observó entre *Cyanocyclus limosa* y *C. paranensis* (0.024). *Cyanocyclus guahybensis* y *Cyanocyclus* sp. fueron las especies con mayor distancia en relación a las otras especies (entre 0.047 y 0.062). Considerando las distancias intraespecíficas *C. limosa* presentó una distancia de 0.014, mientras que las demás especies no superaron el 1%.

Tabla 3.3. Distancias pareadas intra y entre especies de *Cyanocyclus* en Uruguay. En gris se señalan las distancias internas de cada especie

	<i>C. paranensis</i> N=1	<i>C. exquisita</i> N=9	<i>C. fortis</i> N=12	<i>C. limosa</i> N=51	<i>C. guahybensis</i> N=14	<i>Cyanocyclus</i> sp. N=7
<i>C. paranensis</i> N=1	N/A					
<i>C. exquisita</i> N=9	0.034	0.008				
<i>C. fortis</i> N=12	0.038	0.039	0.005			
<i>C. limosa</i> N=51	0.024	0.028	0.033	0.014		
<i>C. guahybensis</i> N=14	0.047	0.059	0.061	0.052	0.002	
<i>Cyanocyclus</i> sp. N=7	0.052	0.062	0.062	0.052	0.028	0

3.3.3 Análisis filogenéticos basados en el gen mitocondrial COI

La monofilia del género *Cyanocyclus* fue bien soportado por todos los métodos (Unión de Vecinos (NJ)=100, Máxima Parsimonia=99, Máxima Verosimilitud=99) (Figura 3.3). Dentro de este género se observan dos clados con buen soporte, en uno de ellos colapsan las especies del sistema Patos-Merín (*Cyanocyclus* sp. y *C. guahybensis*) (NJ=99, MP=98, MV=98) y el otro, con menor soporte (NJ=80, MP=82, MV=77), agrupa las especies de la cuenca del Río de la Plata (*C. exquisita*, *C. fortis*, *C. limosa* y *C. paranensis*)(Figura 3.3).

Las especies del sistema Patos-Merín representaron grupos monofiléticos con buen soporte, *Cyanocyclus* sp. (NJ=100, MP=100, MV=100) y *C. guahybensis* (NJ=99, MP=99, MV=99). En

el clado de las especies de la cuenca del Río de la Plata se observa una politomía basal, en la que se diferencian cuatro clados y un ejemplar que colapsa independientemente (Figura 3.2). Las secuencias de *C. fortis* forman un clado monofilético (NJ=100, MP=99, MV=99). Dentro de esta especie se observan dos clados: uno exclusivamente incluyendo secuencias de Yaguareté y el otro con secuencias de esta misma localidad junto con una de Nuevo Berlín (Figura 3.2 y 3.3). Un segundo clado (NJ=99, MP=99, MV=98) integra las secuencias de *C. exquisita* formando un grupo monofilético. Al igual que con *C. fortis* esta especie presenta dos subclados. En cambio *C. limosa* presentó dos grupos; el clado A (NJ=85, MP=89, MV=74) incluye la mayoría de las secuencias (41) pertenecientes a esta especie y que presentó una compleja estructura interna. El clado B tuvo bajo soporte (NJ=48, MP=64, MV=54) y agrupa otras diez secuencias. Finalmente la única secuencia perteneciente a *C. paranensis* no se agrupa con ninguna de las otra secuencias analizadas.

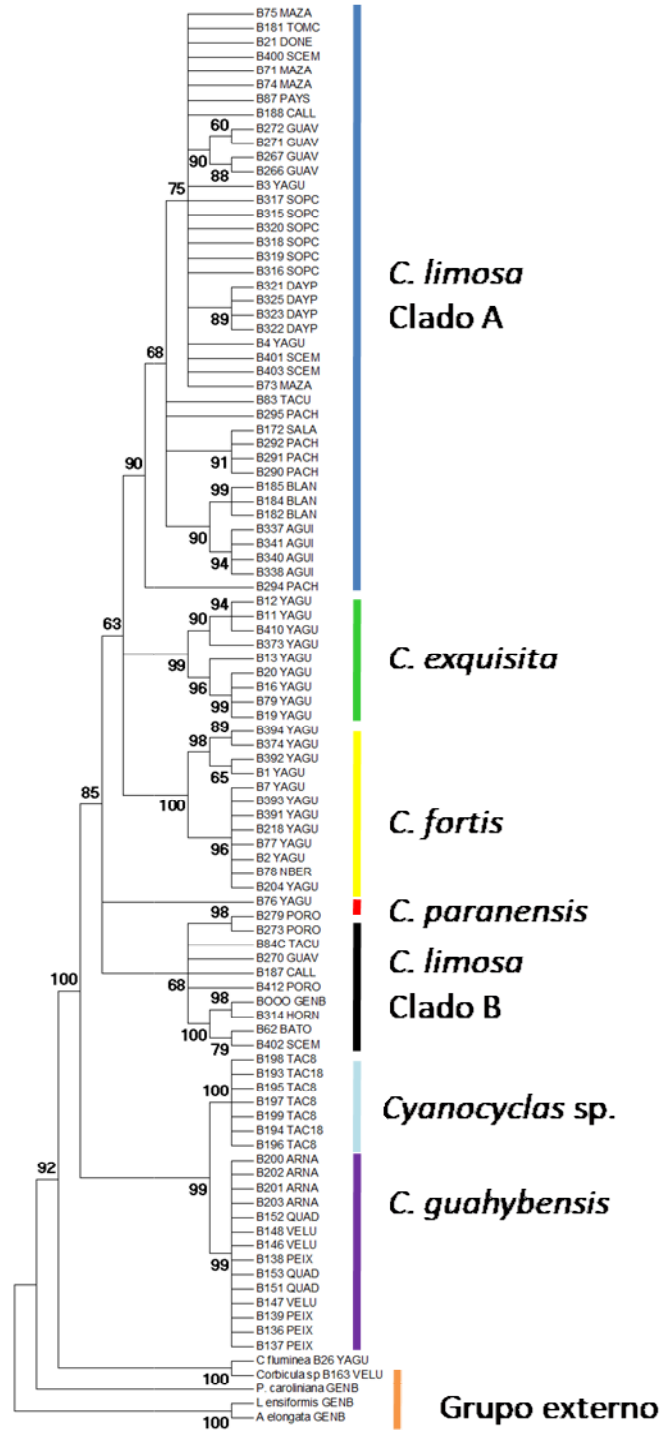


Figura 3.2. Árbol de máxima parsimonia para los individuos del género *Cyanocyclas* obtenido mediante el consenso estricto de los cinco árboles más parsimoniosos (550 pasos). Los números en las ramas representan los soportes de *bootstrap* mayores a 60 %.

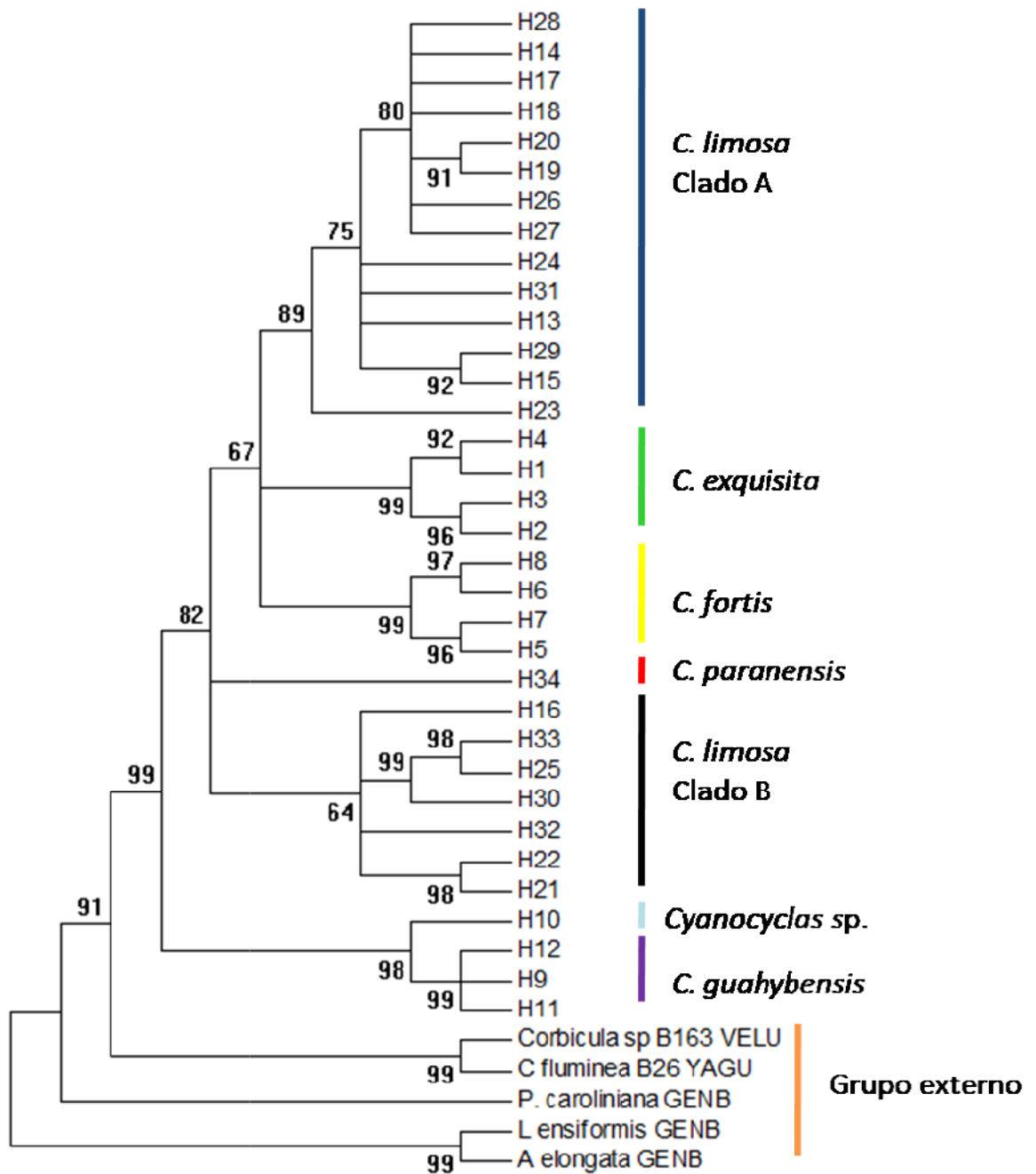


Figura 3.3. Árbol de máxima parsimonia para los haplotipos del género *Cyanocyclas* obtenido mediante el consenso estricto de los cuatro árboles más parsimoniosos (540 pasos). Los números en las ramas representan los soportes de *bootstrap* mayores a 60 %.

3.3.4 Análisis filogeográfico

Dentro del género *Cyanocyclus* se identificaron 34 haplotipos, la especie con mayor número fue *Cyanocyclus limosa* (21). *C. fortis* y *C. exquisita* presentaron cuatro haplotipos cada una de ellas, *C. guahybensis* tres y *Cyanocyclus* sp. y *C. paranensis* un haplotipo cada una (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Haplotipos de *Cyanocyclus* por especie y localidad.

Haplotipo	N° Catálogo laboratorio	Especie	Localidad
H1	B11, B12, B410	<i>C. exquisita</i>	Yaguareté
H2	B13	<i>C. exquisita</i>	Yaguareté
H3	B16 B19 B20 B79	<i>C. exquisita</i>	Yaguareté
H4	B373	<i>C. exquisita</i>	Yaguareté
H5	B1, B392	<i>C. fortis</i>	Yaguareté
H6	B2, B7, B77, B204, B218, B391, B393	<i>C. fortis</i>	Yaguareté
H7	B374, B394	<i>C. fortis</i>	Yaguareté
H8	B78	<i>C. fortis</i>	Nuevo Berlin
H9	B136 B137 B138 B139 B146 B147 B148 B151 B152 B153	<i>C. guahybensis</i>	Quadros, Peixoto, Veludo
H10	B193, B194, B195, B196, B197, B198, B199	<i>Cyanocyclus</i> sp.	Tacuarí R.8, Tacuarí R.18
H11	B200	<i>C. guahybensis</i>	Arnaud
H12	B201, B202, B203	<i>C. guahybensis</i>	Arnaud
H13	B172, B290, B291, B292	<i>C. limosa</i>	Salamanca, Pacheco

H14	B181	<i>C. limosa</i>	Tomás Cuadra
H15	B182, B184, B185	<i>C. limosa</i>	Blanquillo
H16	B187, B270, B412	<i>C. limosa</i>	Minas de Callorda, Guaviyú, Porongos
H17	B188	<i>C. limosa</i>	Minas de Callorda
H18	B3, B4, B21, B71, B73, B74, B75, B87, B400, B401, B403	<i>C. limosa</i>	Don Esteban, Yaguareté, Mazangano, Paysandú, Cementerio
H19	B266, B267	<i>C. limosa</i>	Guaviyú
H20	B271, B272	<i>C. limosa</i>	Guaviyú
H21	B273	<i>C. limosa</i>	Porongos
H22	B279	<i>C. limosa</i>	Porongos
H23	B294	<i>C. limosa</i>	Pacheco
H24	B295	<i>C. limosa</i>	Pacheco
H25	B314	<i>C. limosa</i>	Horno
H26	B315, B316, B318, B319, B320	<i>C. limosa</i>	Corral de Piedras
H27	B317	<i>C. limosa</i>	Corral de Piedras
H28	B321, B322, B323, B325	<i>C. limosa</i>	Parque
H29	B337, B338, B340, B341	<i>C. limosa</i>	Aguiar
H30	B62, B402	<i>C. limosa</i>	Batoví, Cementerio
H31	B83	<i>C. limosa</i>	Tacuarembó
H32	B84C	<i>C. limosa</i>	Tacuarembó
H33	B00	<i>C. limosa</i>	La Plata
H34	B76	<i>C. paranensis</i>	Yaguareté

La red de haplotipos resultante presenta un complejo entramado central representado por los 21 haplotipos de *C. limosa* (Figura 3.4). Dentro de esta especie se pueden distinguir dos subclados uno con el haplotipo H18 presente en cinco localidades como haplotipo central, y otro con el haplotipo H16 presente en tres localidades también como haplotipo central. Dentro de este segundo subclado hay una distancia entre H16 y H30 de 14 pasos mutacionales lo que representa la mayor distancia encontrada dentro de *C. limosa*.

