

UCH-FC
MAG-EBE
P426
C1

**PATRONES FILOGEOGRÁFICOS EN EL BIVALVO *MESODESMA*
DONACIUM LAMARCK (1818) "MACHA" EN CHILE**

Tesis

Entregada a La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología

Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por

Gioconda Paz Peralta Vinagre

Septiembre 2008

Director de Tesis Dr.: Elie Poulin

Co-Director de Tesis Dr.: Juan Carlos Castilla



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGISTER

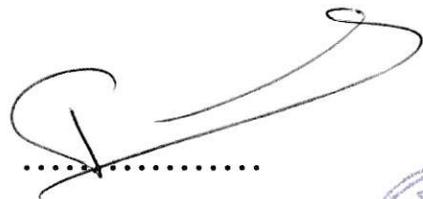
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

GIOCONDA PAZ PERALTA VINAGRE

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día de de

Director de Tesis:

Dr. Elie Poulin


.....

Co-Director de Tesis:

Dr. Juan Carlos Castilla

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Marco Méndez


.....

Dra. Cecilia Osorio


.....



No solo no hubiera sido nada sin ustedes, sino con toda la gente que estuvo a mi alrededor desde el comienzo; algunos siguen hasta hoy. ¡GRACIAS... TOTALES!

SoIM-ReM



AGRADECIMIENTOS



Esta tesis se encuentra enmarcada dentro de la colaboración Franco-Chileno LIA-DIAMS. Además fue parcialmente financiada por la Fundación Andrew Mellon (Sergio Navarrete – Juan Carlos Castilla y el Proyecto FONDAP-FONDECYT 1501-001.

Quisiera agradecer al Dr. Juan Carlos Castilla y Dr. Elie Poulin por su paciencia como tutores y al Dr. Ricardo Guíñez por sugerir el tema de tesis.

También quisiera agradecer a las personas que me ayudaron con muestras como el Dr. Omar Defeo, Montevideo, Uruguay (*Mesodesma mactroides* recolectadas en Uruguay); la Dra. Carmen Yamashiro y profesionales de IMARPE, Perú: Raúl Castillo, Alex Tejada , Alejandro Gonzáles por las muestras enviadas de *Mesodesma donacium* desde Perú y al Dr. Rodrigo Bustamante por las muestras recolectadas de *Donax deltoides* en Australia. Asimismo quiero agradecer a los macheros recolectores de las distintas localidades de Chile desde donde se obtuvieron las muestras de esta tesis.

Al Team Castilla por el apoyo, paciencia, oídos, consejos, desde el inicio Vero, Luis, Andres y a los que se fueron y otros que han llegado. A Leyla y Andrea S. por enseñarme vida y obra del trabajo de laboratorio. Al team Correa y al team Santelices por el apoyo.

INDICE

| | |
|---------------------------|----|
| LISTAS DE TABLAS | v |
| LISTAS DE FIGURAS..... | vi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| RESULTADOS | 22 |
| DISCUSIÓN | 33 |
| CONCLUSIÓN | 37 |
| BIBLIOGRAFÍA | 38 |



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades muestreadas y el número de individuos secuenciados para cada localidad. (n=60).

Tabla 2.- Lista de los haplotipos encontrados y localización de los sitios polimórficos en los haplotipos.

Tabla 3. Índices de diversidad molecular sobre el total de los haplotipos y sobre cada clado.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Mapa del rango de distribución de *Mesodesma donacium* a lo largo de la costa Pacífica. En la sección ampliada se observan las localidades muestreadas.

Figura 2.- a) Red de haplotipos (Median Joining Network) de 60 secuencias de Citocromo Oxidasa I (COI) de *Mesodesma donacium*. Cada círculo corresponde a un haplotipo y su diámetro es proporcional al número de individuos que llevan ese haplotipo. Los círculos pequeños representan a un único individuo. Cada línea entre haplotipos representa una mutación. El valor entre los clados mayores resume el número de mutaciones entre ellos. Cada clado se identifica por un color: amarillo para la zona CentroNorte y azul para la zona CentroSur. b) Representación grafica de la distribución de los haplotipos de ambos clados sobre las localidades muestreadas. El diámetro es proporcional al tamaño muestral.

Figura 3.- Distribución mismatch para todos los haplotipos de *Mesodesma donacium* (n=60)

Figura 4.- Árbol de Máxima Verosimilitud construido sobre las secuencias de COI de *Mesodesma donacium*. Bootstrap=1000, valores <50 no se muestran.

Figura 5.- Distribución mismatch para cada clado (a.-Centronorte = 29 ind.; Centrosur =31 ind.) de *Mesodesma donacium*.

Figura 6.- Arbol de Máxima Verosimilitud construido a partir de secuencias de COI de la Superfamilia Mactroidea. Remuestreo=1000.

RESUMEN

Se determinó la estructura filogeográfica del bivalvo *Mesodesma donacium* a través de secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) obtenidas desde especímenes de 12 localidades entre 18° y 42° S. Los análisis de la red de haplotipos y el árbol filogenético mostraron la presencia de dos clados genéticamente distintos y geográficamente segregados, con una zona de contacto secundario comprendida entre los 32° a 34° S. El nivel de divergencia entre los clados (6%) se encuentra por sobre los valores descritos para especies hermanas en bivalvos (3%) lo que sugiere que ambos clados podrían haber evolucionado a especies distintas producto de alguna(s) barrera biogeográfica. A través de la aproximación del reloj molecular se estimó que el inicio de la separación entre los clados habría ocurrido ca. 5.9 M.a. Los análisis de inferencia demográfica realizados sobre cada clado demuestran que ambos presentan historias demográficas similares, independiente de los factores climáticos y oceanográficos a los cuales han estado expuestas sus poblaciones.

ABSTRACT

The phylogeography structure of the bivalve *Mesodesma donacium* was determined through partial sequences of the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase I (COI) obtained from specimens of 12 sites located 18° and 42° S. Analysis of the network of haplotypes and the phylogenetic tree showed the presence of two genetically different clades which are geographically segregated, with a secondary contact zone between 32° to 34° S. The level of divergence among clades (6%) is above values described for sister species in bivalves (3%) suggesting that both clades may have evolved into different species product of some biogeographic barrier. The molecular clock approximation estimated that the beginning of the separation between clades would have occurred *ca.* 5,9 M.y. The analysis of demographic inference carried out on each clade showed similar demographic histories, independent of oceanographic and climatic factors to which populations have been exposed.

INTRODUCCIÓN

El origen y la mantención de la diversidad genética en las especies es un tema central en la biología evolutiva. Comprender estos procesos en el océano es particularmente difícil debido que en las especies marinas las barreras al flujo genético son menos obvias, por lo que se ha considerado que éstas presentan una diferenciación geográfica de menor magnitud que las especies terrestres. Esto significa que regiones oceánicas muy separadas geográficamente pueden estar conectadas, comportándose en algunos casos como una gran población panmíctica (Palumbi, 1994; Launey y col., 2002). Junto a lo anterior, la ausencia de barreras, los grandes tamaños poblacionales (Launey y col., 2002) y el potencial de dispersión de las especies marinas harían más lenta, e incluso impedirían la diferenciación genética entre las poblaciones.

Para especies que habitan amplios rangos geográficos el proceso evolutivo más utilizado para explicar la discontinuidad genética es la vicarianza. Es así como factores biológicos y/o físicos pueden impedir el flujo genético de los organismos con desarrollo planctónico, generando quiebres a lo largo de las distribuciones geográficas de las especies.

Sin embargo, existen especies marinas que a pesar de tener un alto potencial de dispersión, presentan una alta diferenciación genética a grandes escalas, sugiriendo que el flujo génico podría a pesar de todo, estar limitado (Palumbi, 1992).

A partir de la literatura se puede observar que el potencial de dispersión por sí solo es un predictor imperfecto de la conectividad de las poblaciones, y que la estructura genética de las poblaciones marinas a menudo contradice lo esperado por la estrategia de historia de vida (Patarnello y col., 2007). Por ejemplo, Breton y col. (2003) observa que entre dos especies de poliquetos, una con desarrollo larval planctónico de 9 días y otra con desarrollo larval directo, es esta última la que presenta una estructuración genética significativa sobre poblaciones dentro de un pequeño rango geográfico.

La integración de datos genéticos y geográficos ha provisto un medio para descubrir las barreras al flujo genético en el ambiente marino (Lessios y col., 2001), a través de la filogeografía, término introducido por Avise y col. 1987), la cual puede definirse como un campo de estudio concerniente con los principios y procesos que gobiernan las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos, especialmente aquellos dentro y entre especies estrechamente relacionadas, permitiendo comprender cómo eventos históricos han ayudado a dar forma a la actual distribución geográfica de genes, poblaciones y especies.

La acumulación de estudios filogeográficos durante los últimos 20 años, ha permitido la comparación de patrones geográficos de variación genética entre taxas co-distribuidos arrojando la presencia de patrones espaciales intraespecíficos producto de una historia biogeográfica compartida. Estudios realizados en la estrella *Patiriella regularis*, especie endémica que habita las costas Nueva Zelanda, arrojó que no existía una diferenciación genética significativa entre la isla del norte y la del sur, indicando que la separación entre las islas no es una barrera en sí. Sin embargo, sí se encontró una diferenciación

significativa entre la zona más al sur de la isla sur, zona con presencia de surgencia (Ayres y Waters, 2005); encontrándose un patrón similar en el mitílido *Perna canaliculus* con una alta diferenciación genética hacia el sur de la isla (Apte y Gardner, 2002). De esta manera, las zonas de surgencia son fenómenos biogeográficos importantes para delimitar el flujo genético actual, pudiendo transportar las larvas fuera de las zonas de reclutamiento o manteniéndolas dentro impidiendo la dispersión. (Castilla y col., 2002b).

