



**CONSERVACIÓN DE LAS POBLACIONES DE BIVALVOS NATIVOS  
(MOLLUSCA: BIVALVIA: UNIONOIDA) EN ARGENTINA**

*Variabilidad morfológica y molecular y distribución de Diplodon delodontus  
(Lamarck, 1819) (Hyriidae)*

Lic. LUCIANA M. CAO

Directores Dr. Gustavo A. Darrigran y Dra. M. Cristina Damborenea

Tesis del Doctorado en Ciencias Naturales

Año 2020

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano.”

Isaac Newton

“La educación pública es un derecho, no un privilegio.”

Anónimo

A mis mentoras, siempre presentes.  
Adriana, Beatriz, Noemí, Mónica y Stella.

**RESUMEN**

PÁG. 10

**ABSTRACT**

PÁG. 12

**AGRADECIMIENTOS**

PÁG. 14

**CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN**

PÁG. 15

**1.1. SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD****1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN****1.3. FISIOLOGÍA Y CICLO DE VIDA****1.4. CONSERVACIÓN****1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS****CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

PÁG. 45

**2.1. MATERIAL ESTUDIADO****2.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS: *Morfometría geométrica*****2.3. ANÁLISIS MOLECULARES****2.4. FIGURAS****2.5. TABLAS****CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DE *Diplodon***

PÁG. 63

**3.1. RESUMEN****3.2. INTRODUCCIÓN****3.3. MATERIALES Y MÉTODOS****3.4. RESULTADOS****3.5. DISCUSIÓN****3.6. FIGURAS****3.7. TABLAS**