De esta red central que reúne los haplotipos de *C. limosa* se desprenden tres grupos de haplotipos correspondientes a *C. exquisita*, *C. fortis* y *C. guahybensis* con 11, 14 y 24 pasos de distancia entre haplotipos de estas especies respectivamente en relación al haplotipo más cercano de *C. limosa*. El único ejemplar obtenido de *C. paranensis* se ubicó sólo y a 13 pasos del haplotipo de *C. limosa* más cercano. *Cyanocyclus* sp. (H10) se une a la red a través de un ancestro hipotético entre este haplotipo y los haplotipos H12 y H9 de *C. guahybensis*. Ambos grupos de haplotipos están separados del resto por 23 pasos mutacionales (Figura 3.4). Los haplotipos H9 de *C. guahybensis*, H10 de *Cyanocyclus* sp. y H13, H16, H18 y H30 de *C. limosa* estuvieron presentes en más de una localidad, mientras que los 28 haplotipos restantes solo estuvieron presentes en una localidad cada uno.

La localidad más diversa en haplotipos es la bahía de Yaguareté que además de contener todos los haplotipos de *C. exquisita* y *C. paranensis* contiene tres de los cuatro haplotipos de *C. fortis* y un haplotipo de *C. limosa*. Sin embargo si se enfoca sólo en esta última especie tres localidades tienen tres haplotipos de *C. limosa* (Guaviyú, Porongos y Pacheco).

Dado que *C. exquisita* y *C. paranensis* fueron encontradas únicamente en Yaguareté todos sus haplotipos estuvieron presentes en esta localidad. Tres haplotipos de *C. fortis* (H5, H6 y H7) estuvieron presentes en Yaguareté mientras que el H8 fue el único haplotipo encontrado fuera de esa localidad. El haplotipo H9 de *C. guahybensis* estuvo presente en tres localidades de Rio Grande do Sul, mientras que la laguna Arnaud en Uruguay presentó dos haplotipos (H11 y H12). *Cyanocyclus* sp. presentó un único haplotipo (H10) que estuvo presente en dos localidades del río Tacuarí.

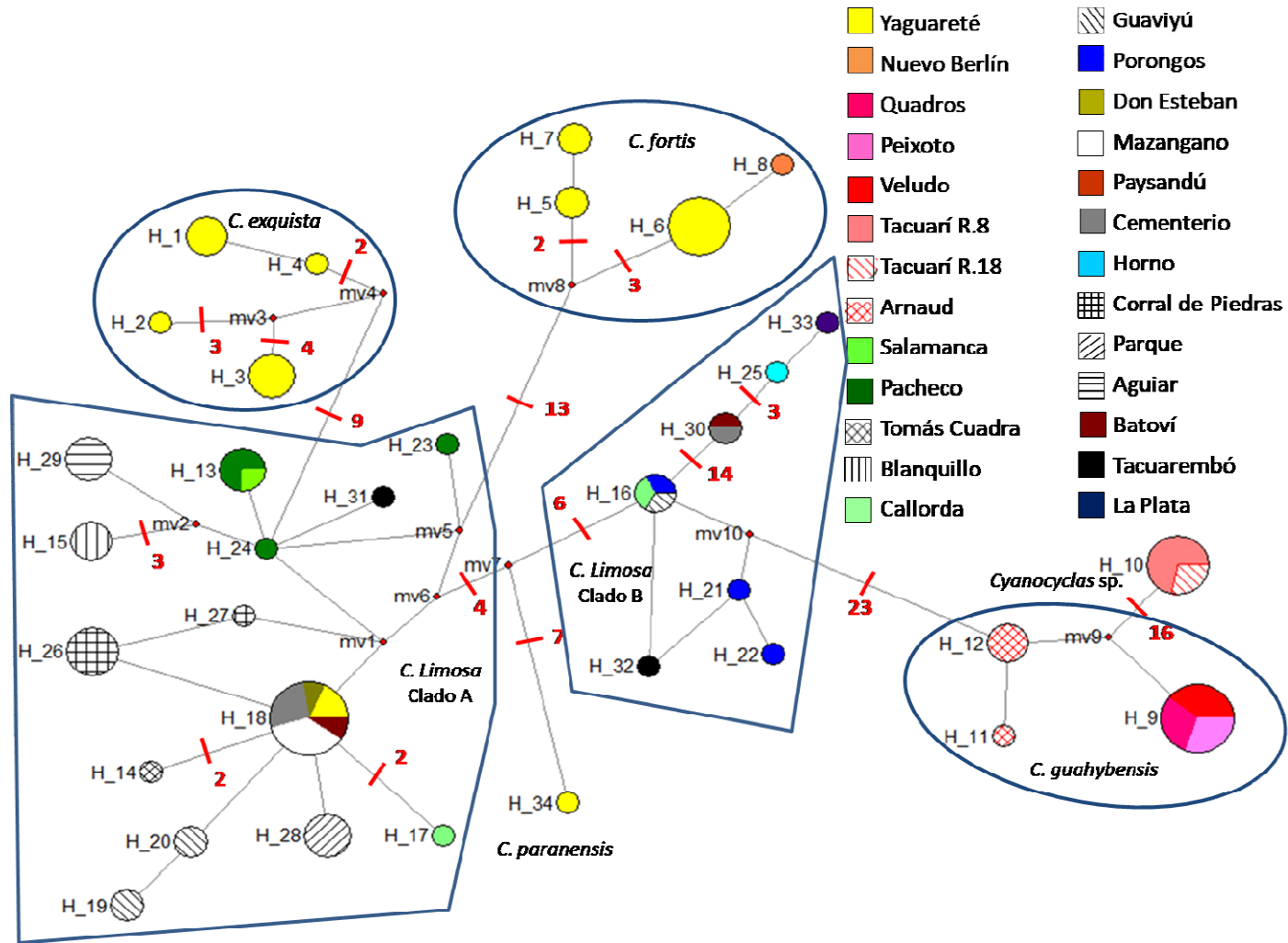


Figura 3.4. Red de haplotipos de *Cyanocyclas* basada en el gen mitocondrial COI (ver tabla 3.5). Los puntos rojos representan hipotéticos haplotipos no presentes en la muestra y las barras con números rojos el número de pasos mutacionales entre un haplotipo y otro o un intermediario cuando este es mayor a 1. El resto de las uniones está separado por un paso mutacional.

3.3.5 Análisis de secuencias y polimorfismo de ADN nuclear

Para los análisis fueron utilizadas en total 25 secuencias de subunidad mayor de ADN ribosomal 28S. El fragmento de 28S estudiado consistió en 895 pares de bases. El set completo de datos (incluyendo grupo externo) tiene 68 sitios informativos, sin embargo dentro del género *Cyanocyclus* se encontraron solo cinco sitios variables de las que únicamente dos fueron sitios informativos. En los árboles filogenéticos realizados con todos los métodos se definen con buen soporte los tres géneros de Cyrenidae: *Corbicula* (NJ=99, MP=99, MV=99), *Polymesoda* (NJ=70, MP=84, MV=90) y *Cyanocyclus* (NJ=97, MP=99, MV=99) (Figura 3.5). Dentro del género *Cyanocyclus* se observa una politomía basal en la que colapsan todas las secuencias estudiadas de *Cyanocyclus* sp., *C. guahybensis*, *C. limosa* y *C. paranensis*. Los dos sitios informativos definen en los árboles con todos los métodos, dos clados con bajo soporte correspondientes a *C. fortis* (NJ=59, MP=61, MV=63) y *C. exquisita* (NJ=66, MP=61, MV=62). En las secuencias de *C. fortis* en el sitio 419 hay una timina mientras en las otras secuencias del género hay una adenina. En las secuencias de *C. exquisita* en el sitio 387 hay una timina mientras que en las otras *Cyanocyclus* y el grupo externo hay una citosina. De los otros tres sitios variables dos corresponden a un cambio de GC a CG en una secuencia de *C. fortis* (posiciones 579 y 580) y el otro es un sitio en el que aparecen adenina, guanina o un *gap* sin posibilidad de establecer claras relaciones taxonómicas. Las escasas diferencias encontradas determinaron que las distancias genéticas intra grupo fueran nulas e incluso las distancias pareadas entre especies presentara un máximo de 0.002 entre *C. fortis* y *C. exquisita*, únicas especies que a través de la diferencia en un sitio se separan de la politomía basal.

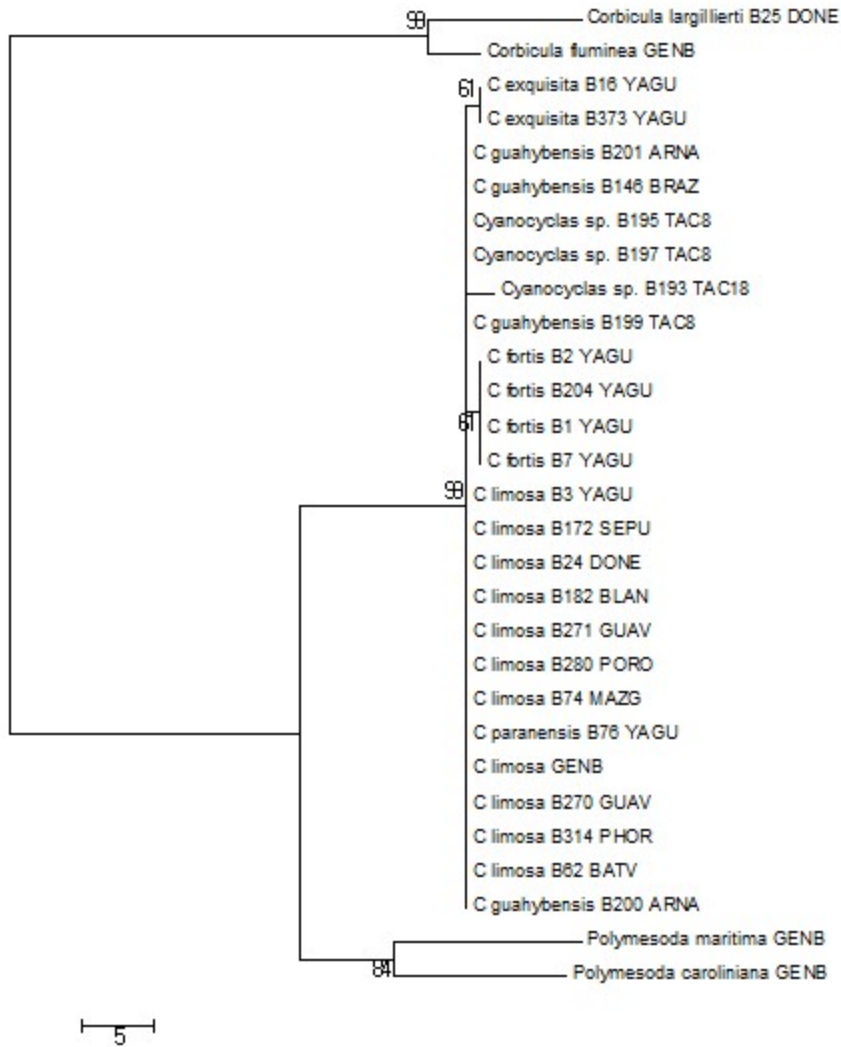


Figura 3.5. Árbol de máxima parsimonia basado en la región ribosomal nuclear 28S del género *Cyanocyclas* obtenido mediante el consenso estricto de los diez árboles más parsimoniosos de 111 pasos. Los números en las ramas representan los soportes de *bootstrap* mayores a 60 %.

3.4 Discusión

Las secuencias del gen nuclear 28S obtenidas en este estudio elevan sustancialmente el número de secuencias conocidas del género *Cyanocyclus*, para el que hasta el presente estudio solo se conocía una (Lee *et al.* 2005) y permiten sustentar la monofilia del género. Esto había sido sugerido por Clavijo (2014) usando el gen COI y en el presente estudio es soportado con un set de secuencias de mtCOI mucho más extenso. Sin embargo la región 28S contiene una información insuficiente para resolver las relaciones filogenéticas dentro del género ya que en mayor medida las especies colapsan en la politomía basal. No obstante los árboles muestran una separación de *C. fortis* y *C. exquisita* lo que apoya la validez de estas especies.