Uno de los límites biogeográficos más reconocidos es Point Conception, ubicado al sur de California (USA), el cual está descrito a partir del fin de la distribución de especies lo que podría predecir un quiebre genético dentro de aquellas que atraviesan este límite. Sin embargo, una serie de estudios, entre ellos los de Burton (1998) y Dawson (2001), dan cuenta que a nivel genético no se aprecia diferenciación. No es el caso de otro límite biogeográfico reconocido para el hemisferio norte, Cape Cañaveral en la Península de la Florida. Este límite ha sido varias veces a lo largo del tiempo geológico una barrera para la dispersión entre las poblaciones conespecíficas del norte del Golfo de México y la costa Atlántica (Avice, 1992), separando faunas donde se distribuyen especies hermanas. Por ejemplo especies cercanas del bivalvo del género *Mercenaria* (Bert y Arnold, 1995) y del cangrejo del género *Menippe* (Bert y Harrison, 1988) coinciden geográficamente en esta zona, e incluso frecuentemente se presenta hibridación producto de un contacto secundario entre las poblaciones separadas por aparición de la Península de la Florida. La coincidencia entre los límites de la distribución de estas especies y su filogeografía intraspecífica sugiere una historia geológica en común. En contraste, Point Conception

(USA) representa un límite biogeográfico de dos grupos de faunas que se encuentran relacionadas filogenéticamente (Burton, 1998). Otros quiebres descritos en la literatura son el del Océano más Austral (Southern Ocean) y las aguas oceánicas circundantes asociadas con la formación del Frente Polar Antártico alrededor de 20 a 30 millones de años atrás (M.a.) (Bargelloni y col., 2000); el correspondiente al Istmo de Panamá que separó el Océano Pacífico Ecuatorial y el Océano Atlántico hace 3.1 a 3.5 M.a. (Avice, 2000); y la separación entre el Mar Báltico y el Mar del Norte unos 7500 años atrás (Olsen y col., 2004) quiebre considerado reciente.

En el estudio de la filogeografía el marcador molecular más utilizado ha sido el ADN mitocondrial (ADNmt), entre los factores que lo han hecho un marcador muy usado, se incluye su herencia uniparental, su haploidía, y su aparente falta de recombinación. Además la disponibilidad de partidores mitocondriales animales universales desarrollados por Folmer y col. (1994) ha permitido la comparación de datos obtenidos en diferentes taxas como por ejemplo equinodermos (Palumbi, 1996), insectos (Vandewoestijn y col., 2004), gastrópodos (Wise y col., 2004), bivalvos (Lapègue y col., 2006), ascidias (Castilla y col., 2002a) entre otros. Para examinar la estructuración geográfica de los linajes genéticos se muestrean individuos a través de todo el rango de distribución de las especies para luego caracterizar su ADNmt. Los haplotipos (secuencias de ADN que difieren en uno o más sitios) resultantes son usados para inferir filogenias o árboles de genes las cuales reflejan las relaciones evolutivas, calculando la diferencia entre pares de secuencias, donde la similaridad entre éstas nos entrega información de cuanto ha divergido una de la otra, observándose generalmente que las

secuencias similares han divergido recientemente mientras que a medida que las diferencias entre las secuencias aumentan corresponden a linajes que han evolucionado independiente por un período largo de tiempo.

Características de la costa chilena

En la costa chilena la clasificación biogeográfica de la diversidad de especies litorales ha sido desarrollada a partir de compilaciones de distintos estudios. Se encuentran descritas dos provincias biogeográficas mayores: 1.-)Una provincia templada cálida al norte de los 30° S, conocida como Peruviana, y 2.-)Una provincia templada fría que se inicia a los 42° S, conocida como Provincia Magallánica o Patagónica (Brattstrom y Johanssen, 1983; Camus, 2001). El contacto entre ambas provincias llevaría a la formación de una zona transicional donde coexisten especies de ambas regiones, cuyo límite no ha sido definido claramente, siendo según Brattstrom y Johanssen (1983) entre los 40 y 41° S, o entre los 35 a 48° S según Lancelotti y Vásquez (1999). Sin embargo, la validez de estas clasificaciones ha sido discutida debido a los criterios para establecer la resolución del estudio (Camus, 2001).

Uno de los factores abióticos, que según la literatura, es relevante para la distribución de la biota marina es el patrón de circulación de las corrientes marinas. La circulación general del mar en las costas chilenas esta fuertemente influenciada por la circulación atmosférica de los vientos en el Pacífico Suroriental. Una corriente oceánica superficial conocida como Deriva del Oeste se divide al acercarse al continente (entre los 40° - 45°

S), originando y regulando la circulación en las costas de Chile. Hacia el norte fluyen la Corriente Oceánica y la Corriente Costera de Humbolt (o del Perú) alcanzando una profundidad aproximada de 300 y 400 metros. Ambas transportan aguas de origen subantártico de baja salinidad y de baja temperatura siendo la Corriente Costera más fría que la Oceánica (Camus, 2001).

Ambas Corrientes se encuentran separadas por un flujo hacia el sur resultado de un cambio estacional en la dirección de la Corriente Oceánica del Perú la cual se une a la Corriente Sur Ecuatorial formándose la Contracorriente del Perú, que alcanza aproximadamente los 48° S. Este flujo se desplaza de manera subsuperficial con una extensión estacionalmente variable y que transporta agua entre los 200 y 400 m de profundidad.

Por debajo de la rama costera de la Corriente de Humbolt, viaja otra contracorriente subsuperficial, la Subcorriente Peruana Chilena, ubicada entre los 100 y 400 metros de profundidad. Fluye desde la zona norte del Perú hasta la isla Grande de Chiloé transportando agua subsuperficial ecuatorial de alta salinidad y bajo contenido de oxígeno entre los 100 y 400 metros de profundidad.

Junto a las anteriores, la costa del norte de Chile presenta una corriente superficial débil, denominada Contracorriente Costera de Chile que afecta hasta aproximadamente los 150 metros de profundidad y que transporta agua subtropical salada, cálida, rica en oxígeno desde el noroeste hacia el sur entre la Corriente Costera del Perú y la costa y parcialmente sobre la Subcorriente Perú Chile.

La rama hacia el sur de la Corriente de Deriva del Oeste, la Corriente del Cabo de

Hornos, fluye paralela a la costa, bordeando hasta el extremo sur del archipiélago chileno continuando hacia el Este hasta unirse a la corriente de Falkland en el Atlántico. Las aguas superficiales transportadas por esta corriente, son una mezcla entre las aguas provenientes de los canales y Agua Subantártica, conformándose un Agua Subantártica modificada, ya que presenta una menor salinidad. Esta corriente se une a la corriente circumpolar Antártica en el Paso de Drake.

Otros factores abióticos relevantes para la distribución de la biota marina son 1) la forma de la costa y ancho de la plataforma continental, donde la forma de la costa influye en la intensidad de la surgencia costera (Figueroa y Moffat, 2000), mientras que la forma de la plataforma continental afecta la calidad de las aguas de surgencia. 2) Los vientos en la zona costera determinan parte importante de la circulación costera, y por lo tanto afectan aspectos importantes de la biología de las especies como tiempos de residencia o la simple advección de aguas. 3) La temperatura superficial del mar en la zona costera (TSM) donde los gradientes latitudinales de TSM explican una proporción significativa de las variaciones regionales en la abundancia de los grupos funcionales más abundantes en la zona intermareal chileno (Broitman y col. 2001). En resumen, tanto la intensidad de la surgencia como la calidad de las aguas, afectan a los organismos marinos a través de la temperatura, cantidad de nutrientes y patrones de circulación (Jaramillo y col. 2006)

El fenómeno de surgencia puede verse disminuido por eventos de escala global como “El Niño”, cuya ocurrencia causa, principalmente en la zona norte, el aumento de la

temperatura superficial del mar, profundización de la termoclina y una disminución en el contenido de oxígeno en el agua. A nivel atmosféricos, asociado en su mayoría al debilitamiento del Anticiclón del Pacífico, “El Niño” causa abundantes precipitaciones en la zona central e inusuales lluvias en la zona norte de nuestro país (Avaria y col., 2004).

Mesodesma donacium, “macha”

El bivalvo *Mesodesma donacium* (Bivalvia: Mesodesmatidae) conocido como “macha”, habita las playas expuestas de arena en la costa chilena y peruana (entre los 5°S y 42°S). Dentro de Sudamérica, el género *Mesodesma* se encuentra representado por dos especies: *Mesodesma donacium* Lamarck (1818) en la costa Pacífica, y *M. mactroides* (Deshayes, 1854) en la costa Atlántica (desde Brasil 24°S hasta Argentina 41°S). A partir de la evidencia fósil de *Mesodesmatidae* se sugiere que la familia no es endémica de Sudamérica, si no que se habría originado en Australasia, para gradualmente invadir Sudáfrica, Nueva Zelandia y la Antártica y, en sucesivas migraciones habría llegado a Sudamérica (von Ihering, 1907). La presencia de *Mesodesma* (*M. attenuata*) en la formación Oamaru (Nueva Zelandia) perteneciente al Eoceno (entre 33.5 y 55.6 M.a.); su ausencia en los registros fósiles de los depósitos del Perú y de la Patagonia Terciaria, además de su ausencia en los registros de isla Ipún (44°33'S - 74°57'W) e isla Guafo (43°37'S - 74°45'W) durante el Mioceno Inferior y Medio tardío entre los 16 y 11.2 M.a. (Martínez, 1988; Frassinetti y Covacevich, 1999; Frassinetti, 2000 y 2004), junto con la presencia en el Plioceno, alrededor de los 5.3 M.a., de los primeros registros de

Mesodesma donacium en la localidad de Horcón, 32°71'S - 71°50'W (Herm, 1969), sugieren que el género se estableció en Sudamérica entre el Mioceno Superior y el Plioceno, entre los 11.2 y los 5.3 M.a. como parte de una migración importante de moluscos Antárticos, los cuales colonizaron hacia el norte de Sudamérica, modificando profundamente la fauna de las costas chilenas y argentinas (von Ihering, 1907). Siendo en este período donde se habría originado la separación entre ambas especies sudamericanas.

El rango actual descrito de distribución geográfica de *M. donacium*, abarca por el norte desde la bahía de Sechura en Perú (5°S) hasta el extremo sur de la isla de Chiloé (alrededor de los 43°S) (Osorio y Bahamonde, 1968) (Figura 1). Biogeográficamente su distribución corresponde a la Provincia Peruviana, estando el límite de su distribución sur dentro de la denominada zona de Transición.

La “macha” es una especie dioica sin dimorfismo sexual con períodos de desove anuales o semianuales que dependen de las variaciones ambientales locales, principalmente la temperatura del agua y de la disponibilidad de alimento (Tarifeño, 1980). Presenta una larva pelágica cuyo tiempo de permanencia en la columna de agua, obtenido en laboratorio, es de alrededor de 26 - 28 días (Carstensen y col., 2006). Posteriormente la larva se asienta parchosamente en ambientes de arena en la zona intermareal y submareal, donde los individuos juveniles y adultos se encuentran segregados observándose que las machas pequeñas menores a 20 mm. se encuentran preferentemente en la zona intermareal o mesolitoral (entre la línea de más alta marea y

la zona que queda sin agua durante la marea baja), mientras que los tamaños mayores se encuentran casi exclusivamente en la parte más profunda (Jaramillo y col., 1994). La macha no se encuentra en ambientes con bajas salinidades (Ortiz y Stotz, 1996) y evita las zonas con sedimentos finos y alto contenido de materia orgánica (Jaramillo y col., 1994; Miranda, 2001).