# ÍNDICE

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

PÁG. 88

**4.1. RESUMEN**

**4.2. INTRODUCCIÓN**

**4.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

**4.4. RESULTADOS**

**4.5. DISCUSIÓN**

**4.6. FIGURAS**

**4.7. TABLAS**

## **CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA**

PÁG. 110

**5.1. RESUMEN**

**5.2. INTRODUCCIÓN**

**5.3. MATERIALES Y MÉTODOS**

**5.4. RESULTADOS**

**5.5. DISCUSIÓN**

**5.6. FIGURAS**

**5.7. TABLAS**

## **CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES**

PÁG. 129

## **REFERENCIAS**

PÁG. 132

## **ANEXO**

PÁG. 144

1.1.1	Filogenia de Bivalvia, tomada de Graf y Cummings (2006).	PÁG. 20
1.1.2	Hipótesis de relaciones filogenéticas dentro de Unionoidea. Modificada de Graf & Cummings (2006).	PÁG. 20
1.1.3	Valvas izquierda (izquierda) y derecha (derecha) del holotipo de <i>Diplodon ellipticus</i> . Tomada de Miyahira et al. (2013). Arriba: cara externa; abajo: cara interna.	PÁG. 21
1.1.4	Valvas izquierda (izquierda) y derecha (derecha) del ejemplar tipo de <i>Diplodon delodontus</i> USNM_150390. Arriba: cara externa; abajo: cara interna. Cortesía de Robert Hershler, curador de Malacología del Museo Nacional de Historia Natural del Instituto Smithsonian.	PÁG. 21
1.2.1	Mapa de las subregiones de América del Sur basadas en la distribución de bivalvos de agua dulce. Tomado de Graf & Cummings (2019).	PÁG. 27
1.2.2	Distribución a nivel global de la familia Hyriidae tomada de Graf & Cummings (2019). La porción en verde representa la diversidad relativa de especies actuales de la familia en relación al total de especies de unionoideos.	PÁG. 27
1.2.3	Mapas de distribución de los géneros de Hyriidae presentes en Argentina. A) <i>Diplodon</i> ; B) <i>Castalia</i> . Los puntos negros indican registros para cada género. Las áreas azules muestran las cuencas de drenaje superficial con presencia de hídros. Tomados de Torres et al (2018).	PÁG. 28
1.2.4	Distribución de <i>Diplodon delodontus</i> tomada de Graf & Cummings (2019).	PÁG. 29
1.2.5	Mapa de la Cuenca del Plata y sus subcuencas. Modificado del sitio oficial del Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata (CIC Cuenca del Plata, 2019).	PÁG. 30
1.2.6	Detalle del área de la Cuenca del Plata y sus subcuencas (izquierda) y perteneciente a cada país (derecha). Tomado de CIC Cuenca del Plata (2019),	PÁG. 30
1.2.7	A) Mapa de las cuencas hidrográficas de Argentina generado con los datos del portal del Programa 2Mp (CONAE-2Mp, 2020); B) Mapa de las regiones biogeográficas basadas en bivalvos de agua dulce. Modificado de Bonetto (1960). Las escalas representan las unidades de mapa.	PÁG. 31
1.2.8	Mapas de las regiones biogeográficas. A) Basado en la distribución de gasterópodos de agua dulce. Tomado de Núñez et al. (2010). 1) Misionera; 2) Paraná Medio; 3) Río Uruguay; 4) Paraná Inferior - Río de la Plata; 5) Central; 6) Cuyo; 7) Patagonia Norte; 8) Patagonia Sur. Patrón diagonal: Zona de Transición. Patrón vertical: cuencas no asociadas a ninguna región. Área blanca: cuencas sin registros y no asociadas a ninguna región. B) Basado en la distribución de peces de agua dulce. Tomado de López et al. (2002). 1) Misionera; 2) Eje Potámico Subtropical; 3) Río Uruguay Inferior; 4) Paranoplatense Este; 5) Endorreica Central; 6) Paranoplatense Oeste; 7) Salado del Sur-Vallimanca; 8) Drenaje Atlántico Bonaerense; 9) Subandina-Cuyana; 10) Patagónica; 11) Somuncurá.	PÁG. 32
1.3.1	A) Anatomía interna de <i>Diplodon rhombeus fontainianus</i> (d'Orbigny, 1835). Modificado de Avelar & Cunha (2009); B) Corte transversal de <i>Pseudodontoideus connasaugaensis</i> (Lea, 1858) (Unionidae, Anodontini) a la altura de la línea anaranjada de la figura A; C) detalle de la branquia eulamelibranquia de <i>Pseudodontoideus connasaugaensis</i> . Figuras B y C modificadas de Mcelwain & Bullard (2014).	PÁG. 35
1.3.2	Ciclo de vida generalizado de los bivalvos unionoideos con larva gloquidio parásita. Modificado de Modesto et al. (2018).	PÁG. 36
1.3.3	Gloquidio. A) Esquema de la estructura general modificado de Mansur (1999).	PÁG. 37
1.3.4	Gloquidio de <i>Diplodon delodontus</i> . Imágenes tomadas de Bonetto & Ezcurra (1963). Escala=100µm.	PÁG. 37
1.4.1	Categorías de Riesgo establecidas por el Subcomité de Estándares y Peticiones de la IUCN (2017).	PÁG. 40
2.4.1	Sitio de muestreo en el balneario El Retobado, arroyo Yuquerí Grande, Entre Ríos.	PÁG. 57
2.4.2	Configuración de <i>landmarks</i> (puntos rojos) y <i>semilandmarks</i> (puntos amarillos) sobre la valva izquierda de un ejemplar de <i>Diplodon</i> para el análisis preliminar.	PÁG. 58
2.4.3	A) Centroides de un polígono de cuatro puntos. Tomada de Mitteroecker et al. (2013). B) Relación entre la altura y el ancho, en escala logarítmica, en un conjunto de triángulos. Tomada de Klingenberg (2016). Línea roja: alometría de la altura respecto del ancho; Línea azul: alometría del ancho respecto de la altura. Línea gris: crecimiento isométrico.	PÁG. 58
2.4.4	Hipótesis sobre el mecanismo de herencia en bivalvos que presentan DUI. Modificado de Passamonti & Ghiselli (2009).	PÁG. 59
2.4.5	Hipótesis sobre la evolución del DUI en unionoideos. Tomada de Hoeh et al. (2002).	PÁG. 59