El gen de la Citocromo oxidasa c subunidad I (COI) es considerado el marcador mitocondrial más robusto discriminando no sólo entre especies muy relacionadas, sino también entre grupos pertenecientes a la misma especie. Estas características han llevado a considerarlo un “código de barras” de la biodiversidad (Hebert *et al.* 2003). Según Avise (2000) la distancia intraespecífica en el gen mitocondrial COI rara vez supera el 2% y en la mayoría de los casos no alcanza el 1%.

Los datos filogenéticos obtenidos con el gen COI son concordantes con los obtenidos por Clavijo (2014) quien identificó cinco clados de *Cyanocyclus*, asignados a *C. limosa*, *C. paranensis*, *C. fortis*, *C. guahybensis*, y *C. exquisita*. En el presente trabajo se registró además un sexto clado correspondiente a ejemplares del río Tacuarí (*Cyanocyclus* sp.) los que se además se diferencian morfológicamente de los ejemplares de la especie más cercana (*C. guahybensis*).

Entre *Cyanocyclus* sp. y *C. guahybensis* hay una distancia de 0.028, mayor incluso que entre *C. limosa* y *C. paranensis* las dos especies consideradas válidas en la revisión del género por Parodiz & Hennings (1965). *Cyanocyclus* sp. presenta un sólo haplotipo y está presente únicamente en el río Tacuarí. Por lo anterior se considera que las diferencias encontradas tanto a nivel genético como morfológico, pueden estar sugiriendo la presencia de una especie nueva para los ejemplares de *Cyanocyclus* provenientes del río Tacuarí, lo cual será abordado en futuros estudios.

Cyanocyclus sp. y *C. guahybensis* son las especies más distantes con respecto a las otras especies del género (distancias mayores a 4.5%). Cada una de ellas constituye un clado monofilético bien soportado con todos los métodos y en la red de haplotipos presentan una

distancia de 23 pasos mutacionales con la especie más cercana (Figura 3.4). Estas dos especies son propias del sistema Patos-Merín, el que se encuentra aislado de la cuenca del Río de la Plata, lo que podría explicar desde el punto biogeográfico las diferencias observadas con las especies de esta cuenca.

Dentro del grupo de especies del Río de la Plata se observa una politomía lo que ya fuera indicado por Clavijo (2014). En la topología de los árboles filogenéticos las politomías pueden deberse a la falta de información (politomía débil) o a eventos de especiación simultáneos (politomía dura) (Purvis & Garland 1993). Los árboles de Clavijo (2014) fueron realizados en base a 38 secuencias, mientras que en el presente estudio se utilizaron 94 individuos aumentando notablemente la cantidad de secuencias de *C. limosa*, *C. fortis* y *C. exquisita*. Esto le da más robustez a la información obtenida descartando entonces una politomía débil basada en la falta de datos. En concordancia con estos hallazgos, la existencia de una extensa politomía basal en la región 28S ribosomal, soporta la hipótesis de la posible ocurrencia de especiación rápida en este género de bivalvos. Cabe recordar que la región 28S evoluciona lentamente y por ende los pocos sitios variables están saturados, por lo que no contiene información filogenética para el género *Cyanocyclus*. En efecto, este marcador puede estar reflejando la historia compartida de varios de estos taxa antes de su cladogénesis, eventos que deja en evidencia el marcador mitocondrial debido a sus altas tasas de evolución en relación al marcador nuclear. La separación de poblaciones desde un ancestro común mediada por eventos transgresivos y regresivos en el nivel del mar, podrían haber contribuido al aislamiento de localidades en el bajo río Uruguay, y estar relacionada con esta rápida radiación observada en el género. La única especie de *Cyanocyclus* para la que hay registro fósil es *C. limosa* registrada en seis de siete sitios de la formación Sopas (43000-45000 años AP) (Martínez & Rojas 2004). También existen antecedentes en la provincia de Entre Ríos, Argentina de *Polymesoda* (Bivalvia: Cyrenidae) para el Mioceno tardío (Formación Paraná, ca. 10 millones de años AP) (Pérez et al. 2010). Los autores de este registro indican una posible conexión norte-sur en el Mioceno a través de un brazo estuarino del mar Enterriense con el mar de Pebas lo que habría permitido la llegada de la familia Cyrenidae al sur del continente americano.

La topología resultante de los árboles y la red de haplotipos para *Cyanocyclus limosa* es particular ya que se trata de una especie parafilética lo que según Clavijo (2014), sería explicado por la hipótesis de existencia de heteroplasmia o de lo contrario, una entidad específica críptica. El testeo de esta hipótesis en esta especie se enfocará en el capítulo IV.

La presencia de un haplotipo de *Cyanocyclas limosa* (H18) en cinco localidades distantes (Don Esteban, Yaguareté, Mazangano, Paso Cementerio y Paysandú, ver figura 3.1), y de un haplotipo de *Cyanocyclas guahybensis* en tres localidades alejadas (Quadros, Peixoto y Veludo) son inusuales para una especie animal no vágil y de reducida capacidad de dispersión mediante formas larvales. La distribución de estos haplotipos sugiere o bien que son haplotipos ancestrales de reproducción clonal o que la dispersión de la especie está facilitada por algún vector. Posibles vectores son peces o aves que se alimenten de ellos y que ya sea los ejemplares adultos o las crías desarrolladas en su interior, los que podrían soportar el paso a través del tracto digestivo o bien a algún tipo de fosis de juveniles, por ejemplo por artrópodos acuáticos o ligados a ese medio (Zelaya & Marinone 2012).

A pesar de lo anterior la mayoría de los haplotipos de *Cyanocyclas* están presentes en una única localidad. Esto es relevante por dos aspectos 1) cada población tiene una baja variabilidad genética lo que la hace sensible a problemas derivados de deriva génica y cambios ambientales y 2) Cada población tiene alta probabilidad de tener un haplotipo único lo que hace sea relevante su conservación. Es entonces que se vuelve fundamental ante cada nuevo registro realizar el estudio genético que permita comprender la variabilidad genética propia de la población y reconocer las particularidades genéticas.

Capítulo IV

Herencia mitocondrial en *Cyanocyclus limosa*

4.1 Introducción

Si bien en la mayoría de los animales la herencia del ADN mitocondrial es matrilineal, a partir de los descubrimientos de Zouros *et al.* (1992) se han identificado varios casos de moluscos bivalvos dioicos (Mytiloidea y Veneroidea marinos y Unionoidea dulceacuícolas) donde la herencia de ADNm se da tanto por parte de la madre como del padre, fenómeno conocido como doble herencia uniparental (DUI, Zouros *et al.* 1994). En los organismos con DUI las hembras heredan únicamente el genoma mitocondrial de su madre, el que ocupa tanto las células somáticas como las gonadales (Breton *et al.* 2007). En cambio los machos heredan el genoma mitocondrial de ambos parentales; mientras las mitocondrias del linaje femenino ocupan las células somáticas de los machos, las células que darán origen a la gónada reciben únicamente las mitocondrias masculinas (Breton *et al.* 2007). El fenómeno de la presencia de dos linajes mitocondriales en un mismo individuo es conocido como heteroplasmia. La segregación de los linajes mitocondriales en el macho hace posible que se mantenga los dos linajes de forma paralela transmitidos a través de hembras (linaje femenino) o a través de los machos (linaje masculino) (Breton *et al.* 2007).

Clavijo (2014) en la primera aproximación filogenética del género *Cyanocyclus* utilizando el gen mtCOI encontró que la especie *Cyanocyclus limosa* se separa en dos clados distantes, entre los cuales quedaban clados de otras especies, resultando que si se consideran los ejemplares identificados morfológicamente como *C. limosa*, la especie resulta parafilética. Ante las incoherencias filogenéticas encontradas, Clavijo (2014) sugiere la posibilidad de estar ante un caso de especies crípticas o alternativamente estar en presencia de heteroplasmia.

En el capítulo III de esta tesis se presentó un análisis más exhaustivo en cuanto al número y localidades de las muestras en relación a los análisis previos (Clavijo 2014). Estos análisis sustentan como resultado igualmente una topología en la que *Cyanocyclus limosa* aparece en dos clados distantes (A y B, Figura 3.3). Por otro lado, los análisis de ADN nuclear 28S realizados y presentados en el capítulo III, las secuencias correspondientes a individuos de ambos clados de *C. limosa* se agrupan en la politomía basal (Figura 3.5), lo que podría estar

soportando la existencia de una única entidad específica. Sin embargo la baja variabilidad de este marcador no permite resolver esto de manera robusta.

En el presente capítulo se pretende comprender la forma de herencia de ADN mitocondrial de *C. limosa*, utilizando tejidos tanto gonadales como somáticos de cada uno de los individuos analizados en este diseño, correspondientes a cada uno de los clados hallados. Inicialmente considerando a cada uno de estos clados como masculino y femenino respectivamente. De tal manera que se espera encontrar en los individuos pertenecientes al clado de *C. limosa* masculino, en el tejido gonadal un ADN mitocondrial de linaje masculino, mientras en el tejido somático de estos individuos encontraríamos el linaje femenino. En contraposición, dentro de los individuos del linaje femenino, esperaríamos encontrar tanto en sus tejidos somáticos como gonadales, el mismo tipo de ADN mitocondrial de linaje femenino.

El objetivo de este capítulo es testear la hipótesis de la posible existencia de heteroplasma en *Cyanocyclas limosa*.

4.2 Materiales y métodos

Con el fin de probar la presencia de heteroplasma se utilizaron las secuencias de *C. limosa* obtenidas a partir del pie (Tabla 4.1). Debido a la posición ventral de las gónadas masculinas en *Cyanocyclas limosa*, las que incluso llegan a ubicarse dentro del pie (Ituarte 1986) las muestras obtenidas de esta parte del cuerpo del animal podrían representar en algunos casos las secuencias de mitocondrias provenientes de las gónadas masculinas y no las mitocondrias somáticas. Por eso para nueve individuos (tres para cada agrupamiento de la red de haplotipos, ver Figura 3.4) se realizó una nueva extracción y secuencias (ver metodología capítulo III) tomando tejido del músculo aductor con el fin de asegurar que se estaba obteniendo la secuencia somática (Tabla 4.1). Las secuencias obtenidas fueron analizadas y se construyeron árboles de relacionamiento a través de un análisis de unión de vecinos (Saitou & Nei 1987) usando el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.* 2013). Además se realizaron nuevos agrupamientos de las secuencias estudiadas en el capítulo III para el estudio de distancias pareadas tomando en cuenta los clados observados dentro de *C. limosa* (Figura 3.3). Finalmente se revisó detalladamente la morfología de ejemplares provenientes de localidades

con presencia de los dos clados (Guaviyú, Callorda y Cementerio) con el fin de descartar la presencia de especies crípticas (ver Clavijo 2014).

Tabla 4.1. Tejidos de las muestras de *Cyanocyclas limosa* analizadas, por localidad e incluidas en el análisis de unión de vecinos. P= muestra obtenida del pie y MA= muestra obtenida del músculo aductor. A°= arroyo, P°= paso, R= ruta.

Localidad	N° de muestras	Clado
A° Porongos, R.14	P273, MA273	B
	P279, MA279	B
Río Cuareim, P° Pacheco	P290, MA290	A
Río Arapey, P° del Horno	P314, MA314	B
A° Sopas, P° Corral de Piedra	P317, MA 317	B
Río Daymán, P° del Parque	P321, MA321	B
Laguna marginal, P° Aguiar	P341, MA341	B
A° Sopas, P° Cementerio	P400, MA400	B
	P403, MA403	B

4.3 Resultados y discusión

Siete de las nueve secuencias obtenidas de músculo aductor fueron exactamente iguales a las secuencias de los mismos individuos obtenidas del tejido del pie (Figura 4.1). Dos de ellas (273 y 279) presentaron diferencias en la lectura del cromatograma en dos sitios. En los sitios diferentes, y otros originalmente no detectados por la lectura del secuenciador se observaron dobles picos, lo cual sugiere la posible detección de heteroplasmia en estos dos individuos (Figura 4.2). En la topología observada en el árbol de unión de vecinos en ningún caso se encontraron secuencias de los clados masculino y femenino en el mismo individuo. Por otro lado, la comparación de la morfología de los ejemplares de diferentes clados provenientes de la misma localidad no fue capaz de encontrar diferencias entre ellos.