La pesquería de la macha históricamente ha sido importante dentro del subsector pesca artesanal siendo de gran valor comercial a lo largo de la costa del Pacífico. En Chile en la década de los ochenta el desembarque nacional aumento desde 2.843 toneladas (ton.) a 17.122 ton. en 1989, representando esta última cifra el 16% del total de moluscos desembarcados a nivel nacional. Posteriormente en los noventa el volumen desembarcado disminuyó desde 9.397 ton. en 1990 a 6.464 ton. en 1998. Desde el año 1999 el desembarque cae abruptamente alcanzando sólo 2.349 ton. el año 2003, el resto del período no se alcanzan las 2.000 ton. (Datos Servicio Nacional de Pesca. Sernapesca).

La sobreexplotación del recurso, unido a los eventos de “El Niño” han reducido enormemente las densidades poblacionales en su distribución a lo largo del Pacífico, desapareciendo bancos históricos casi por completo, como por ejemplo Ritoque, V Región (González, 2001) y playa “Las Machas”, I Región (Jerez y col. Proyecto FIP, 1999). De acuerdo a Miranda (2001) la llegada del fenómeno de “El Niño” del año 1997 aumentó la mortalidad de los individuos de *M. donacium* de la Bahía de Coquimbo, desapareciendo completamente durante los primeros meses de 1998. Además determina

que coincidentemente con esta desaparición se registró la ocurrencia de un aumento en la frecuencia de marejadas, así como disminuciones en las salinidades, y de aumentos en las concentraciones de seston total. Un efecto similar de mortalidad masiva y paulatina de las poblaciones de macha por efecto de “El Niño” fue observado en el litoral sur de Perú, existiendo bancos naturales que no habían logrado recuperarse para finales del 2003 (Quiroz y Tejada Informe técnico IMARPE, 2004). A partir de registros arqueológicos se han detectado que las poblaciones de macha han sufrido los efectos de “El Niño” desde hace aprox. 4000 años (Avalos y Rodríguez, 1994; Guzmán y col., 2000), desapareciendo completamente de la fauna malacológica de los sitios estudiados. Por otra parte, las anomalías frías relacionadas al evento de “La Niña” de 1999-2000 también habrían afectado las poblaciones de macha, previniendo la recolonización natural de la especie (Barriga y Quiroy, 2002).

Estudios previos realizados con isoenzimas a poblaciones de *M. donacium* arrojaron resultados opuestos. Por una parte, análisis a individuos de poblaciones de Coquimbo, Quidico y Chiloé, fueron comparadas genéticamente por electroforesis de tres loci: Lap, Pgi, AAT, mostrando la población de Coquimbo diferencias en las frecuencias génicas, presentando además una baja variabilidad multiloci, lo que sugiere una diferenciación genética geográfica al interior de la distribución de *M. donacium* (comunicación personal R. Guíñez). Por otra parte, un segundo estudio realizado entre individuos provenientes de poblaciones de Hornitos, Coquimbo, Tongoy, Nehuentué (IX Región), Cau-Cau (Chiloé) en el cual se estudiaron 18 isoenzimas, dentro de las cuales se encuentran las tres usadas en el estudio anterior, arrojó que en sus índices de identidad y distancia genética

prácticamente no había diferencia entre las poblaciones muestreadas (Stotz y col., Proyecto FIP 2003), no observándose correspondencia de estructuración genética con las regiones biogeográficas descritas para la costa chilena. Sin embargo, a pesar de esta contradicción en los resultados de los estudios isoenzimáticos existe evidencia que este marcador genético no presenta una adecuada resolución para determinar los límites entre zonas biogeográficas, ya que evoluciona lentamente en comparación con el ADN mitocondrial, el cual si es capaz de resaltar dichos quiebres (Reeb y Avise, 1990).

En vista de los antecedentes anteriores, esta tesis permitirá visualizar la distribución de la diversidad genética en *M. donacium*, lo que es relevante para la biología de la conservación y el manejo del recurso.

HIPÓTESIS I

Si la alta potencialidad de dispersión de la larva de *M. donacium* mantiene una continuidad genética entre las poblaciones, entonces a lo largo de la costa chilena (entre los 18,5°S y 43° S) se espera encontrar una baja estructuración genética bajo un modelo de aislamiento por distancia.

HIPÓTESIS II

Si los factores ambientales, oceanográficos e históricos que definen las zonas biogeográficas de la costa de Chile afectan el flujo génico de *M. donacium*, entonces se espera encontrar una concordancia entre la ubicación de los límites biogeográficos de dichas zonas y los quiebres filogeográficos de *M. donacium*.

De acuerdo a las hipótesis planteadas los objetivos de la presente tesis son:

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el patrón filogeográfico en el bivalvo *Mesodesma donacium* Lamarck (1818) dentro de su distribución geográfica natural en la costa chilena (aprox. entre los 18,5° S y 43° S).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la estructuración espacial de la diversidad genética en las poblaciones de *M. donacium*, basado en el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI).
2. Evaluar si los quiebres biogeográficos descritos para la costa chilena se ven reflejados en la estructura genética espacial de las poblaciones de *M. donacium*

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se recolectaron individuos de *M. donacium* desde doce localidades a lo largo de su distribución geográfica conocida (Figura 1), siendo Puerto Libre (PE, 18°18' S - 70°26' W) ubicada en el límite sur de Perú el muestreo mas al norte de la distribución de la especie. La recolección de este sitio fue realizada por funcionarios del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) y luego enviado al laboratorio en Santiago de Chile para su analisis. Los once sitios restantes corresponden a localidades chilenas: Playa Peruana (PP, 21°09' S - 70°06' W), Hornitos (HO, 23°29' S - 70°05' W), Coquimbo (CO, 29°57' S - 71°20' W), Los Vilos (LV, 31°55' S - 71°31' W), Longotoma (LG, 32° 21'S - 71°26' W), Ritoque (RT, 32°50' S - 71°31' W), San Sebastián (SS, 33°32' S - 71°36' W), Matanzas (MT, 33°57' S - 71°52' W), Mehuín (ME, 39°26' S - 73°13' W), Pucatrihue (PU, 40°28' S - 73°38' W) y Cucao (CU, 42°38' S - 74°09' W) (Tabla 1). Los muestreos en estas localidades fueron realizados por macheros, excepto Ritoque que fue muestreada personalmente por la autora. Las machas se recolectaron tanto desde la zona intermareal como submareal, así como indistintamente individuos adultos y juveniles. Las muestras se limpiaron con agua dulce y luego fueron conservadas completas en etanol 95% hasta su procesamiento en el laboratorio.

Además se obtuvieron muestras de individuos de otras dos especies de la familia Mesodesmatidae; *M. mactroides* recolectadas en la costa de Uruguay en el 2003 por el Dr. Omar Defeo, e individuos de *Paphies australis* recolectadas en Whangateau Harbour (36°19' S, 174°46' W), Nueva Zelandia por el Dr. Juan Carlos Castilla. Las muestras de *M.mactroides* y *P.australis* fueron tejido del músculo del pie conservado en etanol 95%.

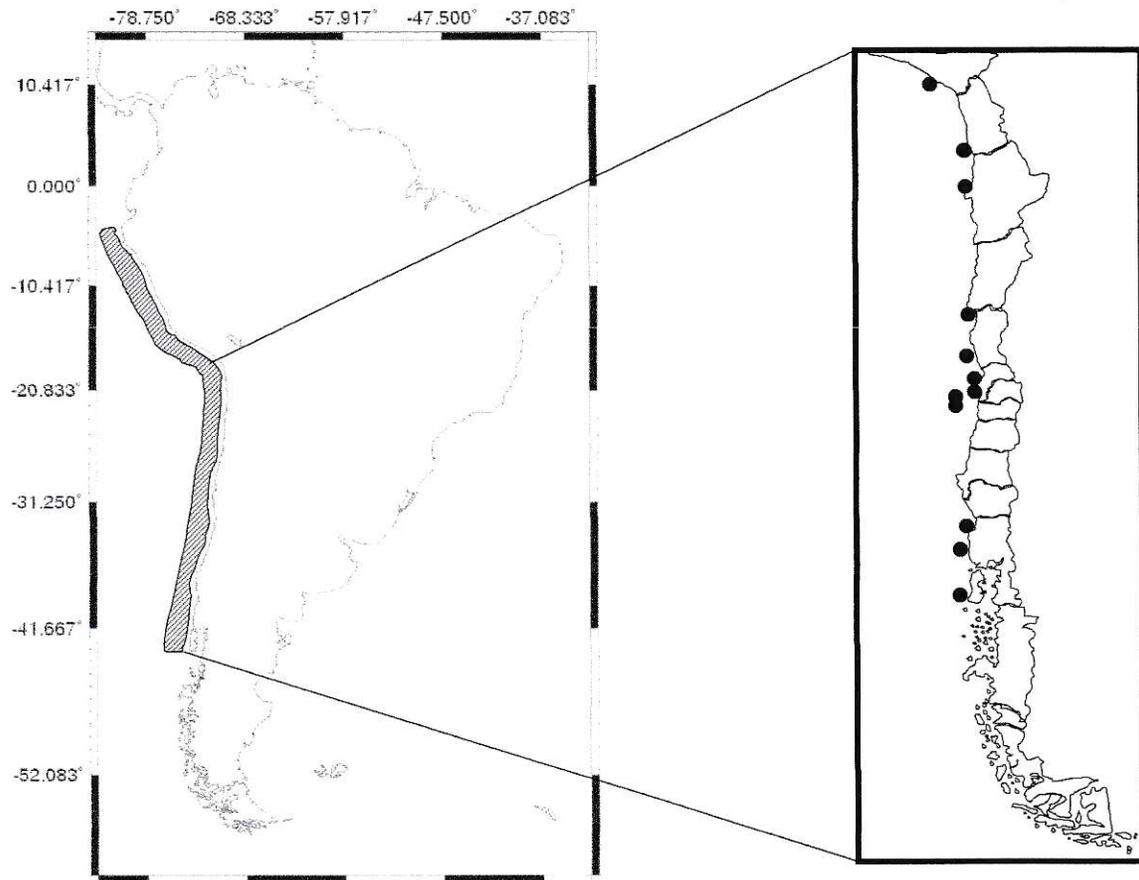


Figura 1.- Mapa del rango de distribución de *Mesodesma donacium* a lo largo de la costa Pacífica. En la sección ampliada se observan las localidades muestreadas.