## ÍNDICE DE FIGURAS

3.6.1	Configuración consenso del material tipo del género <i>Diplodon</i> . Las flechas representan la desviación de los <i>landmarks</i> en los ejemplares estudiados.	PÁG. 72
3.6.2	Análisis de regresión de la variación morfométrica en función del tamaño del centroide, transformado a su logaritmo en base 10, para los ejemplares tipo de las especies del género <i>Diplodon</i> . Puntos verdes= <i>D. (Diplodon)</i> ; puntos azules= <i>D. (Rhipidodonta)</i> ; puntos rojos= <i>D. (Australis)</i> ; puntos negros= grupo Indefinido.	PÁG. 72
3.6.3	Porcentajes de varianza aportados por cada componente principal en el Análisis de Componentes Principales para los ejemplares tipo de las especies del género <i>Diplodon</i> consideradas para este Trabajo de Tesis Doctoral.	PÁG. 73
3.6.4	Resultados del Análisis de Componentes Principales comparando subgéneros del género <i>Diplodon</i> . En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó cada grilla de deformación.	PÁG. 73
3.6.5	Resultados del Análisis de Variables Canónicas comparando los subgéneros del género <i>Diplodon</i> Las elipses muestran agrupamientos con probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) Con el total de 40 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó cada grilla de deformación; B) analizando los primeros 6 Componentes Principales. En el eje X se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=2,5. En el eje Y se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=1,5.	PÁG. 74
3.6.6	Resultados del análisis discriminante entre los grupos <i>D. (Diplodon)</i> (barras rosas) y <i>D. (Rhipidodonta)</i> (barras violetas) realizado con el material tipo del género <i>Diplodon</i> . A) distribución de frecuencias de los valores discriminantes; B) Frecuencia de los valores discriminantes en la validación cruzada.	PÁG. 75
3.6.7	Resultados del análisis discriminante entre los grupos <i>D. (Diplodon)</i> (barras rosas) y <i>D. (Rhipidodonta)</i> (barras violetas) realizado con el material del género <i>Diplodon</i> de Argentina. A) distribución de frecuencias de los valores discriminantes; B) Frecuencia de los valores discriminantes en la validación cruzada.	PÁG. 76
3.6.8	Configuración consenso para los ejemplares del género <i>Diplodon</i> de Argentina. Las flechas representan la desviación de los <i>landmarks</i> en los ejemplares estudiados.	PÁG. 77
3.6.9	Análisis de regresión de la variación morfométrica en función del tamaño del centroide transformado a su logaritmo en base 10 para los ejemplares del género <i>Diplodon</i> de Argentina, agrupados por especie. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación.	PÁG. 77
3.6.10	Porcentajes de varianza aportados por cada Componente Principal en el Análisis de Componentes Principales, para el conjunto de ejemplares del género <i>Diplodon</i> de Argentina.	PÁG. 78
3.6.11	Resultados del Análisis de Componentes Principales de los ejemplares del género <i>Diplodon</i> de Argentina. En cada eje se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=0,15.	PÁG. 78
3.6.12	Resultados del Análisis de Variables Canónicas comparando especies del género <i>Diplodon</i> de Argentina. Las elipses muestran agrupamientos con probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) Con el total de 76 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó cada grilla de deformación; B) utilizando los primeros 3 Componentes Principales. En el eje X se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=6. En el eje Y se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=2,5.	PÁG. 79
3.6.13	Dendrograma del análisis de conglomerados de especies del género <i>Diplodon</i> a partir de distancias de Mahalanobis, representadas por la escala. La línea vertical representa el valor de significación para el conjunto estudiado.	PÁG. 80
4.6.1	Vista interna de la valva izquierda de los morfotipos identificados en el conjunto de ejemplares del género <i>Diplodon</i> analizado. 1) <i>D. aff parallelopipedon</i> ; 2) <i>D. aff wymanii</i> ; 3) <i>D. aff rhuacoicus</i> ; 4) <i>D. aff burroughianus</i> .	PÁG. 98
4.6.2	Electroforesis de la PCR para el fragmento COI de los ejemplares de <i>Diplodon sp</i> analizados. El número corresponde a cada individuo. Calle 1: <i>ladder</i> 1Kb.	PÁG. 99
4.6.3	Árbol consenso óptimo obtenido mediante el método de Neighbour Joining entre los ejemplares del género <i>Diplodon</i> y de <i>Castalia ambigua</i> (outgroup) estudiados. Longitud de ramas total =4,26. Los valores del test de <i>Bootstrap</i> se brindan junto a cada rama.	PÁG. 100
4.6.4	Árbol consenso óptimo obtenido mediante el método de Maximum Likelihood entre los ejemplares del género <i>Diplodon</i> y de <i>Castalia ambigua</i> (outgroup) estudiados. Los valores del test de <i>Bootstrap</i> se brindan junto a cada rama.	PÁG. 101
4.6.5	Configuración consenso para los ejemplares del género <i>Diplodon</i> del arroyo Yuquerí Grande. Las flechas representan la desviación de los <i>landmarks</i> en los ejemplares estudiados.	PÁG. 102