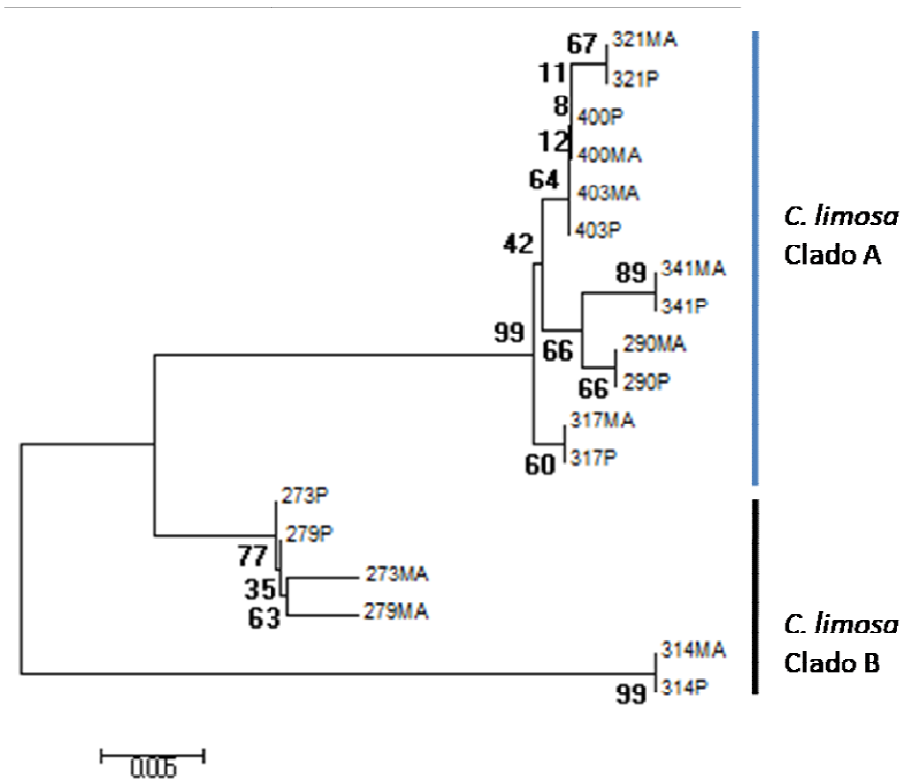


Figura 4.1. Árbol de unión de vecinos basado en el gen COI mitocondrial para las secuencias de *Cyanocyclas limosa* obtenidas de pie (P) y musculo aductor (MA). Los números corresponden al número de catálogo de laboratorio para cada muestra (ver anexo II).

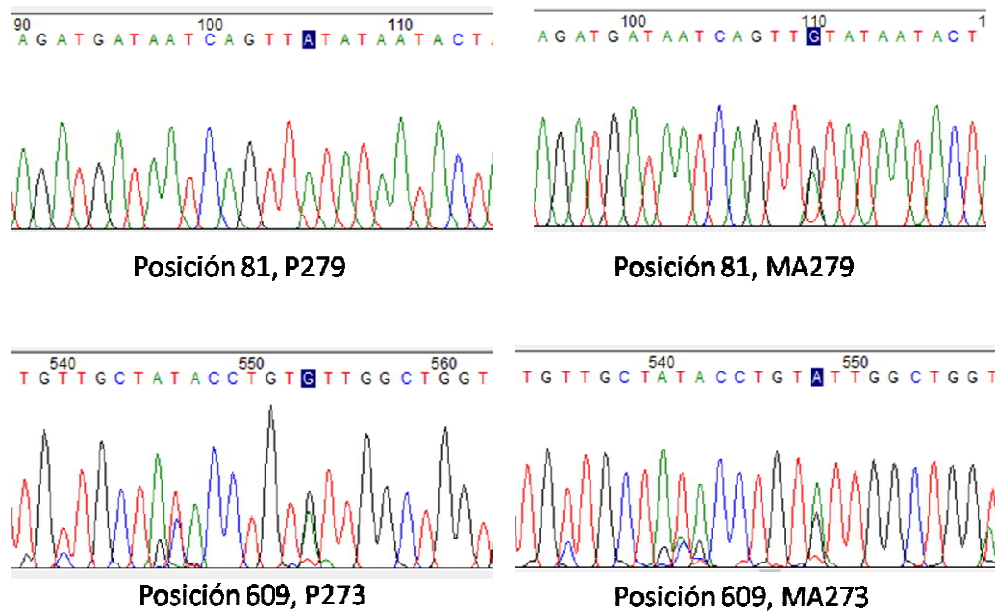


Figura 4.2. Sección de los cromatogramas de los individuos de *Cyanocyclas* 273 y 279 que presentaron diferencias en la lectura del secuenciador.

La distancia pareada para el gen COI entre los clados A y B presentó un valor de 0.039, lo que se puede considerar un valor alto dentro del género, ya que con excepción del par *C. exquisita/C. fortis* se encuentra por encima de las distancias entre especies de la cuenca del Río de la Plata. (Tabla 3.3). Cuando se observa las distancias pareadas dentro de cada grupo el clado A presenta una distancia de 0.005 mientras que el clado B presentó una distancia de 0.021, lo cual representa un valor elevado. Este tipo de datos concuerda con lo observado en casos de doble herencia uniparental, en donde la tasa evolutiva del linaje mitocondrial masculino es mayor debido a un “relajamiento” en la selección (Hoeh *et al.* 2002, Passamonti & Ghiselli 2009).

Los antecedentes de doble herencia uniparental corresponden a especies dioicas donde los linajes mitocondriales se mantienen aislados a través de un mecanismo aún no conocido y asociado a la determinación del sexo (Zouros 2013). Al ingresar las mitocondrias masculinas al óvulo, durante la fecundación, estas son separadas luego hacia un blastómero de la línea germinal que dará lugar a los testículos, mientras que en el resto del cuerpo se mantienen las mitocondrias de origen materno (Cao *et al.* 2004). En el caso de una futura hembra no hay ingreso de mitocondrias masculinas o estas son eliminadas en las primeras etapas del desarrollo y no quedan restos en el individuo, por lo que todas sus mitocondrias corresponden al linaje materno (Cogswell *et al.* 2006).

En base a los resultados encontrados surgen dos posibles hipótesis:

- 1) *Cyanocyclas limosa* presenta una forma hasta ahora no conocida vinculada a su reproducción, de doble herencia mitocondrial donde los dos linajes originalmente asociados al sexo, quedaron aislados en diferentes individuos y en diferentes clados. Si bien al momento no se ha registrado doble herencia uniparental en organismos hermafroditas, se hipotetiza que el origen de este mecanismo haya estado en un hipotético organismo hermafrodita ancestral (Zouros 2013). El mecanismo por el cual un organismo hermafrodita pueda mantener dos linajes de sus progenitores (doble herencia uniparental) es complejo y aún por probar. Pero, de todas maneras, en los resultados obtenidos en el presente análisis, no existe coexistencia en un mismo individuo los dos linajes mitocondriales masculino y femenino. Fenómenos como la

masculinización, la presencia de acinos mixtos como los observados por Ituarte (1986) en *C. limosa* o la compleja determinación del sexo en los bivalvos podrían explicar total o parcialmente este extraño evento.

- 2) Otra posible hipótesis para explicar las diferencias observadas en cuanto al ADN mitocondrial, es que siendo *C. limosa* una especie distribuida ampliamente en la cuenca del Plata, la misma presenta diferentes linajes mitocondriales altamente divergentes resultando en un taxón parafilético. Dichos linajes incluso cohabitan en algunas localidades. Esto es importante en términos de conservación porque se trata de una especie hermafrodita y por lo tanto, esto constituye un mecanismo que incrementa la diversidad genética en este taxón.

La herencia mitocondrial del género *Cyanocyclas* continúa dejando preguntas abiertas por lo que es necesario profundizar los estudios incluyendo herramientas de biología celular así como otros marcadores moleculares con el fin de resolver los mecanismos subyacentes.

Capítulo V

Selección de sitios prioritarios para la conservación de bivalvos dulceacuícolas en Uruguay

5.1 Introducción

Los ecosistemas de aguas continentales a pesar de ocupar sólo un 0.8% de la superficie del planeta tierra, soportan una diversidad biológica alta, alrededor de un 6% de todas las especies conocidas (Dudgeon *et al.* 2006). La disminución de la calidad y cantidad del agua, la modificación del hábitat, la sobreexplotación y las invasiones biológicas representan fuertes amenazas persistentes a nivel global para la diversidad dulceacuícola (Sala *et al.* 2000). De hecho se espera un escenario futuro donde estos ecosistemas experimenten una fuerte presión del cambio de uso de suelo e invasiones biológicas (Sala *et al.* 2000), En especial para los moluscos (Böhm *et al.* 2020). Estas pérdidas se hacen más probables por la vulnerabilidad única de los ecosistemas de agua dulce ya que sirven como receptores, integradores, y a veces transmisores de impactos humanos dentro de sus cuencas de drenaje (Dudgeon 2014). A modo de ejemplo, para Norteamérica, Ricciardi & Rasmussen (1999) estimaron que el promedio de la tasa de extinción de las especies de agua dulce resulta cinco veces superior a las terrestres. En ese contexto, los bivalvos dulceacuícolas están entre los grupos taxonómicos más amenazados en el mundo, con casi el 40% de las especies cerca de la amenaza, amenazados o extintos (Lydeard *et al.* 2004, Lopes-Lima *et al.* 2018). América del Sur, con 168 especies de bivalvos dulceacuícolas registradas (Pereira *et al.* 2014), es el continente con menor conocimiento del estado de conservación de estas especies (Lopes-Lima *et al.* 2018). La existencia de múltiples áreas inexploradas, la falta de definición taxonómica, así como la escasa información sobre distribución geográfica y tamaños poblacionales actuales e historia de vida, restringen la posibilidad de evaluar el grado de amenaza para los bivalvos de agua dulce de América del Sur utilizando los criterios de UICN (Miyahira *et al.* 2017, Torres *et al.* 2018). Con una alta diversidad, enormes vacíos de información y recursos limitados, la conservación de bivalvos dulceacuícolas en América del Sur es una tarea sumamente desafiante.

A pesar de su pequeño tamaño comparativo Uruguay es el tercer país más diverso en bivalvos de agua dulce en América del Sur (Pereira *et al.* 2014). Debido a las presiones que sufre esta fauna en el país, Clavijo & Scarabino (2013) categorizaron el 93% de las especies de bivalvos nativos de Uruguay como amenazados.

Para alcanzar la conservación de una especie es necesario eliminar o limitar las amenazas sobre la misma. Con el fin de cumplir ese objetivo se pueden establecer áreas donde las amenazas sean manejadas, de forma de restringir sus impactos negativos, mediante regulaciones, educación y control. La creación de áreas protegidas es una de las estrategias más utilizadas para la conservación de la biodiversidad (Chape *et al.* 2005). Sin embargo los ambientes de aguas continentales están pobremente representados en los sistemas nacionales de áreas protegidas a nivel mundial (Abell *et al.* 2017). Estudios recientes indican que además de ser escasas, las áreas protegidas no son efectivas al cumplir con su objetivo de conservar la biodiversidad de agua dulce (Acreman *et al.* 2019). La falta de efectividad se atribuyó a muchos factores antropogénicos, incluida la pesca (a menudo con falta de cumplimiento de la ley), el manejo del agua (extracción, represas y regulación del flujo), la degradación del hábitat y las especies invasoras (Acreman *et al.* 2019). Según Chessman (2013) las reservas deben ser diseñadas y manejadas específicamente para especies de agua dulce para que sean más efectivas en su conservación.

En Uruguay, el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) incluye como criterio para su selección de áreas prioritarias a las especies de bivalvos dulceacuícolas prioritarios para la conservación (Soutullo *et al.* 2010). Sin embargo, no se ha logrado que en las áreas protegidas establecidas estas especies cuenten con planes de manejo específicos que colaboren directamente con su conservación.

Una manera de poder generar espacios de conservación para grupos de especies poco carismáticas y con necesidades particulares de conservación es la propuesta de sitios de conservación específicos. Un ejemplo de esta estrategia es la creación de Sitios Importantes para la Conservación de los Murciélagos (SICOMs), generada en 2011 por La Red Latinoamericana para la Conservación de los Murciélagos (RELCOM). En la actualidad este protocolo le da una figura técnica a determinados sitios de conservación y estimula la creación de figuras legales de protección a nivel local, con especial foco en los murciélagos. Un insumo necesario para implementar una estrategia similar para aplicarla en bivalvos dulceacuícolas, es el establecimiento de criterios y parámetros necesarios para identificar sitios prioritarios.

Para evaluar la integridad ecológica de la comunidad de bivalvos del Estado de Illinois (Estados Unidos), Szafoni (2001) creó un índice comunitario de bivalvos basado en el número de especies nativas, la captura por unidad de esfuerzo, el número de especies con reclutamiento y el número de especies raras. El objetivo de este capítulo es establecer un índice comunitario de bivalvos dulceacuícolas para Uruguay siguiendo el enfoque de Szafoni (2001) y aplicarlo para la selección de sitios para prioritarios su conservación que permita la conservación de las especies del género *Cyanocyclas*.

5.2 Materiales y métodos

El presente estudio se basa en datos que provienen del muestreo (entre 2015 y 2018) de 100 sitios distribuidos de forma uniforme en todas las cuencas del Uruguay. En cada localidad se realizó un esfuerzo de una hora con el método de “pies y manos” (Smith 2006). Los ejemplares recolectados vivos fueron identificados, medidos con calibre (0.01 mm) y posteriormente todos los individuos de especies nativas fueron devueltos al agua con la excepción de ejemplares *vaucher* que fueron depositados en el Museo Nacional de Historia Natural.

Para la construcción del índice, siguiendo a Szafoni (2001) fueron consideradas cuatro variables obtenidas a nivel de sitio muestreado (ver tabla 5.2):

- a) Riqueza específica de ensamble de bivalvos: número de especies de bivalvos de cada localidad.
- b) Captura por unidad de esfuerzo: número total de individuos de especies nativas capturados en una hora de muestreo.
- c) Número de especies reclutando: número de especies con al menos un ejemplar que cumpla con las siguientes condiciones: para las especies de las familias Hyriidae y Mycetopodidae se consideró que un ejemplar era recluta si medía menos de tres centímetros de largo, mientras que para la familia Cyrenidae un recluta medía menos de un centímetro de alto.
- d) Número de especies raras: las especies raras fueron definidas como aquellas registradas en menos del 10% de las localidades y que además representaran menos del 1% del total de los individuos capturados durante los muestreos (Tabla 5.1).