| Localidad | Código | País | Coordenadas | N |
|---------------|--------|-------|-----------------------|----|
| Puerto Libre | PE | Perú | 18° 18' S - 70° 26' W | 2 |
| Playa Peruana | PP | Chile | 21° 09' S - 70° 06' W | 2 |
| Hornitos | HO | Chile | 23° 29' S - 70°05' W | 4 |
| Coquimbo | CO | Chile | 29° 57' S - 71° 20' W | 2 |
| Los Vilos | LV | Chile | 31° 55' S - 71° 31' W | 3 |
| Longotoma | LG | Chile | 32° 21' S - 71° 26' W | 9 |
| Ritoque | RT | Chile | 32° 50' S - 71° 31' W | 6 |
| San Sebastián | SS | Chile | 33° 32' S - 71° 36' W | 11 |
| Matanzas | MT | Chile | 33° 57' S - 71° 52' W | 2 |
| Mehuín | ME | Chile | 39° 26' S - 73° 13' W | 9 |
| Pucatrihue | PU | Chile | 40° 28' S - 73° 38' W | 3 |
| Cucao | CU | Chile | 42° 38' S - 74° 09' W | 7 |

Tabla 1. Localidades muestreadas y el número de individuos secuenciados para cada localidad. (n=60)

ANÁLISIS MOLECULAR

La extracción del ADN genómico total se realizó a través de aprox. 0.5 cm² de tejido del músculo del pie al cual se le aplicó el protocolo Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (Sambrook y col., 1989). Se amplificó un fragmento del gen Citocromo Oxidada subunidad I (COI) de aproximadamente 700 pares de bases a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los partidores universales descritos por Folmer y col. (1994):

LCO-1490 (5'- GGTCACAAATCATAAAGATATTGG - 3') y

HCO-2198 (5'- TAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA - 3')

La reacción de PCR para un total de 10 µl de volumen incluyó 1 µl de MgCl₂, 1 µl de buffer 10X PCR, 1.3 µl de dNTPs, 0.27 µl de cada partidor, 0.3 µl de BSA, 0.1 µl de Taq (5U/ml) y aproximadamente entre 0.1 a 1 ng ADN genómico.

Las reacciones fueron realizadas en un termociclador Gene Amp. PCR System 9700 Applied Biosystems con las siguientes condiciones de amplificación: un paso de denaturación inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos consistentes en 95°C por 40 segundos, 45 segundos a 50°C de alineamiento y 1 minuto a 72°C de extensión, y finalmente un paso de extensión adicional de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron purificados utilizando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) y cuantificados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Inicialmente las muestras fueron secuenciadas en el secuenciador automático de ADN ABI 3100 (Applied Biosystems) en el laboratorio de Diversidad Molecular, del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Posteriormente las muestras fueron enviadas a secuenciar a Macrogen Inc., Korea quien posee un secuenciador automático 3730xl.

ANÁLISIS DE DATOS

Las secuencias de ADN obtenidas fueron alineadas manualmente en el programa Proseq versión 2.91 (Filatov, 2002). Para obtener los índices de diversidad molecular se utilizó el programa ARLEQUIN versión 3.1 (Excoffier, 2005), con el cual se obtuvo una descripción general de los datos: número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (K), diversidad nucleotídica (π ; Nei, 1987), número de diferencias promedio entre secuencias (Π), diversidad haplotípica (H; Nei, 1987).

Para establecer la genealogía intraspecífica entre los haplotipos se utilizó el programa NETWORK versión 4.5.0.1. (Fluxus Technology Ltda., 2004) con la aproximación de median joining obteniendo la representación gráfica conocida como network (red de haplotipos) que permite representar los datos intraspecíficos mediante linajes multibifurcados recientemente evolucionados mostrando las potenciales vías evolutivas alternativas en forma de círculos (Bandelt y col. 1999) de manera que acomode la coexistencia de ancestros con sus descendientes.

La historia demográfica de las poblaciones estudiadas fue inferida a través del análisis de la distribución de la “mismatch” de las secuencias (representación en forma de

histograma de la frecuencia de pares de diferencias entre haplotipos) en el programa DNASP 4.10.9 (Rozas y col. 2003). Este método se basa en el supuesto que eventos históricos de crecimiento y declinación poblacionales, bajo el supuesto de neutralidad, dejan señales distintivas en las secuencias de adn comparadas con poblaciones de tamaño constante. Así en poblaciones que han experimentado un crecimiento reciente se espera encontrar una distribución unimodal de pares de diferencias entre secuencias, mientras que las que se encuentran en equilibrio demográfico presentan distribuciones multimodales (Rogers y Harpending, 1992).

Las reconstrucciones filogenéticas entre los haplotipos (secuencias) se realizaron en el programa PAUP* VERSION 4.01b (Swofford, 1998). Para determinar el modelo de evolución que mejor se ajustaba a los datos de secuencias, se utilizó el programa MODELTESTserver 1.0 running modeltest VERSION 3.8, <http://darwin.uvigo.es/> (Posada y Crandall, 1998). Posteriormente el modelo y sus parámetros (frecuencias de las bases, tipos de sustituciones nucleotídicas, variación entre-sitio, y proporción de sitios invariantes) fueron aplicados al método de reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (Maximun Likelihood). Para optimizar la obtención del mejor árbol filogenético se realizó una búsqueda heurística; la robustez de las ramas fue validada por la prueba de remuestreo bootstrap con 1000 replicas (indicados por el porcentaje sobre el árbol) que dan fiabilidad a la topología del árbol.

Para obtener una estimación de la divergencia entre los haplotipos se calculó la distancia genética con el programa PAUP* (Swofford, 1998).

Para estimar el tiempo de divergencia entre los clados se puso a prueba la hipótesis del

reloj molecular, la cual afirma que la tasa de cambio molecular es constante a través de todas las ramas de un árbol bajo el supuesto que la cantidad de diferencia genética entre secuencias es función del tiempo de separación. En este método se utiliza una Prueba de Razón de Verosimilitud (Likelihood Ratio Test = LRT) en la cual se comparan los valores de verosimilitud (likelihood) obtenidos desde un árbol y su modelo de evolución, sin el supuesto de reloj molecular y los valores obtenidos forzando un reloj molecular sobre el árbol, determinando si los datos pueden ser explicados igualmente bien con o sin el supuesto de reloj molecular. En este caso tenemos $N-2$ grados de libertad, donde N es el número de taxas. El test estadístico es la diferencia en los $-\ln$ de los valores de verosimilitud (likelihood) multiplicados por dos, $LRT = 2*(\ln_1 - \ln_2)$.

RESULTADOS

Se obtuvieron 60 secuencias parciales de COI de 510 pares de bases desde 60 individuos. Las secuencias presentaron 50 sitios polimórficos (Tabla 2), 39 de los cuales resultaron parsimoniosamente informativos, no detectándose deleciones ni inserciones. A partir del análisis de las 60 secuencias se definieron 31 haplotipos dando una diversidad haplotípica total (H) de $0,925 \pm 0,0001$ y una diversidad nucleotídica (π , Nei) de $0,336 \pm 0,017$. El número de diferencias promedio entre secuencias (Π) fue $16,344 \pm 8,189$ (Tabla 3).

El análisis de la red de haplotipos (Figura 2a) de las localidades muestreadas revela la presencia de dos grupos de haplotipos bien diferenciados. El grupo 1 que lo denominaremos como “CentroNorte” agrupa a los individuos provenientes de Puerto Libre, Perú (n=2), Playa Peruana (n=2), Hornitos (n=4), Coquimbo (n=2) y Los Vilos (n=3); mientras que en el grupo 2 que lo denominaremos como “CentroSur” se agrupan los individuos provenientes de Mehuín (n=9), Pucatrihue (n=3) y Cucao (n=9). El resto de las localidades muestreadas Longotoma (n=9), Ritoque (n=6), San Sebastián (n=11) y Matanzas (n=2) presentan haplotipos en ambos grupos (Figura 2b).

El histograma producido por el análisis de “mismatch” (Figura 3) presenta una distribución bimodal. Si bien este tipo de distribución se puede interpretar como una

población estable, examinado la red de haplotipos se sugiere que la bimodalidad es producto de los dos linajes bien diferenciados uno del otro, donde la primera señal corresponde a las diferencias intragrupo (moda de 5 pares de diferencias) y la segunda señal sobre las 25 pares de diferencia (moda de 29 pares de diferencias) señalaría diferencias intergrupo no recientes.

| | 10 | 20 | 30 | 40 |
|--------|---|----|----|----|
| Hap_1 | TTTAAGTTTATTCTTCTCTCTTTACCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_2 | TTTAGGTTTATTCTTCTCTCTTTACCTGTATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_3 | TTTAGGTTTATTCTTCTATCTTTATCCGTATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_4 | TTTAGGTTTATTTTCTCTCTTTACCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_5 | TTTAGGTTTATTCTTCTCTCTTTACCTGTATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_6 | TTTAGGCTTATTTTCTCTCTTTACCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_7 | TCTAGATTTATTCTTCTCTCTTTGCCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_8 | TTTAGGTTTATTTTCTCTCTTTACCTATATTACTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_9 | TTTAGGTTTATTTTCTCTCTTTACCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_10 | TTTAGGTTTATTCTTCTCTCTTTACCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_11 | CTTGGACTTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCCGGCCTCTT | | | |
| Hap_12 | CTTGGACTTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCCGGTCTCTT | | | |
| Hap_13 | CTTGGACTTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCCGACCTCTT | | | |
| Hap_14 | TTTAGGTTTCATTCTTCTCTCTTTACCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_15 | TTTAGGTTTATTCTTCTCTCTTTACCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_16 | CTTGGATTTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCTGGCCTCTT | | | |
| Hap_17 | CTTGGATCTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCTGGCCTCTT | | | |
| Hap_18 | TTTAGGTTTATTCTTCTCTTTTACCTATATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_19 | CTTGGACTTGCTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCCGGTCTCTT | | | |
| Hap_20 | CTCGGATTTGTTTCTTACCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCTGGCCTCTC | | | |
| Hap_21 | TTTAGGTTTATTCTTCTCTCTTACCTGTATTGCTATAACTTAATTCCTT | | | |
| Hap_22 | CTTGGACTCGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCCGGCCTCTT | | | |
| Hap_23 | CTCGGATTTGTTTCTTACCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCTGGCCCCTT | | | |
| Hap_24 | CTTGGATTTGTCTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGCCGTGGTCTGGCCTCTT | | | |
| Hap_25 | CTTGGATTTGTTTCTTACCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCTGGCCTCTT | | | |
| Hap_26 | CTCGGATTTGTTTCTTACCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCTGGCCTCTT | | | |
| Hap_27 | CCTGGATTTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGCGGTCTGGTTTCTC | | | |
| Hap_28 | CCCGGATTTGTTTCTTACCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCTGGCCTCTT | | | |
| Hap_29 | CTTGGATTTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGTGGTCTGGCCTTTT | | | |
| Hap_30 | CTTGGATTTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACGCGTCGTGGTCTGGCCTCTT | | | |
| Hap_31 | CCTGGATTTGTTTCTTTCCCTCCTGCTTACACCGTCGCGGTCTGGTTTCTT | | | |

Tabla 2.- Lista de los haplotipos encontrados y localización de los sitios polimórficos en los haplotipos.

| | Total | Centronorte | Centrosur |
|-----------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| N° sitios polimórficos (S) | 50 | 17 | 20 |
| N° haplotipos (k) | 31 | 14 | 17 |
| Diversidad nucleotídica (π) | 0,336 \pm 0,017 | 0,006 \pm 0,000 | 0,007 \pm 0,000 |
| Diversidad haplotípica (H) | 0,925 \pm 0,001 | 0,8 \pm 0,076 | 0,888 \pm 0,002 |
| Π | 16,344 \pm 8,189 | 3,039 \pm 1,814 | 3,484 \pm 2,031 |

Tabla 3. Índices de diversidad molecular sobre el total de los haplotipos y sobre cada clado.