<b>4.6.6</b>	Análisis de regresión de la variación morfométrica en función del logaritmo en base 10 del tamaño del centroide para los ejemplares de <i>Diplodon</i> sp. del arroyo Yuquerí Grande. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación.	PÁG. 102
<b>4.6.7</b>	Porcentajes de Varianza aportados por cada componente principal en el Análisis de Componentes Principales del conjunto de <i>Diplodon</i> sp. del arroyo Yuquerí Grande.	PÁG. 103
<b>4.6.8</b>	Resultados del Análisis de Componentes Principales del material de <i>Diplodon</i> sp. del arroyo Yuquerí Grande, comparando morfotipos. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación.	PÁG. 103
<b>4.6.9</b>	Resultados del Análisis Canónico de ejemplares del género <i>Diplodon</i> del arroyo Yuquerí Grande comparando morfotipos. Las elipses muestran agrupamientos con probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) utilizando el total de 19 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación; B) utilizando los primeros 5 Componentes Principales. En el eje X se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=7,5. En el eje Y se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=3,2.	PÁG. 104
<b>4.6.10</b>	Resultados del análisis de conglomerados para los ejemplares del género <i>Diplodon</i> del arroyo Yuquerí Grande a partir de distancias de Mahalanobis, representadas por la escala. La línea vertical representa el valor de significación para el conjunto estudiado.	PÁG. 105
<b>5.6.1</b>	Mapa de procedencia de los lotes de <i>Diplodon delodontus</i> analizados. Los puntos corresponden a la ubicación de cada lote en Argentina.	PÁG. 118
<b>5.6.2</b>	Configuración consenso para los ejemplares de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina. Las flechas representan la desviación de los <i>landmarks</i> en los ejemplares estudiados.	PÁG. 119
<b>5.6.3</b>	Análisis de regresión de la variación morfométrica en función del tamaño del centroide transformado a su logaritmo en base 10, para la muestra estudiada (63 ejemplares) de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación.	PÁG. 119
<b>5.6.4</b>	Porcentajes de Varianza aportados por cada componente principal en el Análisis de Componentes Principales de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina.	PÁG. 120
<b>5.6.5</b>	Resultados del Análisis de Componentes Principales de los ejemplares de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación. A) Clase 1; B) Clase 2; C) Clase 3.	PÁG. 121
<b>5.6.6</b>	Resultados del Análisis de variables Canónicas de los ejemplares de <i>D. delodontus</i> de Argentina comparando agrupaciones de la Clase 1 (sistemas de cuencas). Las elipses representan agrupaciones con una probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) con 61 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación; B) utilizando los primeros 7 Componentes Principales.	PÁG. 122
<b>5.6.7</b>	Resultados del Análisis de Variables Canónicas de los ejemplares de <i>D. delodontus</i> de Argentina comparando agrupaciones de la Clase 2 - regiones establecidas por Bonetto (1960). Las elipses representan agrupaciones con una probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) con 61 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación; B) utilizando los primeros 5 Componentes Principales.	PÁG. 123
<b>5.6.8</b>	Resultados del Análisis de Variables Canónicas de los ejemplares de <i>D. delodontus</i> de Argentina comparando agrupaciones de la Clase 3 - regiones establecidas por Núñez et al. (2010). Las elipses representan agrupaciones con una probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) con 61 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación; B) utilizando los primeros 7 Componentes Principales.	PÁG. 124
<b>A1</b>	Valvas izquierdas en vista interna de los ejemplares tipo de las especies del género <i>Diplodon</i> .	PÁG. 147
<b>A2</b>	Etiquetas de los lotes de los ejemplares tipo de las especies del género <i>Diplodon</i> .	PÁG. 148