Cada variable fue dividida en cinco categorías iguales para el rango total, estableciéndose valores parciales para el Índice Comunitario de Bivalvos (ICBD) de 1 a 5. Finalmente el valor total del ICBD se calculó como la sumatoria de las variables categorizadas.

5.3 Resultados

En total se capturaron 4724 individuos, pertenecientes a 27 especies (Tabla 5.1). Dos especies, *Anodontites* sp. y *Diplodon* sp., no pudieron ser asignadas a ninguna de las especies válidas conocidas de Uruguay, por lo que se trataron a nivel genérico. En 27 localidades de las 100 relevadas no se registraron ejemplares de especies nativas de bivalvos por lo que el valor del ICBD fue 0 (Figura 5.2).

Tabla 5.1. Especies de bivalvos dulceacuícolas registradas en 107 localidades de Uruguay, con detalle del número de localidades e individuos capturados por especie en el total del muestreo nacional. Se indican además las especies reclutando y las consideradas raras.

Especie	N° individuos	N° localidades	Reclutando	Rara
<i>Anodontites sp.</i>	6	3		Sí
<i>A. elongatus</i>	1	1		Sí
<i>A. ferrarisii</i>	3	3		Sí
<i>A. lucidus</i>	8	6	Sí	Sí
<i>A. patagonicus</i>	156	29	Sí	
<i>A. tenebricosus</i>	18	10		Sí
<i>A. trapesialis</i>	310	25	Sí	
<i>A. trapezeus</i>	13	5	Sí	Sí
<i>Castalia ambigua</i>	4	2	Sí	Sí
<i>C. psammoica</i>	2	1	Sí	Sí
<i>Cyanocyclus fortis</i>	26	1	Sí	Sí
<i>C. limosa</i>	156	11	Sí	
<i>Diplodon sp.</i>	840	4	Sí	
<i>D. delodontus</i>	635	15	Sí	
<i>D. guaranianus</i>	3	1	Sí	Sí
<i>D. parallelopipedon</i>	470	21	Sí	
<i>D. pilsbryi</i>	4	1		Sí
<i>D. rhuacoicus</i>	108	10	Sí	
<i>D. uruguayensis</i>	14	3	Sí	Sí
<i>Monocondylaea corrientesensis</i>	49	13	Sí	
<i>M. minuana</i>	72	20	Sí	
<i>Musculium argentinum</i>	5	2		Sí
<i>Mycetopoda legumen</i>	14	8		Sí
<i>M. siliquosa</i>	9	7		Sí
<i>Rhipidodonta burroughiana</i>	1	1	Sí	Sí
<i>R. charruana</i>	1792	46	Sí	
<i>R. peraeiformis</i>	8	5		Sí
TOTAL	4724	73	18 spp.	17 spp.

La riqueza en las localidades estudiadas presentó un rango desde cero a diez especies, por lo que el valor parcial del ICBF subió un punto cada dos especies registradas. La riqueza promedio fue de 2.5 considerando el total de las localidades y de 3.5 si solo se considera las localidades que tenían especies nativas. La especie más frecuente fue *Diplodon charruana* (presente en 46 localidades), seguida de *Anodontites patagonicus* (29) y *A. trapesialis* (25). De las 27 especies registradas 19 estuvieron presentes en 10 o menos localidades. *Cyanocyclus fortis*, *Castalia psammoica*, *Rhipidodonta burroughiana*, *Diplodon guaranianus* y *D. pilsbryi* estuvieron presentes en una localidad (Tabla 5.1).

La captura por unidad de esfuerzo (1h/hombre) varió entre cero y 643 (Figura 5.1). El registro de 643 individuos se dio en una laguna costera y representó el 176 % de la captura del sitio inmediatamente siguiente, por lo que no fue considerado para fijar las categorías. El valor parcial del ICBD para la CPUE se categorizó en cinco intervalos de 75 ejemplares (Tabla 5.2). El promedio de ejemplares recolectados fue de 47.3 individuos para el total de las localidades y de 64.8 para las localidades con presencia de bivalvos nativos. La especie más abundante fue *Rhipidodonta charruana* con 1792 individuos lo que representa el 37.9% del total de los individuos recolectados. El resto de las especies presentaron abundancias muy menores, de 19 especies se colectaron menos de cien ejemplares.

De las 27 especies registradas 18 presentaron reclutas (Tabla 5.1). En 44 localidades se registró al menos una especie reclutando (Figura 5.1). El número de especies con reclutas por localidad presentó un rango de cero a nueve. Dado que el registro de nueve especies reclutando se dio en una localidad que representó el 300% de su seguidora inmediata, este valor no fue considerado para la categorización. Los intervalos para este subindicador quedaron definidos cada una especie (Tabla 5.2).

En base a la definición establecida en la metodología y los resultados de las colectas, las especies raras resultaron aquellas que estuvieron presentes en menos de diez localidades y de las que no se encontraron más de 47 ejemplares. En total 17 especies fueron comprendidas en esta categoría (Tabla 5.1). El número de especies raras varió entre cero y seis, por lo que los intervalos fueron fijados cada una especie (Figura 5.1). Solo 34 localidades presentaron especies raras con un promedio de 1.8 especies por localidad. Si se toma en cuenta el total de las localidades ese promedio baja a 0.6 especies por localidad.

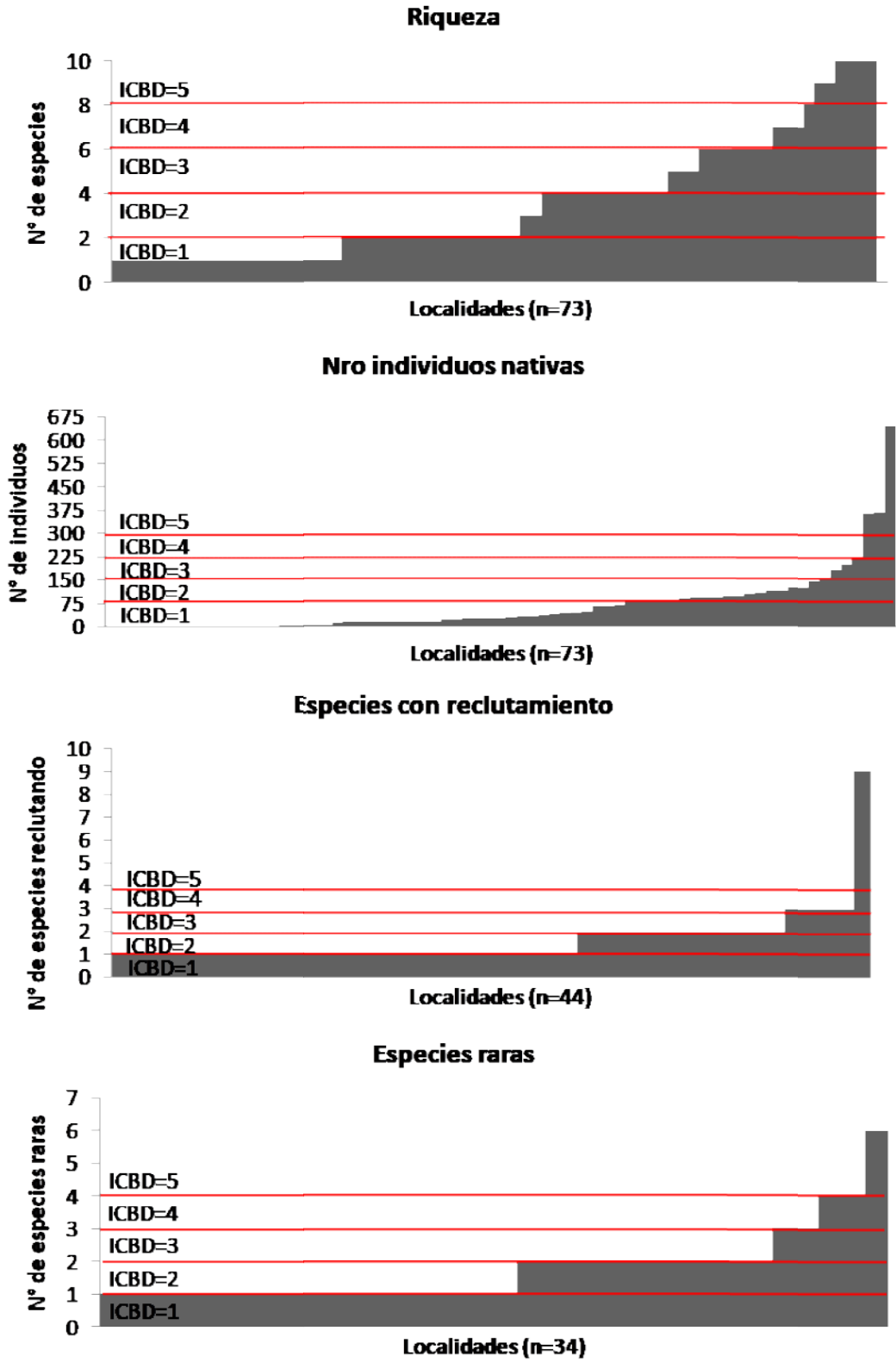


Figura 5.1. Histogramas de los valores parciales de cada uno de las variables del ICBD en las localidades uruguayas con registros de bivalvos nativos. En rojo se señalan los límites de las categorías (ver además Tabla 5.2).

El valor del ICBD para los sitios estudiados varió entre 0 y 16 de un máximo posible de 20 (Figura 5.2 y 5.3). El promedio para todos los sitios fue de 3.7 mientras que para los sitios con presencia de bivalvos fue de 5.1.

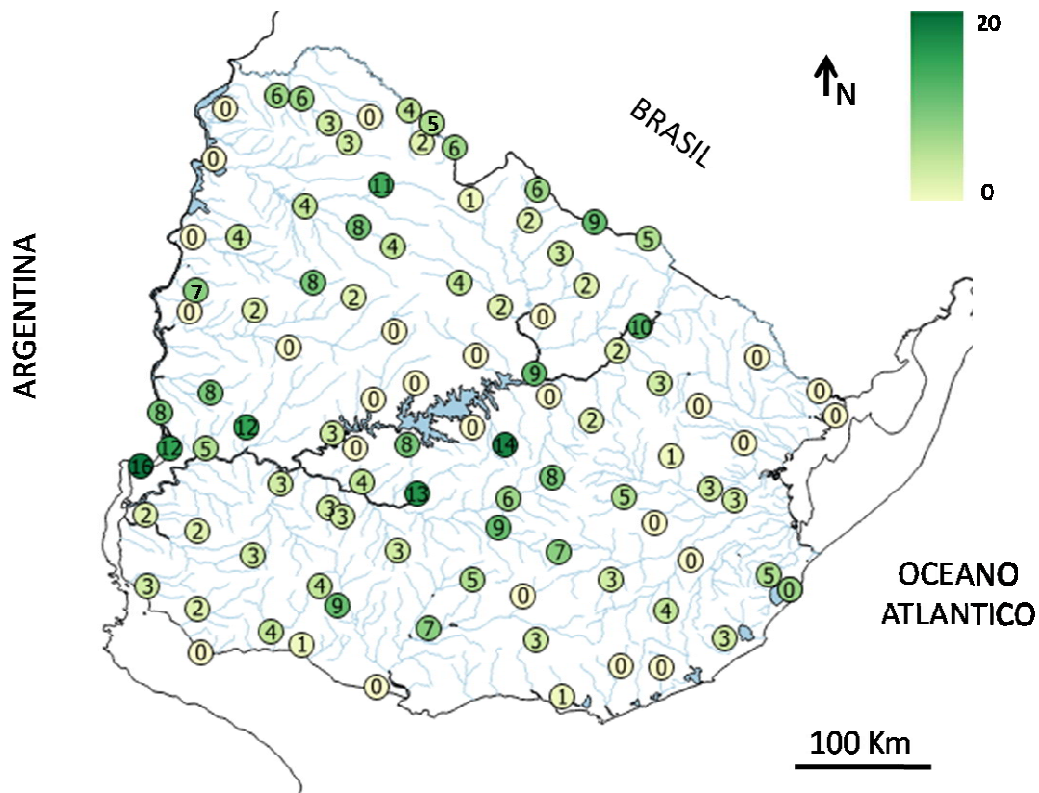


Figura 5.2. Valor del Índice Comunitario de Bivalvos (ICBD) para cada uno de los 100 sitios estudiados en Uruguay. A mayor valor del índice más prioridad para la conservación.

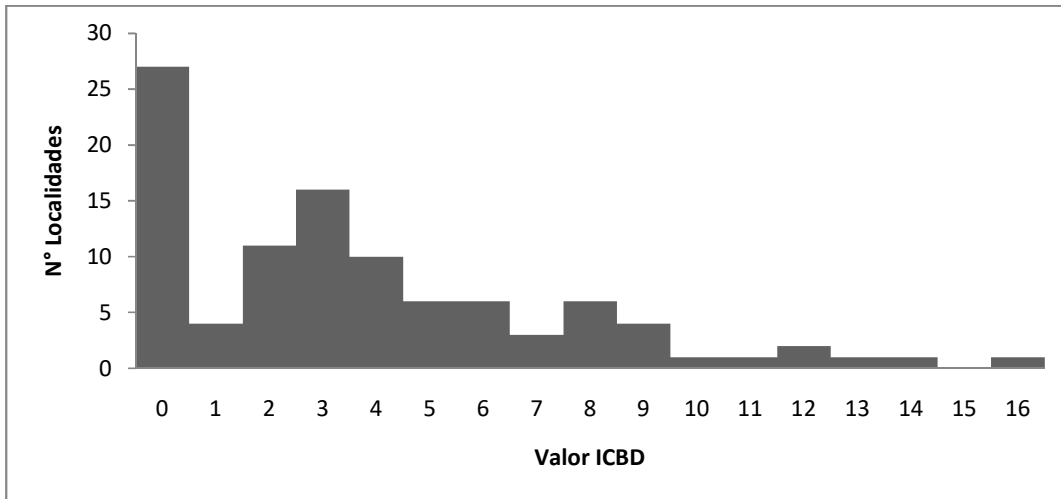


Figura 5.3. Histograma de frecuencia para los valores del ICB para las 100 localidades uruguayas estudiadas.