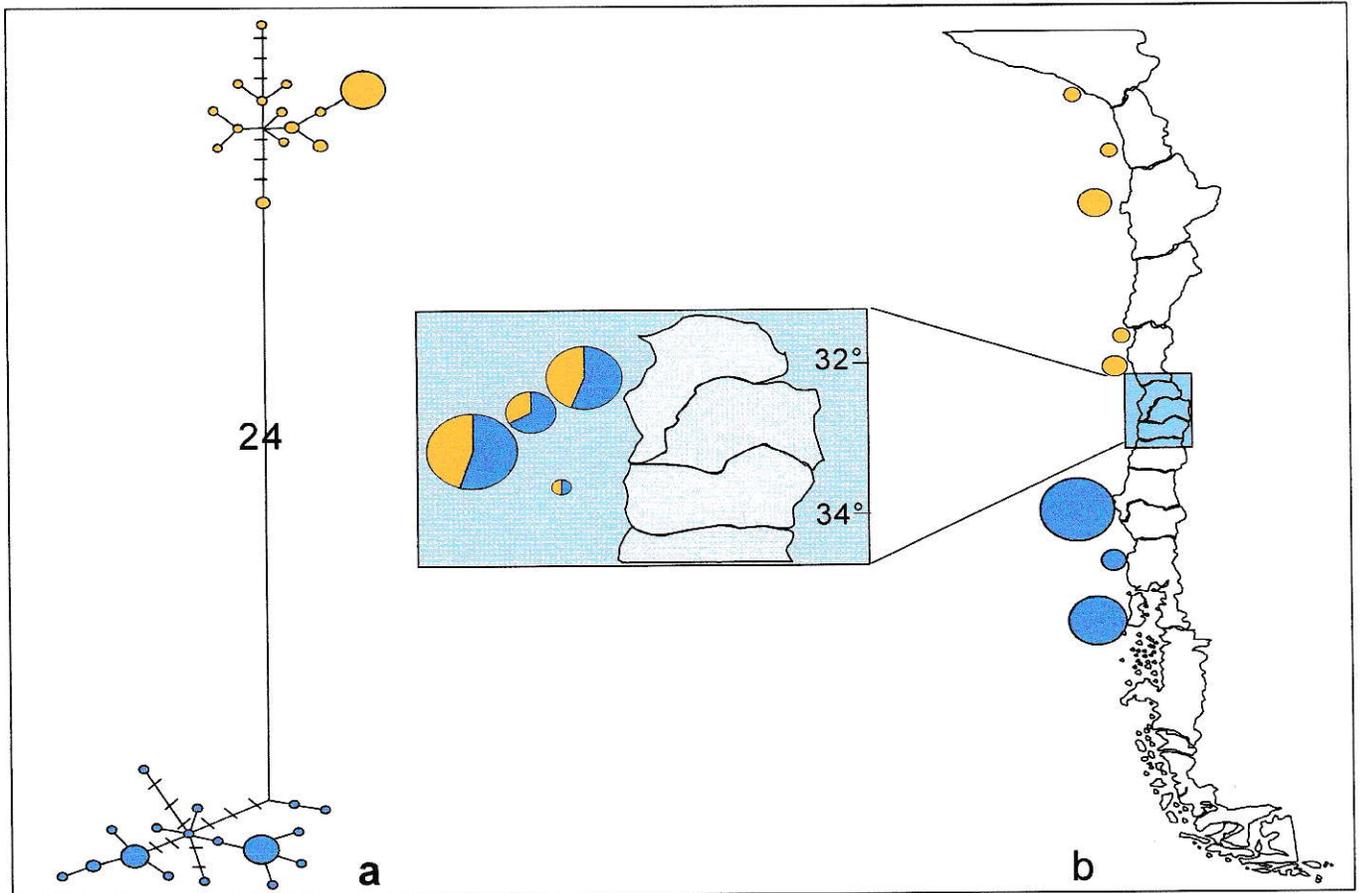


Figura 2.- a) Red de haplotipos (Median Joining Network) de 60 secuencias de Citocromo Oxidasa I (COI) de *Mesodesma donacium*. Cada círculo corresponde a un haplotipo y su diámetro es proporcional al número de individuos que llevan ese haplotipo. Los círculos pequeños representan a un único individuo. Cada línea entre haplotipos representa una mutación. El valor entre los clados mayores resume el número de mutaciones entre ellos. Cada clado se identifica por un color: amarillo para la zona CentroNorte y azul para la zona CentroSur. b) Representación grafica de la distribución de los haplotipos de ambos clados sobre las localidades muestreadas. El diámetro es proporcional al tamaño muestral.

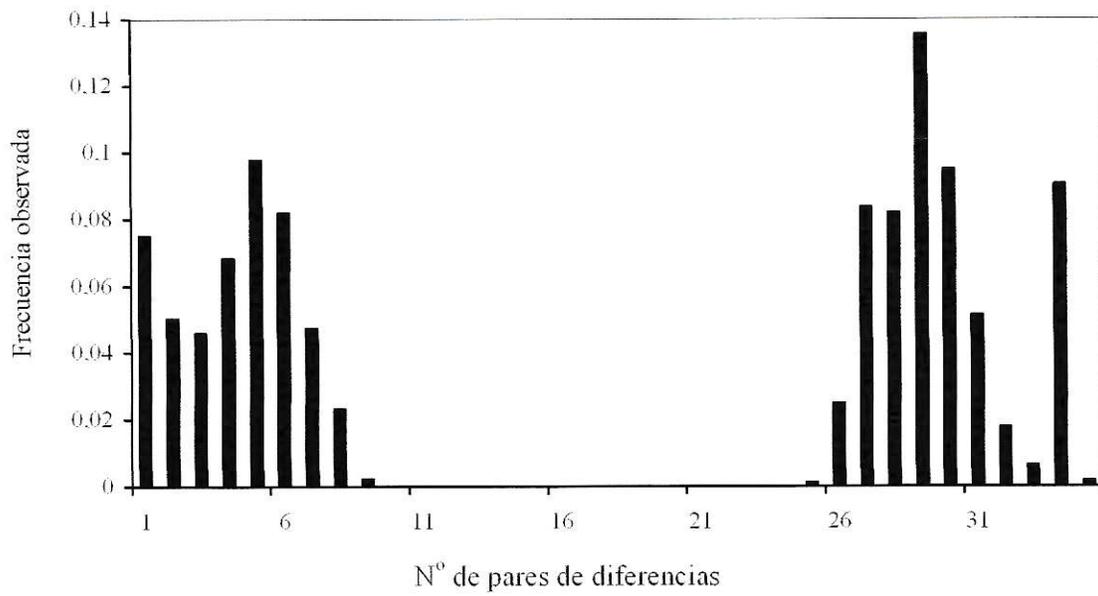


Figura 3.- Distribución mismatch para todos los haplotipos de *Mesodesma donacium* (n=60)

Para determinar si los grupos Centronorte y Centrosur corresponden a dos clados filogenéticamente distintos se construyó un árbol de Máxima Verosimilitud (Maximun Likelihood) (Figura 4). El modelo evolutivo escogido para el grupo de datos analizado por MODELTEST fue el de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), con frecuencias de las bases variables y frecuencias de transición y tranversion variables (Hasegawa y col., 1985), con los siguientes parámetros Lset Base=(0.2456 0.1156 0.1810) Nst=2 Tratio=4.5534 Rates=gamma Shape=0.1741 Pinvar=0. El árbol revela dos clados monofiléticos fuertemente soportados por el remuestreo, los cuales corresponden al mismo agrupamiento observado en la red de haplotipos.

Debido a que los datos sugieren una estructuración genética no reciente, se consideró interesante analizar por separado los clados. El clado CentroNorte está representado por 14 haplotipos y arrojó una diversidad haplotípica (H) de $0,8 \pm 0.076$. El número de sitios polimórficos (S) fue de 17 con 9 sitios parsimoniosamente informativos, con una diversidad nucleotídica (π) de 0.006 ± 0.004 . El número de diferencias promedio entre secuencias (Π) fue de $3,039 \pm 1.630$. El haplotipo más común se detectó en 13 individuos con una frecuencia sobre los haplotipos del grupo de 44,8 %. El clado CentroSur está representado por 17 haplotipos y arrojó una diversidad haplotípica de $0,888 \pm 0,002$. El número de sitios polimórficos fue de 20 con 9 sitios parsimoniosamente informativos, con una diversidad nucleotídica de $0,007 \pm 0,000$. El número de diferencias promedio entre secuencias fue de $3,484 \pm 2,03$. Se detectaron dos haplotipos en mayor frecuencia: uno con 29 % (9 individuos) y otro con 19,3 % (6 individuos). Se observa a partir de la mismatch para cada clado (Figura 5) que ambas

muestran patrones similares de bimodalidad. En el clado CentroNorte la moda principal se encuentra a 4 pares de diferencias mientras que una segunda moda se encuentra a las 0 pares de diferencias. En el grupo Centrosur se observa que la moda principal también se encuentra a las 4 pares de diferencias mientras que la segunda moda se obtiene a 1 par de diferencias.