Tabla 5.2. Valores parciales para cada atributo del ICB para Uruguay. A las localidades sin bivalvos nativos les corresponde un valor de 0 en todos los atributos. Las localidades sin especies reclutando o especies raras les corresponde un valor de 0 en esos atributos.

Atributo	Valor atributo	Valor parcial ICB
Riqueza	1-2	1
	3-4	2
	5-6	3
	7-8	4
	≥9	5
CPUE	1-75	1
	76-150	2
	151-225	3
	226-300	4
	≥301	5
N° de especies reclutando	1	1
	2	2
	3	3
	4	4
	≥5	5
N° de especies raras	1	1
	2	2
	3	3
	4	4
	≥5	5

5.4 Discusión

Durante este estudio se registraron 27 de las 43 especies nativas de bivalvos registradas en Uruguay por Clavijo & Scarabino (2013). El hecho de no haber registrado bivalvos en 27 localidades contrasta con la concepción histórica de que todos los cuerpos de agua del Uruguay tienen presencia de bivalvos (Figueiras 1965).

En los siete sitios que tuvieron un ICBD igual o mayor a 10 (Tabla 5.3) se encuentran 23 de las 27 especies registradas durante los muestreos. De estos siete sitios tres contienen poblaciones de *Cyanocyclus limosa* (Blanquillo, Mazangano y Yaguareté), en dos se registró un ejemplar (Horno y Tomás Cuadra) y en otro existía una población hasta al menos 2012 (Don Esteban). En especial la bahía de Yaguareté contiene poblaciones de *C. fortis*, *C. limosa* y es el último lugar de donde hay registros de *C. exquisita* y *C. paranensis*. La única localidad con registro actual de *Cyanocyclus* sp. no fue muestreada de forma sistemática para los otros bivalvos por lo que no fue incluida en este capítulo, sin embargo se sugiere incluir esa localidad en la red ya que además de contar con la única población conocida de esta especie cuenta con una alta diversidad de otras especies de bivalvos. Se propone este grupo de ocho sitios como inicio de una red que proteja la biodiversidad de especies de bivalvos dulceacuícolas de Uruguay.

Tabla 5.3. Sitios uruguayos con ICBD mayor o igual a 10.

Localidad	Valor ICBD	Sub-Cuenca
Bahía de Yaguareté	16	Río Uruguay, A° Negro
A° Blanquillo	14	Río Negro medio
A° Tomás Cuadra	13	Río Yi
A° Don Esteban	12	Río Negro Bajo
A° Yeguada	12	Río Uruguay, A° Negro
Río Arapey, Paso del Horno	11	Río Arapey
Río Negro, Paso Mazangano	10	Río Negro alto

Las acciones necesarias para implementar la conservación de estos sitios por tratarse de una escala acotada se consideran más viables. La disposición de comunidades locales y partes interesadas para apoyar la restauración puede ser fundamental a la hora de plantear sitios de conservación a pequeña escala (Geist, 2015). Para las localidades situadas en arroyos

se recomienda limitar el ingreso de ganado y personas para evitar el pisoteo y la resuspensión de sedimentos así como regular el uso de la cuenca y controlar las especies exóticas invasoras. Para las localidades del río Uruguay, por tratarse de un río de gran cuenca, las acciones se limitaran a restringir el ingreso de ganado y personas y controlar las especies exóticas invasoras. Todo esto deberá estar asociado a la producción de material de información y concientización así como acciones de educación ambiental en las poblaciones ribereñas.

El ICBD constituye una herramienta potencial para utilizar a los bivalvos dulceacuícolas como indicadores biológicos ya que permite evaluar de forma objetiva y comparable el estado de la comunidad, y monitorear las modificaciones que puedan ocurrir en el tiempo.

La metodología aquí propuesta es simple, basada en cuatro características fácilmente obtenibles y claves para la conservación. Además este índice es potencialmente implementado en cualquier región del mundo basado en datos locales o escalable a nivel continental o global.

Capítulo VI

Conclusiones y perspectivas

6.1 Taxonomía del género *Cyanocyclus*

Aún con estudios detallados la comprensión de las entidades específicas en el género *Cyanocyclus* continúa siendo un gran desafío. Luego de los análisis de esta tesis se pueden validar las especies *Cyanocyclus limosa*, *Cyanocyclus paranensis*, *Cyanocyclus fortis*, *Cyanocyclus exquisita* y *Cyanocyclus guahybensis*, a lo que habrá que sumarle una especie más aún sin describir proveniente del río Tacuarí. Es importante destacar que no se han podido encontrar ejemplares vivos de *Cyanocyclus felipponei* y que la extracción de ADN de ejemplares provenientes de museo fue infructuosa.

6.2 Herencia mitocondrial en el género *Cyanocyclus*

La herencia mitocondrial del género *Cyanocyclus* es compleja. *Cyanocyclus limosa* presenta dos linajes distantes resultando una especie parafilética. La topología de árboles obtenida así como la red de haplotipos puede ser explicada mediante la segregación de linajes mitocondriales diferentes asociado a las complejas formas de reproducción o a la alta divergencia de estos linajes debido a su amplia distribución.

6.3 Conservación de *Cyanocyclus* en Uruguay

El estado de conservación de las especies del género *Cyanocyclus* es dispar (Tabla 6.1). *Cyanocyclus limosa* se registró en 16 localidades, algunas con cientos de individuos, *C. fortis*, *C. guahybensis* y *Cyanocyclus* sp. en una localidad. Para *C. exquisita* y *C. paranensis* no se han vuelto a registrar ejemplares. La reducción en la distribución registrada por (Clavijo & Carranza 2018) aún continúa en proceso ya que de las ocho localidades revisitadas *Cyanocyclus* desapareció en seis.

Tabla 6.1. Estado de conservación de las especies de *Cyanocyclus* presentes en Uruguay.

Especie	N° de localidades	Estado de las poblaciones en Uruguay	Observaciones
<i>C. limosa</i>	16	Varias poblaciones han desaparecido recientemente (2008-2019, ver capítulo V). Es probable que existan otras poblaciones dada su distribución histórica en toda la cuenca baja y media del río Uruguay.	
<i>C. guahybensis</i>	1	Una población con cientos de individuos en sitio con presencia de <i>Corbicula</i> y uso recreativo. Es posible la existencia de otras poblaciones en la cuenca de la laguna Merín.	Tres poblaciones conocidas de Brasil (visitadas en 2013)
<i>Cyanocyclus</i> n sp.	1	Una población con cientos de individuos. Desaparición o disminución drástica reciente de una población en zona de extracción de áridos. Ambos sitios con uso recreativo y presencia de <i>Corbicula</i> .	
<i>C. fortis</i>	1	Una población con cientos de individuos en zona de uso industrial.	Nueva población descubierta en margen argentina del río Uruguay González-Bergonzoni com. pers.
<i>C. exquisita</i>	Sin registros recientes	No se han vuelto a encontrar desde 2012.	
<i>C. paranensis</i>	Sin registros recientes	No se ha vuelto a registrar desde 2009 donde había sido encontrado un ejemplar luego de 30 años sin registros.	
<i>C. felipponei</i>	Sin registros recientes	Sin registros recientes. Ultimo registro 1968.	

De los siete sitios con valor más alto del índice de conservación de bivalvos tres contienen poblaciones de *Cyanocyclus limosa* (Blanquillo, Mazangano y Yaguareté), en dos se registró un ejemplar (Horno y Tomás Cuadra) y en otro existía una población hasta al menos 2012 (Don Esteban). En especial la bahía de Yaguareté contiene poblaciones de *C. fortis*, *C. limosa* y es el último lugar de donde hay registros de *C. exquisita* y *C. paranensis*. La conservación efectiva de esta red de sitios permitirá al menos tener una representación de especies de bivalvos del Uruguay. El último registro de *Cyanocyclus felipponei* data de 1968 y de confirmarse su validez como especie sería el primer caso de extinción de un bivalvo dulceacuícola de América del Sur.

6.4 Perspectivas

- Realizar la gestión ante SNAP, intendencias, municipios, para la conservación de los sitios prioritarios identificados.
- Continuar con la búsqueda de ejemplares vivos de *Cyanocyclus felipponei* con el fin de estudiarlos anatómicamente y molecularmente.
- Ampliar la búsqueda de poblaciones de *Cyanocyclus guahybensis* en el territorio uruguayo de la cuenca de la laguna Merín.
- Describir la especie asignada a los ejemplares de *Cyanocyclus* provenientes del río Tacuarí.
- Continuar con la exploración de localidades similares a la bahía de Yaguareté en el bajo río Uruguay y Río Negro con el fin de hallar poblaciones de *Cyanocyclus*.
- Revisitar periódicamente las localidades con registro de *Cyanocyclus*.
- Testear la interacción entre especies de Cyrenidae nativos y exóticos.
- Investigar los posibles vectores de dispersión de *Cyanocyclus*.
- Profundizar los estudios en los mecanismos reproductivos en estos organismos hermafroditas que permitan explicar las incongruencias filogenéticas detectadas en el marcador mitocondrial utilizado, así como corroborar la posible existencia de heteroplasmia.
- Mantenimiento de las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural (Montevideo) y la colección de tejidos y ADN de la sección genética evolutiva (Facultad de Ciencias, UdelaR).

Bibliografía

- Abell R, B Lehner, M Thieme & S Linke. 2017. Looking Beyond the Fenceline: Assessing Protection Gaps for the World's Rivers. *Conservation Letters* 10(4): 384–394.
- Acreman M, K Hughes, A Arthington, D Tickner & M Dueñas. 2019. Protected areas and freshwater biodiversity: A novel systematic review distils eight lessons for effective conservation. *Conservation Letters* 13: e12684.
- Amestoy F & M Spinetti. 1989. Contribución al conocimiento del macrobentos del Río Uruguay. *Boletín Sociedad Zoológica del Uruguay* 5:41-42.
- Avice JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Bandelt H-J, P Forster & A Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48.
- Baraibar BC. 1961 (“1960”). Estudio sobre *Corbicula limosa* (Maton). En: Actas y trabajos del Primer Congreso Sudamericano de Zoología 2:2-13.
- Böhm, M., Dewhurst-Richman, N.I., Seddon, M. et al. 2020. The conservation status of the world’s freshwater molluscs. *Hydrobiologia* <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04385-w>
- Bonetto AA & DH Di Persia. 1975. Las poblaciones de pelecípodos del arroyo Ayuí Grande (Provincia de Entre Ríos) y los factores que regulan su distribución y estructura. *Ecosur* 2(3): 123-151.
- Bonetto AA & I Ezcurra. 1962. Contribución al conocimiento limnológico de la laguna Setubal (Fauna de fondo: Porifera y Mollusca). *Anales Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino* 1(3): 19+-28.
- Bonetto AA & MP Tassara. 1987. Contribución al conocimiento limnológico de moluscos pelecípodos en la Cuenca del Plata, con particular referencia a sus relaciones tróficas. *Ecosur* 14-15(25/26): 17-54.
- Breton S & H Doucet-Beaupré, D Stewart, W Hoeh & P Blier. 2007. The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: Isn’t one enough?. *Trends in genetics* 23: 465-74.
- Cao L, E Kenchington & E Zouros. 2004. Differential segregation patterns of sperm mitochondria in embryos of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Genetics* 166: 883–894
- Chape S, J Harrison, M Spalding & I Lysenko. 2005. Measuring the extent and effectiveness of protected areas as an indicator for meeting global biodiversity targets *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 443-455.