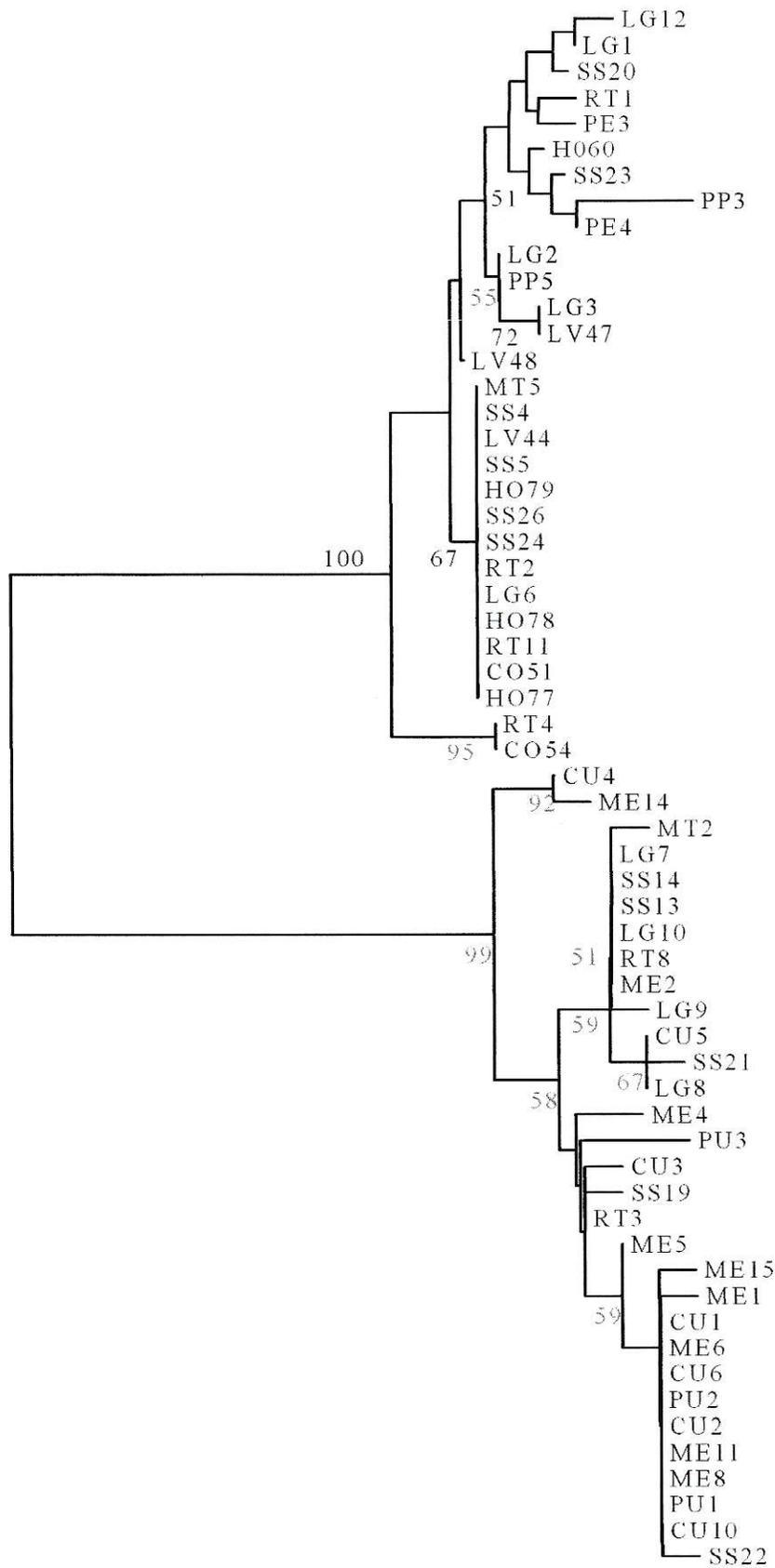
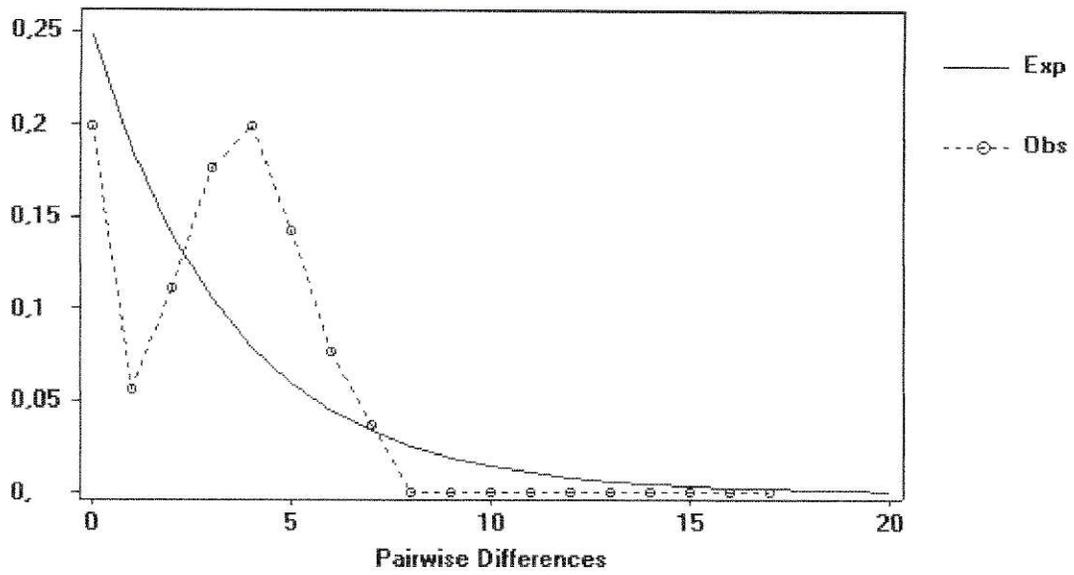


Figura 4.- Árbol de Máxima Verosimilitud construido sobre las secuencias de COI de *Mesodesma donacium*. Bootstrap=1000, valores <50 no se muestran.

a.-) Centro Norte



b.-) Centro Sur

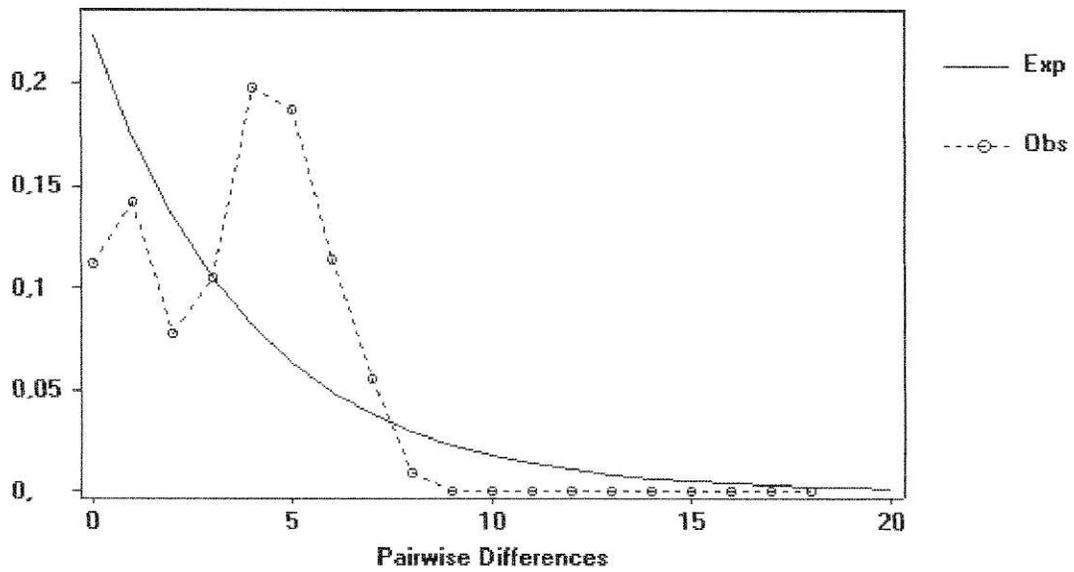


Figura 5.- Distribución mismatch para cada clado (a.-Centronorte = 29 ind.; Centrosur =31 ind.) de *Mesodesma donacium*.

La estimación de las distancias genéticas entre los haplotipos arrojó valores intraclado en promedio de un 1% mientras que entre haplotipos interclado arrojó en promedio un 6%.

Para evaluar la hipótesis del reloj molecular se construyó un árbol (Figura 6) con los haplotipos de mayor frecuencia de cada clado de *M. donacium*, el haplotipo 6 para la zona norte y el haplotipo 26 para la zona sur; una secuencia de *M. mactroides* (obtenida por la autora) y una secuencia de *P. australis*. (obtenida por la autora). Junto a las anteriores se utilizaron secuencias disponibles en GeneBank de especies pertenecientes a la misma Superfamilia Veneroidea (Familia Mactridae): *Maetra veneriformis* (número de acceso AY874531) y *Rangia cuneata* (número de acceso U47652), las cuales se utilizaron como grupo externo (outgroup). A partir de este árbol se obtuvieron los valores de verosimilitud del árbol forzado ($-\ln_1 = 2120,77$) y del árbol no forzado ($-\ln_0 = 2118,62$). A partir de los datos anteriores se calculó el LRT [$2*(\ln_1 - \ln_0)$] = 4.3. Considerando los grados de libertad $n-2$, donde n corresponde al número de taxa, se obtiene un valor crítico de $(p=0.05) = 9.49$, por lo que no es posible rechazar la hipótesis nula.

Para estimar la fecha de separación de los clados se utilizó la tasa de divergencia de COI para gastrópodos de 0.56% por millón de años (Johnson y col., 2006). Considerando el largo de las secuencias analizadas de 564 pares de bases y asumiendo una generación por año, se obtiene que la tasa de mutación para COI es $\mu = 1.5 \times 10^{-6}$ mutaciones por locus por generación por año. Utilizando esta tasa la fecha de separación entre los clados de *M. donacium* se estimó en aproximadamente 5.9 M.a. atrás, mientras que la separación con *M. mactroides* en aproximadamente 11 M.a.