- Chessman BC. 2013. Do protected areas benefit freshwater species? A broad-scale assessment for fish in Australia's Murray-Darling Basin. *Journal of Applied Ecology* 50: 969-976.
- Clavijo C. 2014. Diversidad de Corbiculidae (Mollusca, Bivalvia) en Uruguay. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA, Uruguay. 122 pp.
- Clavijo C & A Carranza. 2018. Critical reduction of the geographic distribution of *Cyanocyclas* (Cyrenidae Bivalvia) in Uruguay. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 2018: 1-4.
- Clavijo C, A Carranza, F Scarabino & A Soutullo. 2010. Conservation priorities for uruguayan land and freshwater molluscs. *Tentacle* (18): 14-16.
- Clavijo C & F Scarabino. 2013. Moluscos continentales. Pp. 73-90, en: Soutullo A, C Clavijo & JA Martínez-Lanfranco (eds.). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. SNAP/DINAMA/MVOTMA y DICYT/MEC, Montevideo. 222 pp.
- Cogswell AT, ELR Kenchington & E Zouros. 2006. Segregation of sperm mitochondria in two and four-cell embryos of the blue mussel *Mytilus edulis*: implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* 49: 799-807
- Deshayes GP. 1854. Veneridæ, Cyprinidæ and Glauconomidæ. Catalogue of the Conchifera or Bivalve Shells in the Collection of the British Museum part 1: 1-216.
- d'Orbigny A. 1835. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, In suo per Americam meridionalem itinere. *Magasin de Zoologie* 5(61-62): 1-44.
- Dudgeon D, A Arthington, M Gessner, Z Kawabata, D Knowler, C Leveque, R Naiman, A Prieur-Richard, D Soto, M Stiassny & C Sullivan. 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81: 163-182.
- Dudgeon D. 2014. Accept no substitute: Biodiversity matters. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 24: 435-440.
- Farias IP, G Ortí, I Sampaio, H Schneider & A Meyer. 2001. The Cytochrome b Gene as a Phylogenetic Marker: The Limits of Resolution for Analyzing Relationships Among Cichlid Fishes. *Journal of Molecular Evolution* 53: 89-103.
- Figueiras A. 1965. La malacofauna dulceacuícola del Uruguay, ensayo de catálogo sistemático y sinonímico: Parte II (Pelecypoda). *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 1(8): 223-270.
- Focht T & IL Veitenheimer-Mendes. 2001. Distribuição sazonal e reprodução de *Neocorbicula limosa* (Maton) (Bivalvia, Corbiculidae) no Lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 18(1): 35-43.
- Folmer O, M Black, R Lutz & R Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.

- Frankham R, JD Ballou & DA Briscoe. 2008. Fundamentos de genética da conservação. Editora Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, São Paulo. 280 pp.
- Garces LMMP, MCD Mansur & JW Thomé. 1989. Contribuição à conchiliometria de *Neocorbicula limosa* (Maton, 1811) (Bivalvia, Corbiculidae). Revista Brasileira de Zoologia 6(3): 507-516.
- Gascuel O. 1997. BIONJ: An Improved Version of the NJ Algorithm Based on a Simple Model of Sequence Data. Molecular biology and evolution 14(7): 685-695.
- Geist J. 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): a synthesis of Conservation Genetics and Ecology. Hydrobiologia (2010): 644:69–88.
- Geist J. 2015. Seven steps towards improving freshwater conservation. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 25: 447-453.
- Haag WR. 2012. North American freshwater mussels: natural history, ecology, and conservation. Cambridge University Press. 505 pp.
- Hebert PDN, A Cywinska, SL Ball & JR deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society 270: 313-321.
- Hoeh WR, DT Stewart, BW Sutherland & E Zouros. 1996. Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). Evolution 50: 2276-2286.
- Hoeh WR, DT Stewart & SI Guttman. 2002. High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea). Evolution 56: 2252-2261.
- Howard JK & KM Cuffey, 2006. The functional role of native freshwater mussels in the fluvial benthic environment. Freshwater Biology 51: 460–474.
- Ituarte CF. 1984. El fenómeno de incubación branquial en *Neocorbicula limosa* (Maton, 1809) (Mollusca Pelecypoda). Neotrópica 30(83): 43-54.
- Ituarte CF. 1986. Contribución al conocimiento de la biología reproductiva de *Neocorbicula limosa* (Maton, 1809) (Mollusca Pelecypoda). Anales de la Sociedad Científica Argentina 214(47): 1-27.
- Lanzer RM & A Schafer. 1985. Padrões de distribuição de moluscos dulcícolas nas lagoas costeiras do sul do Brasil. Revista Brasileira de Biologia, 45(4):535-545.
- Larrañaga DA. 1923. Escritos de don Dámaso Antonio Larrañaga. Tomo II. Imprenta Nacional, Montevideo. 511 pp.
- Lee T, S Siripattawan, CF Ituarte & D Ó Foighil. 2005. Invasion of the clonal clams: *Corbicula* lineages in the New World. American Malacological Bulletin 20 (1/2): 113-122.

- Librado P & J Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lopes-Lima M, LE Burlakova, AY Karatayev, et al. 2018. Conservation of freshwater bivalves at the global scale: diversity, threats and research needs. *Hydrobiologia* 810 (1): 1-14.
- Lydeard Ch, RH Cowie, WF Ponder, AE Bogan, P Bouchet, SA Clark, KS Cumimngs, TJ Frest, O Gargominy, DH Herbert, R Hershler, KE Perez, B Roth, M Seddon, EE. Strong & FG Thompson. 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience* 54 (4): 321-330.
- Mace GM. 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical transaction of the Royal Society B* 359(1444) : 711-719.
- Mansur MCD & LMMP Garces. 1988. Ocorrência e densidade de *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) e *Neocorbicula limosa* (Maton, 1811) na Estação Ecológica do Taim e áreas adjacentes, Rio Grande do Sul, Brasil (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae). *Iheringia. Série Zoologia*, Porto Alegre 10(68): 99-115.
- Marshall WB. 1924. New Uruguayan mollusks of the genus *Corbicula*. *Proceedings of the United States National Museum* 66(2552): 1-14.
- Marshall WB. 1927. New species of mollusks of the genus *Corbicula* from Uruguay and Brazil. *Proceedings of the United States National Museum* 72(2699): 1-7.
- Martínez S & A Rojas. 2004. Quaternary continental molluscs from Northern Uruguay: distribution and paleoecology. *Quaternary International* , 114:123-128.
- Maton WG. 1811 ("1809"). Description of seven new species of Testacea. *Transactions of the Linnean Society of London* 10: 325-332.
- Medrano JF, E Aasen & L Sharrow. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8: 43.
- Miyahira IC, SB Santos Sonia & MC Mansur. 2017. Freshwater mussels from South America: state of the art of Unionida, specially Rhipidodontini. *Biota Neotropical*, 17(4): e20170341.
- Nei M & S Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 333 pp.
- Olazarri J. 1966. Los moluscos de agua dulce del depto. de Colonia, Uruguay. Parte I: Pelecypoda. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 2(11): 15-37.
- Olazarri J. 1968. Notas sobre *Neocorbicula*. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 2(14):243-244
- Park JK & D Ó Foighil. 2000. Sphaeriid and Corbiculid Clams Represent Separate Heterodont Bivalve Radiations Into Freshwater Environments. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14(1): 75-88.

- Parodiz JJ. 1963. La extraordinaria fauna del río Uruguay y sus relaciones. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 1(5): 103-110.
- Parodiz JJ. 1969. The tertiary non-marine mollusca of South America. *Annals of Carnegie Museum* 40: 1-242.
- Parodiz JJ & L Hennings. 1965. The *Neocorbicula* (Mollusca Pelecypoda) of the Paraná-Uruguay basin, South America. *Annals of the Carnegie Museum* 38(3): 69-96.
- Passamonti M & F Ghiselli. 2009. Doubly uniparental inheritance: two mitochondrial genomes, one precious model for organelle DNA inheritance and evolution. *DNA Cell Biology* 28: 79-89.
- Pereira D, MC Dreher Mansur, LDS Duarte, A Schramm de Oliveira, D Mansur Pimpão, C Tasso Callil, C Ituarte, E Parada, S Peredo, G Darrigran, F Scarabino, C Clavijo, G Lara, IC Miyahira & C Lasso. 2014. Bivalve distribution in hydrographic regions in South America: historical overview and conservation. *Hydrobiologia* 735(1): 15-44.
- Perez LP, SG Iturrería & M Griffin. 2010. Paleocological and paleobiogeographic significance of two new species of bivalves in the Paraná Formation (Late Miocene) of Entre Ríos Province, Argentina. *Malacologia* 53(1): 61-76.
- Pilsbry HA. 1896. New species of fresh water mollusks from South America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 48: 561-565.
- Purvis A & T Garland. 1993. Polytomies in comparative analyses of continuous characters. *Systematic Biology* 42: 569-575.
- Ricciardi A & JB Rasmussen. 1999. Extinction rates of North American freshwater fauna. *Conservation Biology* 13: 220-222.
- Saitou N & M Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sala O, FS Chapin III, JJ Armesto, Berlow E, J Bloomfield, RH Dirzo, E Huber-Sannwald, L Huenneke, R Jackson, AP Kinzig, R Leemans, D Lodge, MH Mooney, M Oesterheld, N Poff, M Sykes, B Walker, M Walker, D Wall. 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287(5459): 1770-1777.
- Scarabino F. 2004. Conservación de la malacofauna uruguaya. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 8(82-83): 267-273.
- Scarabino F & MC Mansur. 2008 ("2007"). Lista sistemática de los Bivalvia dulciacuícolas vivientes de Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 9(90): 89-99.
- Scarabino F & C Clavijo. 2009. Especies de moluscos prioritarias para la conservación. *In: Soutullo, A., E. Alonso, D. Arrieta, R. Beyhaut, S. Carreira, C. Clavijo, J. Cravino, L. Delfino, G. Fabiano, C. Fagundez, F. Haretche, E. Marchesi, C. Passadore, M. Rivas, F. Scarabino, B. Sosa, N. Vidal. Especies Prioritarias para la conservación en Uruguay. Serie de informes (16), 93 pp. Available in: <http://www.snap.gub.uy/dmdocuments/spsweb.pdf>*

- Simone LRL. 2006. Land and freshwater molluscs of Brazil. EGB, FAPESP, São Paulo, 390 pp.
- Smith DR. 2006. Survey design for detecting rare freshwater mussels. *Journal of North American Benthological Society* 25(3): 701-711.
- Soutullo A, L Bartesaghi, P Berazategui, C Clavijo, I Díaz, C Faccio, M García & E González. 2010. Diseño espacial del Sistema Nacional de Áreas Protegidas de Uruguay: sitios a integrar al sistema, prioridades de conservación en esos sitios y aportes a la protección de la biodiversidad fuera de áreas protegidas. 50 pp. Proyecto "Fortalecimiento del proceso de implementación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas de Uruguay" (URU 06/G34) - DINAMA/MVOTMA-PNUD/GEF.
- Szafoni RE. 2001. Protocol for integrating freshwater mussel surveys into IDNR / IEPA stream basin surveys. Version 2.0. IDNR/ORC/Natural Heritage, Charleston, IL. 5pp.
- Tamura K & M Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tamura K, G Stecher, D Peterson, A Filipski & S Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*,30: 2725-2729.
- Thompson JD, TJ Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin & DG Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 25(24): 4876.
- Torres S, L Cao, DE Gutierrez Gregoric, M de Luciana, F Brea, G Darrigran. 2018. Distribution of the Unionida (Bivalvia, Paleoheterodonta) from Argentina and its conservation in the Southern Neotropical Region. *PLoS ONE* 13(9):e0203616.
- Torres-Florez JP, WE Johnson, MF Nery, E Eizirik, MA Oliveira-Miranda & PM Galetti. 2017. The coming of age of conservation genetics in Latin America: what has been achieved and what needs to be done. *Conservation Genetics* 19: 1-15.
- UICN. 2012. Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. vi + 34pp.
- Veitenheimer-Mendes IL & J Olazarri. 1983. Primeros registros de *Corbicula* Megerle, 1811 (Bivalvia, Corbiculidae) para el Río Uruguay. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 1: 50-53.
- Zelaya D & C Marinone. 2012. A case of phoresis of sphaeriids by corixids: First report for the America. *Malacologia* 55(2): 363-367.
- Zouros E, KR Freeman, AO Ball & GH Pogson. 1992. Direct evidence for paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359: 412-414.
- Zouros E, A Oberhauser Ball, C Saavedra & KR Freeman. 1994. An unusual type of mitochondrial-DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of National Academy of Sciences U. S.A.* 91: 7463-7467.

Zouros E. 2013. Biparental Inheritance Through Uniparental Transmission: The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of Mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology* 40:1-31.

Anexo I. Localidades y coordenadas de los puntos de colecta. Aº= Arroyo, Pº= Paso.

Localidad	Departamento	Latitud	Longitud
Río Cuareim, Laguna de la Salamanca	Artigas	-30,818578	-56,014006
Río Cuareim, Pº Ferrugem	Artigas	-30,542831	-56,339251
Aº Guaviyú, R.3	Artigas	-30,343212	-56,630036
Aº Cuaró gde, R.4	Artigas	-30,783843	-56,780557
Río Cuareim, Pº de León	Artigas	-30,121242	-57,089287
Aº Cuaró, prox. Estación Cuaró	Artigas	-30,642071	-56,915413
Aº Yucutuja, R.30	Artigas	-30,438865	-57,29592
Aº Mandiyú	Artigas	-30,531839	-57,665364
Río Cuareim, Laguna de la Salamanca	Artigas	-30,818483	-56,013618
Aº Canelón Grande N Santa Rosa	Canelones	-34,482587	-56,040526
Aº de las piedras	Canelones	-34,695678	-56,282517
Balneario Merín	Cerro Largo	-32,751393	-53,258905
Río Yaguarón, Rio Branco	Cerro Largo	-32,571756	-53,375999
Cañada sin nombre, alfuente Aº Las cañas	Cerro Largo	-32,334398	-53,82826
Río Tacuarí, Placido Rosas	Cerro Largo	-32,764346	-53,720579
Aº Guazunambí	Cerro Largo	-32,681045	-54,250347
Río Tacuarí, R.8	Cerro Largo	-32,530802	-54,133279
Aº Fraile Muerto, R.7	Cerro Largo	-32,521383	-54,527387
Aº Pablo Paez, Pº del Ombú	Cerro Largo	-32,7845	-55,018256
Aº Cufre, Pº Gambetta	Colonia	-34,404105	-57,112732
Aº Colla, Pº de Arballo, Rosario	Colonia	-34,319071	-57,337593
Río Miguelete, Pº Sosa	Colonia	-34,145023	-57,865109
Aº de las Vacas, Pº del Cerro	Colonia	-33,985054	-58,227232
Río de la Plata, Bahía de Colonia	Colonia	-34,461708	-57,844879
Aº Cordobes, Pº de la Cruz	Durazno	-32,616389	-55,325321
Río Yí, Pº Santa Rita	Durazno	-33,195974	-55,308772
Aº del Blanquillo, Pº del Blanquillo R.42	Durazno	-32,962939	-55,651517
Aº Sarandí, Balneario a 1 km W de San Jorge	Durazno	-32,836249	-55,883236
Río Yí, Sarandí del Yí	Durazno	-33,350505	-55,621938
Aº Tomás Cuadra, R.14	Durazno	-33,321655	-56,285091
Aº Molle de Quinteros	Durazno	-32,982238	-56,72241
Aº Caballero	Durazno	-33,236602	-56,68073
A Minas de Callorda, 10 km al W de R.5	Durazno	-32,957964	-56,357441
Aº Porongos, R.14, Pº Calatayud	Flores	-33,482414	-56,820017
Aº Sarandí, Pº Atahona, 10km W de R.3	Flores	-33,421945	-56,913567
Aº Grande, Pº de Lugo, R.14	Flores	-33,249339	-57,262834
Aº Paraná, 4 km E de R.6	Florida	-33,562652	-55,693658
Aº del Milán, Pº de Milán	Florida	-34,052075	-55,514957
Tornero gde, R.6	Florida	-33,939155	-55,88391
Aº del Sauce, prox. Sarandí Grande	Florida	-33,731617	-56,417974
Aº Mendoza, Pº de la Arena	Florida	-34,29138	-56,198529
Aº Guitierrez, R.8	Lavalleja	-33,522918	-54,569644

A° Tapes grande, prox. Tapes Grande	Lavalleja	-33,935142	-54,877113
Arroyo Ladrillos	Lavalleja	-33,73866	-55,253155
A° Solis Grande	Lavalleja	-34,377956	-55,423367
A° Solis de Mataojo, Solis de Mataojo	Lavalleja	-34,603243	-55,460552
Cda. Cortez Blanco Punto 13 Salus	Lavalleja	-34,425035	-55,283042
A° Aigua, P° de la Arena	Maldonado	-34,164711	-54,485126
A° Garzón, P° Real	Maldonado	-34,571261	-54,517369
A° de las cañas, P° de Lopez	Maldonado	-34,541605	-54,815719
A° Pan de Azúcar, R.9	Maldonado	-34,78313	-55,231782
Río Queguay Chico, R.26	Paysandú	-31,898991	-56,741274
A° Santa Ana, R.4, 11 km N de Guichon	Paysandú	-32,257565	-57,208698
A° Campamento, R.26	Paysandú	-31,991058	-57,453461
A° Quebracho Gde., P° de Santa Lucía	Paysandú	-32,002332	-57,929077
A° Guaviyú, R.3	Paysandú	-31,842212	-57,884059
Río Uruguay, Paysandú	Paysandú	-32,309398	-58,098754
A° Negro, R.3	Paysandú	-32,581898	-57,776036
A° Salsipuedes, R.20	Río Negro	-32,631661	-56,594863
A° Molles de Porrúa	Río Negro	-32,878633	-56,896646
A° Don Esteban, R.3	Río Negro	-32,835605	-57,515807
A° Sanchez gde, R.20	Río Negro	-32,992606	-57,810451
Farrapos, viejo saladero	Río Negro	-32,84242	-58,086449
Desemb. Arroyo Caracoles Gde.	Río Negro	-33,26378	-58,345577
Arroyo Yeguada, Río Uruguay	Río Negro	-32,983846	-58,064119
Río Uruguay, Laguna de la Lengüeta	Río Negro	-32,729667	-58,134639
Río Uruguay, Yaguareté	Río Negro	-33,120112	-58,274159
A° Gajo sur del San Luis	Rivera	-31,476018	-54,613961
Río Negro, P° Mazangano	Rivera	-32,110918	-54,667348
A° del Abrojal, P° de Lunes	Rivera	-31,809089	-55,064155
A° Yaguarí, P° del Muerto	Rivera	-31,349405	-55,001454
Cañada del medio, P° Blanquillos, R.29	Rivera	-31,577836	-55,247161
A° Batovi, P° Batovi, R.27	Rivera	-31,115183	-55,415033
A° Cuñapirú, P° la calera	Rivera	-31,341001	-55,475568
A° Cuñapirú, 1km al N de P° del Lagunón	Rivera	-30,878215	-55,601696
A° Lunarejo, P° Real	Rivera	-31,193782	-55,898318
A° del Sauce y camino de la laguna	Rocha	-33,636839	-53,560808
Laguna Negra, frente a Punta Palmar	Rocha	-34,010485	-53,595567
A° de la Tranquera, R.14	Rocha	-33,906681	-53,742814
Laguna Clotilde	Rocha	-34,293304	-53,802976
Cañada del Abra	Rocha	-33,80058	-54,303459
A° de Chafalote, R.9	Rocha	-34,362458	-54,063573
A° Sopas, P° del corral de piedra	Salto	-31,529648	-56,46016
Río Arapey, P° del Horno	Salto	-31,084919	-56,535865
A° Sopas, P° del cementerio 8km NW de R.31	Salto	-31,392475	-56,707824
Río Dayman, P° del Parque, R.4	Salto	-31,784958	-57,035068
Río Arapey, P° de la laguna R.4	Salto	-31,231466	-57,097006

A° Laureles, P° Filho	Salto	-31,463615	-57,575955
Río Dayman, P° de las Piedras, R.3	Salto	-31,4598	-57,907235
Río Uruguay brazo del Boycua	Salto	-30,892241	-57,753443
A° Coronilla, P° Coronilla	San José	-34,127033	-56,857752
A° del Tigre	San José	-34,708939	-56,576225
A° Guaycurú, P° del Guaycurú	San José	-33,982244	-56,98482
A° Durazno, 12 km NE de R.12	Soriano	-33,766718	-57,464457
A° del aguila paso sin nombre	Soriano	-33,586795	-57,866545
A° del Bizcocho, P° del membrillo, R.96	Soriano	-33,473891	-58,240728
Río Uruguay, Playa Agraciada	Soriano	-33,809027	-58,426706
Río Negro, P° Aguilar, R.26	Tacuarembó	-32,284997	-54,830768
Laguna Marginal P° Aguilar, R.26	Tacuarembó	-32,289328	-54,838431
A° Yaguari, Picada del Cuello, prox. R.26	Tacuarembó	-32,037654	-55,373646
A° Tacuarembó, P° de los Novillos	Tacuarembó	-31,965836	-55,67638
Río Negro, Km 329	Tacuarembó	-32,446025	-55,433656
A° Tranqueras, R.5	Tacuarembó	-31,791737	-55,981136
A° Malo, R.59	Tacuarembó	-32,311479	-55,85285
A° Zapatero	Tacuarembó	-32,141127	-56,451147
A° Cardozo	Tacuarembó	-32,518001	-56,298223
Río Cebollatí, Picada de Techera	Treinta y tres	-33,361705	-53,985975
Río Olimar gde., P° de la Laguna	Treinta y tres	-33,277561	-54,170824
A° Yermal Gde.	Treinta y tres	-33,044558	-54,446239
Río Olimar Chico, P° de las piedras	Treinta y tres	-33,338118	-54,783961
Arroyo Parao, Paso Real	Treinta y tres	-32,945887	-53,924439

Anexo II. Número de Catálogo de laboratorio de las muestras utilizadas en los análisis, se incluye información sobre la identidad específica, la localidad, la cuenca de la que provienen y los marcadores que fueron analizados. LM= Laguna Merín, RG= Río Guaíba, RN= Río Negro y RT= Río Tramandaí. Aº= Arroyo, Pº= Paso

Secuencia	Especie	Localidad	Cuenca	COI	28S
B1	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	X
B2	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	X
B3	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	X
B4	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B7	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	X
B11	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B12	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B13	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B16	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	X
B19	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B20	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B21	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Aº Don Esteban	RN	X	-
B24	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Aº Don Esteban	RN	-	X
B25	<i>Corbicula largillierti</i>	Aº Don Esteban	RN	-	X
B26	<i>Corbicula fluminea</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B62	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Aº Sauce de Batoví, R.59	RN	X	X
B71	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Negro, Pº Mazangano	RN	X	-
B73	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Negro, Pº Mazangano	RN	X	-
B74	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Negro, Pº Mazangano	RN	X	X
B75	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Negro, Pº Mazangano	RN	X	-
B76	<i>Cyanocyclus paranensis</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	X
B77	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B78	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, Nuevo Berlín	RU	X	-
B79	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, Aº Yaguararé	RU	X	-
B83	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Tacuarembó, Pº Manuel Diez	RN	X	-
B84C	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Tacuarembó, Pº Manuel Diez	RN	X	-
B87	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Aº Celestino, R.3	RU	X	-
B136	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Laguna Peixoto	RT	X	-
B137	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Laguna Peixoto	RT	X	-
B138	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Laguna Peixoto	RT	X	-
B139	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Laguna Peixoto	RT	X	-
B146	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Río Guaiba, Praia Veludo, Belem Novo	RG	X	X
B147	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Río Guaiba, Praia Veludo, Belem Novo	RG	X	-
B148	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Río Guaiba, Praia Veludo, Belem Novo	RG	X	-
B151	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Lagoa Dos Quadros	RT	X	-

B152	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Lagoa Dos Quadros	RT	X	-
B153	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Lagoa Dos Quadros	RT	X	-
B163	<i>Corbicula</i> sp.	Río Guaiba, Praia Veludo	RG	X	-
B172	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Cuareim, Laguna Salamanca	RU	X	X
B181	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Tomás Cuadra, R.14	RN	X	-
B182	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Blanquillo	RN	X	X
B184	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Blanquillo	RN	X	-
B185	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Blanquillo	RN	X	-
B187	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Minas de Callorda	RN	X	-
B188	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Minas de Callorda	RN	X	-
B193	<i>Cyanocyclus</i> sp.	Río Tacuarí, R.18	LM	X	X
B194	<i>Cyanocyclus</i> sp.	Río Tacuarí, R.18	LM	X	-
B195	<i>Cyanocyclus</i> sp.	Río Tacuarí, R.8	LM	X	X
B196	<i>Cyanocyclus</i> sp.	Río Tacuarí, R.8	LM	X	-
B197	<i>Cyanocyclus</i> sp.	Río Tacuarí, R.8	LM	X	X
B198	<i>Cyanocyclus</i> sp.	Río Tacuarí, R.8	LM	X	-
B199	<i>Cyanocyclus</i> sp.	Río Tacuarí, R.8	LM	X	X
B200	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Laguna Arnaud	LM	X	X
B201	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Laguna Arnaud	LM	X	X
B202	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Laguna Arnaud	LM	X	-
B203	<i>Cyanocyclus guahybensis</i>	Laguna Arnaud	LM	X	-
B204	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	X
B218	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	-
B266	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Guaviyú, R.3	RU	X	-
B267	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Guaviyú, R.3	RU	X	-
B270	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Guaviyú, R.3	RU	X	X
B271	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Guaviyú, R.3	RU	X	X
B272	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Guaviyú, R.3	RU	X	-
B273	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Porongos, R.14	RN	X	-
B279	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Porongos, R.14	RN	X	-
B280	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Porongos, R.14	RN	-	X
B290	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Cuareim, P° Pacheco	RU	X	-
B291	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Cuareim, P° Pacheco	RU	X	-
B292	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Cuareim, P° Pacheco	RU	X	-
B293	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Cuareim, P° Pacheco	RU	X	-
B294	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Cuareim, P° Pacheco	RU	X	-
B295	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Cuareim, P° Pacheco	RU	X	-
B314	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Arapey, P° del Horno	RU	X	X
B315	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Corral de Piedras	RU	X	-
B316	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Corral de Piedras	RU	X	-
B317	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Corral de Piedras	RU	X	-

B318	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Corral de Piedras	RU	X	-
B319	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Corral de Piedras	RU	X	-
B320	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Corral de Piedras	RU	X	-
B321	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Daymán, P° del Parque	RU	X	-
B322	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Daymán, P° del Parque	RU	X	-
B323	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Daymán, P° del Parque	RU	X	-
B325	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Daymán, P° del Parque	RU	X	-
B337	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Negro, P° Aguiar	RN	X	-
B338	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Negro, P° Aguiar	RN	X	-
B340	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Negro, P° Aguiar	RN	X	-
B341	<i>Cyanocyclus limosa</i>	Río Negro, P° Aguiar	RN	X	-
B374	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	-
B373	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	X
B391	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	-
B392	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	-
B393	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	-
B394	<i>Cyanocyclus fortis</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	-
B400	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Cementerio	RU	X	-
B401	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Cementerio	RU	X	-
B402	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Cementerio	RU	X	-
B403	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Sopas, P° Cementerio	RU	X	-
B410	<i>Cyanocyclus exquisita</i>	Río Uruguay, boca, A° Yaguareté	RU	X	-
B412	<i>Cyanocyclus limosa</i>	A° Porongos, R.14	RN	X	-