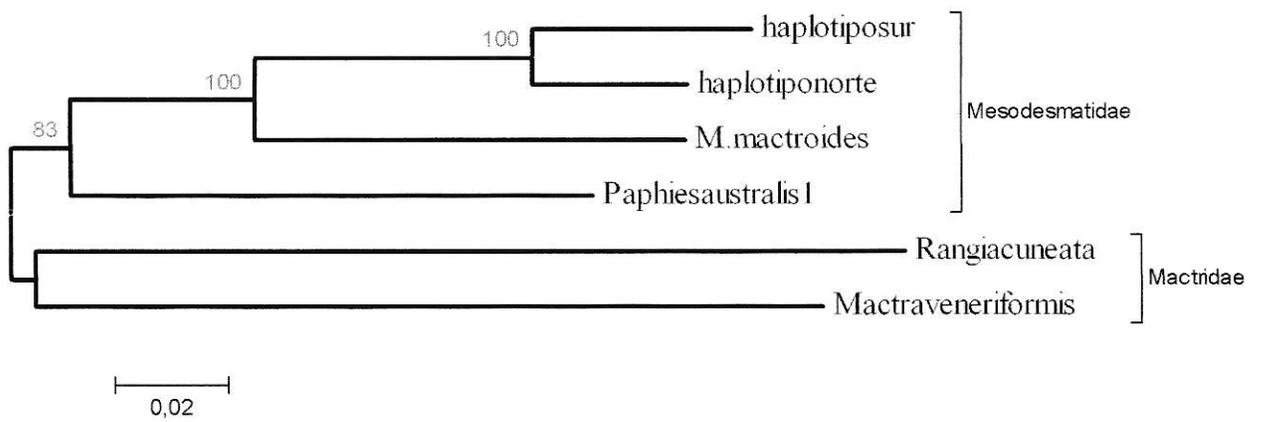


Figura 6.- Arbol de Máxima Verosimilitud construido a partir de secuencias de COI de la Superfamilia Mactroidea. Remuestreo=1000.

DISCUSIÓN

A partir de los resultados se observa la existencia de dos clados a lo largo de la distribución geográfica muestreada de *Mesodesma donacium*. Ambos clados se encuentran respaldados tanto por el análisis intraspecífico (red de haplotipos, Figura 2a), como por el análisis filogenético (árbol, Figura 4), donde ambas representaciones agrupan a los mismos individuos en los mismos clados. Esta estructuración espacial de los haplotipos no refleja el potencial de dispersión de la larva planctónica de aproximadamente 28 días, confirmando que la dispersión no explica los patrones genéticos encontrados. Asimismo, la carencia de haplotipos compartidos entre los grupos es característica de poblaciones que no han experimentado flujo génico reciente (Avice 2000), por lo que es de particular interés el hecho de que en las localidades muestreadas en la zona central de Chile (entre 32° S y 34° S) se hayan encontrado haplotipos pertenecientes a ambos clados (Figura 2b), lo que sugeriría que en esta zona se estaría desarrollando un contacto secundario. Un patrón similar de vicarianza fue encontrado en una especie de la familia Mesodesmatidae presente en Nueva Zelanda. En *Paphies subtriangulata*, cuyo período larval es de 3 semanas, estudios isoenzimáticos demostraron una separación de las poblaciones entre las isla norte y sur. El mismo patrón es observado entre las islas en el mitílido *Perna canaliculus*, y sería explicado directamente por la acción de los sistemas de corrientes que afectan a las islas desde el

Pacífico y el Atlántico (Smith y col., 1989). En la literatura de la costa Chilena no ha sido encontrado un evento geológico o climatológico que pudiera verse reflejado a nivel genético en la zona de los 32° - 34° S. Sin embargo, estudios recientes de especies marinas que comparten la distribución continua sobre la zona de los 32° - 34° S también han registrado patrones de estructuración genética, como por ejemplo el alga, *Lessonia nigrescens*, (comunicación personal Florence Tellier) y el gastrópodo *Crepidula dilatata*, (comunicación personal Antonio Brante), lo que sugiere que los mismos factores biogeográficos históricos podrían haber influenciado los patrones intraspecíficos de estas especies frente a la costa chilena.

Según Hewitt (2000), en poblaciones que habitan amplios rangos ambientales, aquellas que se encuentran en áreas menos perturbadas divergirán unas de las otras por largos períodos de tiempo resultando en estructuras filogeográficas mientras que por el contrario, las poblaciones que se encuentran en ambientes más perturbados se espera que muestren altos niveles de homeogeneidad genética sobre sus rangos, como resultado de repetidos ciclos de cuello de botella-efecto fundador, siendo esto último lo esperado para el clado de la zona CentroNorte el cual soporta los efectos de “El Niño” desde hace 5000 años aproximadamente (Avalos y Rodríguez, 1995, 2002, 2004). Sin embargo, la diversidad genética (Tabla 3) y el patrón observado de la mismatch en ambos clados (Figura 5), sugieren que sus historias demográficas han sufrido procesos similares, con expansiones y disminuciones poblacionales producidos por la dinámica propia de la especie manteniendo tamaños efectivos que impiden que se genere y mantenga la diversidad genética o por condiciones ambientales en paralelo (Patarnello y col., 2007).

Un estudio previo realizado con isoenzimas a poblaciones de *M. donacium* sobre un rango similar de muestreo al de esta tesis aunque en un menor número de localidades, arrojó una baja variabilidad genética con distancias entre 0,005 % y 0,58 %, no evidenciándose la existencia de estructuración genética para la “macha” (Stotz y col., 2003). Contrariamente en este estudio la divergencia intraspecífica (dentro de cada clado) arrojó un 1% lo cual duplica la distancia encontrada anteriormente manteniéndose dentro del rango encontrado en otras especies (0,0177 % bivalvos, Kojima y col., 1995, Baco y col., 1999 ; <2% gastrópodos , Wise 2004). La distancia genética encontrada entre los clados de *M. donacium* fue de cerca de un 6%, siendo mayor a los niveles de divergencia encontradas entre especies cercanas de moluscos marinos de 3% o mayores: 4.3% bivalvos (Kojima y col., 1995), gastrópodos sobre 20% (Baco y col., 1999). A partir de estos valores se podría sugerir la existencia de dos especies de *Mesodesma donacium*. Sin embargo, se han reportados casos en donde la divergencia intraspecífica de secuencias mitocondriales pueden ser altas existiendo aún reproducción. Además debido a la naturaleza no recombinante del marcador molecular y su herencia maternal no se puede inferir la existencia de hibridación entre los grupos en la zona de contacto. Esta problemática puede resolverse utilizando marcadores nucleares como ITS o microsatélites, o técnicas como AFLP (Secondi y col., 2006).

La estimación del tiempo de divergencia de las especies del género *Mesodesma* realizada a partir de la tasa de mutación calculada en esta tesis entrega un valor dentro del rango de divergencia obtenido por Marins y Levy (1999) a partir de estudios isoenzimáticos, estimando un tiempo de divergencia entre *M. donacium* y *M. mactroides*

9.5 – 34 M.a. atrás. Sin embargo, la evidencia fósil contrasta con estas fechas debido a la ausencia de *Mesodesma mactroides* de los registros paleontológicos durante el Mioceno (10-25 M.a.) de la Patagonia Argentina (Del Río, 1995, 2000) y su posterior aparición en el Cuaternario aproximadamente 1.8 M.a. Por otra parte la colonización desde Nueva Zelanda parece tener correspondencia con el registro fósil ya que la fecha estimada de separación coincide con el límite inferior del período donde la familia Mesodesmatidae se habría dispersado hacia la Antártica para luego invadir Sudamérica. Estas diferencias entre las fechas estimadas podrían deberse a la ausencia de registro fósil, como es el caso documentado para la Patagonia Argentina Terciaria que durante el Plioceno se encontró inundada (Del Río, 2004) por lo que existen pocos registros de este período geológico en la zona. Por otra parte, es posible que la tasa de divergencia utilizada no sea la adecuada para determinar la separación a este nivel taxonómico.

Finalmente la determinación de dos grupos genéticos en las poblaciones de *M. donacium* tiene implicaciones para los patrones de explotación, permitiendo manejar la especie como dos stock independientes y así preservar la diversidad del recurso.

CONCLUSIÓN

El presente estudio concluye la existencia de estructuración genética en las poblaciones del bivalvo *Mesodesma donacium* a largo de su distribución geográfica, evidenciando dos grupos de haplotipos los cuales presentan una zona de contacto secundario en la zona comprendida entre los 32° y 34° S.

La ubicación geográfica de la zona de divergencia genética de *Mesodesma* coincide con la zona de diferenciación genética para otras especies del intermareal chileno lo podría validar la presencia actual o ancestral de una barrera al flujo genético en la costa chilena. Sin embargo, no se han obtenido fechas de separación en las otras especies como para calcular el tiempo de separación de los grupos encontrados por lo que este estudio sería el primero en estimar una fecha de divergencia a partir de datos genéticos del evento que separó las poblaciones.

La presencia de dos grupos con patrones poblacionales similares permite estudiar de manera independiente los efectos de la fuerte explotación a la que está sometido este recurso. Asimismo permite determinar políticas de repoblamiento más adecuadas dentro del país.

BIBLIOGRAFÍA

Apte, S. and J.P.A.Gardner. 2002. Population genetic subdivision in the New Zealand greenshell mussel (*Perna canaliculus*) inferred from single-strand conformation polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 11:1617-1628.

Avalos H. y J. Rodríguez. 1994. Periodo alfarero en el interfluvio costero Petorca-Quilimarí. *Actas del 2º Taller de Arqueología de Chile Central*. 1-13.

Avaria, S., J.Carrasco, J. Rutllant, and E. Yañez. 2004. El Niño-La Niña 1997-2000. Sus Efectos en Chile. CONA, Valparaíso, Chile.

Avise, J.C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA Bridge between population genetics and systematics. *Annual Review Ecology and Systematics* 18:489-522.

Avise, J.C. 1992. Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos* 63:62-76.

Avise JC (2000) *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Ayres K.L. and J.M.Waters. 2005. Marine biogeographic disjunction in central New Zealand. *Marine Biology*. 147:1045-1052.

Baco A.R., Smith C.R., Peek A.S., Roderick G.K. and R.C. Vrijenhoek. 1999. The phylogenetic relationships of whale-fall vesicomyd clams based on mitochondrial COI DNA sequences. *Marine Ecology Progress Series* 182:137-147.

Bandelt HJ, Forster P & Röhl A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48

Bargelloni, L., Zane, L. and Derome N. 2000. Molecular zoogeography of Antarctic euphausiids and notothenioids: from species phylogenies to intraspecific patterns of genetic variation. *Antartic Science*. 12: 259-268.

Barriga, E. and M. Quiroy. 2002. Impacts of El Niño and La Niña Events on the populations of clam (*Mesodesma donacium*, Lamarck 1818) along the Southern Peruvian coast. *Investigaciones marítimas* 30:134-135.

Bert, T.M. and W.S.Arnold. 1995. An empirical test of predictions of two competing models for the maintenance and fate of hybrid zones: both models are supported in a hard-clam hybrid zone. *Evolution* 49:276-289.

Bert, T.M. and Harrison, R.G. 1988. Hybridization in western Atlantic stone crabs (genus *Menippe*): evolutionary history and ecological context influence species interactions. *Evolution* 42:528-544.

Brattstrom, H. and A. Johanssen. 1983. Ecological and regional zoogeography of the marine benthic fauna of Chile. *Sarcia* 68:289-339.

Breton S., Dufresne F., Desrosiers G. And P.U.Blier. 2003. Population structure of two hemispheric polychaetes, *Neanthes virens* and *Hediste diversicolor* (Nereididae) with different life-history traits. *Marine Biology* 142:707-715.

Broitman BR, Navarrete SA, Smith F & SD Gaines. 2001. Geographic variation of southeastern Pacific intertidal communities. *Marine Ecology Progress Series* 224: 21-34.

Burton R.S. 1998. Intraspecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. *Evolution*. 52(3):734-745.

Camus, P. A. 2001. Biogeografía marina de Chile continental. *Revista Chilena de Historia Natural* 74:587-617.

Carstensen D., Oliva M., Sielfeld W. and J.Laudien Larval development of *Mesodesma donacium* ("macha"). Poster CENSOR.

Castilla, J.C., Collins A.G., Myer C.P., Guíñez R. and D.R.Linberg . 2002. Recent introduction of the dominant tunicate, *Pyura praeputialis* (Urochordata, Pyuridae) to Antofagasta, Chile. *Molecular Ecology* 11(8): 1579-1584.

Castilla J.C., Lagos N., Guíñez R. & J.Largier. 2002. En: The oceanography and ecology of the nearshore and Bays in Chile. Proceedings of the international symposium on linkages and dynamics of coastal systems: Open Coast and Enbayments, Santiago, Chile 2000. J.C. Castilla & J. Largier (Eds.). Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.

Dawson M.N. 2001. Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? *Journal of Biogeography*. 28(6):723-736.

Del Río, C. 1995. The Genus *Swiftopecten* HERTLEIN, 1936, (Bivalvia: Pectinidae) in the Tertiary of Southern South America. *Journal of Paleontology*. 1054-1059.

Del Río, C. 2002. Las Provincias malacológicas miocenas y recientes del Atlántico sudoccidental. *Anales de Biología*. 24:121-130.

Del Río, C. 2004. Relaciones Biogeográficas entre los moluscos del Mioceno tardío y reciente del Atlántico sudoccidental. *INSUGEO*. 12: 39-44

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47- 50.

Figueroa, D. and C. Moffat. 2000. On the influence of topography in the induction of coastal upwelling along the Chilean coast., *Geophys. Res. Lett.* 27: 3905-3908.

Filatov D.A. 2002. Proseq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* 2:621-624.

Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R. and R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3(5):294-299.

Frassinetti D. and C. Covacevich. 1999. Invertebrados fósiles marinos de la formación Guadal (Oligoceno Superior – Mioceno Inferior) en Pampa Castillo. Región de Aisén, Chile. Servicio Nacional de Geología y Minería. Boletín N° 51:1-96.

Frassinetti D. 2000. Moluscos del Plioceno superior marino de isla Guafo, sur de Chile. Parte II. Gastrópoda. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*. 49:131-161.

Frassinetti D. 2004. Moluscos fósiles del Mioceno marino de isla Ipún, sur de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*. 53:71-83.

González E. 2001. Informe final. Estudio N° P38 Identificación y sistematización de conflictos y vías de solución en el establecimiento y administración de áreas de manejo y explotación de recursos bentónicos en Chile: el caso de Playa Ritoque y Farallones de Concón en la Vª Región. 1-35.

Guzmán N., Marquardt C., Ortlieb L. y D. Frassinetti. 2000. La malacofauna Neogena y Cuaternaria del área de Caldera (27°-28°S): especies y rangos bioestratigráficos. IX Congreso Geológico Chileno. Actas 1(3): 476-481.

Herm D. 1969. Marines Pliozän und Pleistozän in Nord- und Mittel- Chile unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklung der Mollusken-Faunen. Zitteliana 2(18):1-159.

Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature. 405:907-914.

Jaramillo, E., M. Pino, L. Filun, and M. González. 1994. Longshore distribution of *Mesodesma donacium* (Bivalvia: Mesodesmatidae) on a sandy beach of the South of Chile. The Veliger 37:192-200.

Jaramillo E., Fernández M., Marquet P., Camus P., Vásquez J., Figueroa D., Duarte C., Valdovinos C., Ojeda P., Lagos N., Lancellotti D., Contreras H. y W.Riesco. 2006. Informe Final. Actualización y validación de la clasificación de las zonas biogeográficas litorales. Proyecto FIP N°2004-28. Universidad Austral de Chile.

Jerez G., Ariz L., Baros V., Olguín A., Gonzalez J., Oliva J., Ojeda V. y E. Díaz. 1999. Informe Final FIP N°97-33 Estudio biológico pesquero del recurso macha en la I y III regiones. Instituto de Fomento Pesquero. 1-182.

Johnson S., Young C., Jones W., Waren A., and R. Vrijenhoek. 2006. Migration, isolation, and speciation of hydrothermal vent limpets (Gastropoda; Lepetodrilidae) across the Blanco Transform Fault. *Biological Bulletin*. 210: 140–157.

Kojima S., Segawa R., Kobayashi T., Hashimoto T., Fujikura K., Hashimoto J. and S. Ohta. 1995. Phylogenetic relationships among species of *Calpytogenia* (Bivalvia: Vesicomidae) collected around Japan revealed by nucleotide sequences of mitochondrial genes. *Marine Biology* 122:401-407.

Lancellotti D.A. and J.A.Vásquez. 1999. Biogeographical patterns of benthic macroinvertebrates in the Southeastern Pacific littoral. *Journal of Biogeography* 26:1001-1006.

Lapègue S., Ben Salah I. and F.I.Batista. 2006. Phylogeographic study of the oyster, *Ostreola stentina*, from Morocco, Portugal and Tunisia: evidence of a geographic disjunction with the closely related taxa, *Ostrea aypouria* and *Ostreola equestris*. *Marine Biology* 150: 103-110

Launey, S., C. Ledu, F. Bonhomme, and Y. Naciri-Graven. 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *The Journal of Heredity* 93:331-338.

Lessios H.A., Kessing B.D. and J.S. Pearse. 2001. Population structure and speciation in tropical seas: global phylogeography of the sea urchin *Diadema*. *Evolution* 55(5):955-975

Marins, L. F., and J. A. Levy. 1999. High genetic distance between marine bivalves of the genus *Mesodesma* inhabiting the Atlantic and Pacific coasts of South America. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 124:313-319.

Martínez S. 1988. Los depósitos de la “Transgresión Entrerriana” (Mioceno de Argentina , Brasil y Uruguay). Comparación de sus principales áreas fosilíferas a través de los Bivalvos y Gastrópodos.

Ameghiniana (Revista Asociación Paleontológica Argentina) 25(1): 23-29.

Miranda, C. M. 2001. La desaparición del banco de machas *Mesodesma donacium* (Lamarck, 1818) (Mollusca: Bivalvia: Mesodesmatidae) en la bahía de Coquimbo IV Región, Chile: sus probables causas. Universidad Católica del Norte, Coquimbo.

Nei, M., 1987 *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.

NETWORK 4.5.0.1.Fluxus Technology Ltda. En www.fluxusengineering.com

Ortiz M.A. y W.B.Stotz. 1996. Distribución de juveniles recientemente asentados de *Mesodesma donacium* (Lamarck, 1818) (Mollusca: Bivalvia: Mesodesmatidae) en tres bahías de la cuarta región: variables físicas y químicas que le caracterizan. *Biología Pesquera*. 25:27-40.

Osorio, C., and N. Bahamonde. 1968. Los moluscos Bivalvos en las pesquerías nacionales Chilenas. *Biología Pesquera* 3:69-128.

Palumbi, S. 1992. Marine speciation on small planet. *Trends in Ecology and Evolution*. 7:114-118.

Palumbi S. 1994. Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 25:547-572.

Palumbi S. 1996. What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 203:75-92

Patarnello, T., Volckaert, F. & Castilho, R. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*. 16: 4426-4444.

Posada, D. and Crandall K.A. 1998. Modeltest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.

Quiroz M. y A. Tejada. 2004. Informe Técnico “Evaluación del recurso macha (*Mesodesma donacium*) en el litoral de la Provincia de Islay - Región Arequipa” Instituto del Mar del Perú. Laboratorio Costero de Ilo. 1-15.

Reeb, C. A., and J. C. Avise. 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124:397-406.

Rogers AR & Harpending HC. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. 9:552-569

Rozas, J., J. C. Sánchez-Delbarrio, X. Messeguer, and R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Second Edition edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Secondi J., Faivre B. and S.Bensch. 2006. Spreading introgression in the wake of a moving contact

Zone. *Molecular Ecology* 15: 2463–2475.

SERNAP 1989-2003. Anuario estadístico de pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Chile.

Smith, P.J., MacArthur, G. J., Michael, K.P. 1989. Regional variation in electromorph frequencies in the tuatua, *Paphies subtriangulata*, around New Zealand. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 23:27-33.

Stotz, W., D. Lancellotti, K. Lohrmann, E. Von Brand, J. Aburto, L. M. Caillaux, M. Valdebenito, L. Rodriguez, P. Araya, y C. Cerda. 2003. Informe final Proyecto FIP 2001-24 Repoblamiento de bancos de macha en playa "Las Machas" de Arica, I región. Universidad Católica del Norte. Grupo de Ecología y Manejo de Recursos.

Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tarifeño, E. 1980. Studies on the biology of the surf-clam *Mesodesma donacium* (Lamarck, 1818) (Bivalvia: Mesodesmatidae) from Chilean sandy beaches. Doctoral Thesis. University of California, Los Angeles.

Vandewoestijne S., Baguette M., Brakefield P.M. & I.J. Saccheri. 2004. Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. Molecular Phylogenetics and Evolution. 31:630-646.

von Ihering, H. 1907. Les mollusques fossiles du Tertiaire et du Cretace superieur de l'Argentina. An.Mus.Nac.Bs.As.Ser.III 7:1-611

Wise J., Harasewych M.G. and R.T. Dillon Jr. 2004. Population divergence in the sinistral whelks of North America, with special reference to the east Florida ecotone. *Marine Biology*. 145:1167-1179.