## ÍNDICE DE TABLAS

1.1.1	Géneros que componen la familia Hyriidae según Mollusca Base (2020).	PÁG. 22
1.1.2	Especies válidas de Hyriidae en Argentina.	PÁG. 22
1.1.3	Especies de <i>Diplodon</i> mencionadas (X) y no mencionadas (-) según distintas fuentes consultadas. *Considerada dentro del género <i>Rhipidodonta</i> ; (?)= figura como dudoso en la publicación.	PÁG. 23
1.4.1	Criterios utilizados para establecer la categoría de riesgo para una especie (Subcomité de Estándares y Peticiones de la IUCN (2017)).	PÁG. 41
1.4.2	Especies de <i>Diplodon</i> categorizadas según los criterios de la IUCN (2020).	PÁG. 42
2.5.1	Listado de los <i>landmarks</i> y <i>semilandmarks</i> seleccionados para el análisis morfométrico.	PÁG. 60
2.5.2	Secuencias moleculares de ejemplares asignados al género <i>Diplodon</i> accesibles en GenBank y utilizadas en el análisis molecular.	PÁG. 61
2.5.3	<i>Primers</i> utilizados para el análisis molecular. pb=pares de bases.	PÁG. 61
2.5.4	Composición de la mix de 10µL y 25µL para PCR por muestra de ADN.	PÁG. 61
2.5.5	Proceso de ciclado para cada <i>primer</i> utilizado en el análisis molecular.	PÁG. 62
3.7.1	Ejemplares tipo de especies del género <i>Diplodon</i> utilizados en el análisis morfométrico. Se indica en qué subgénero ha sido ubicado, institución y número de catálogo de los ejemplares y la localidad tipo proveniente de la etiqueta. ANSP= Academy of Natural Sciences of Drexel University; BMNH= Natural History Museum of London; CM= Carnegie Museum of Natural History; FMNH= Field Museum of Natural History; MZL= Musée de Zoologie Lausanne, MNHN= Muséum national d'Histoire naturelle; SMF= Senckenberg Naturmuseum Frankfurt; UMMZ= University of Michigan Museum of Zoology; USNM= Smithsonian National Museum of Natural History; ZMB= Berlin Museum für Naturkunde; ZSM= Zoologische Staatssammlung München.	PÁG. 81
3.7.2	Resultados del análisis de regresión (test de alometría) entre la variación morfométrica y el tamaño del centroide. A) Para el material tipo de las especies del género <i>Diplodon</i> ; B) para el conjunto de ejemplares del género <i>Diplodon</i> de Argentina. SC= Suma de Cuadrados.	PÁG. 83
3.7.3	Varianza de las Variables Canónicas (VC) para el material tipo de las especies del género <i>Diplodon</i> . A) Análisis con el total de 40 Componentes Principales; B) análisis con los primeros 6 Componentes Principales.	PÁG. 83
3.7.4	Distancias de Mahalanobis entre los subgéneros <i>Diplodon</i> ( <i>Diplodon</i> ), <i>D.</i> ( <i>Rhipidodonta</i> ) y el grupo "Indefinido" y su valor de probabilidad (p) asociado para 10000 permutaciones. En rojo se indican los valores significativos.	PÁG. 84
3.7.5	Resultados de la clasificación cruzada en el Análisis de Variables Canónicas entre los subgéneros <i>Diplodon</i> ( <i>Diplodon</i> ), <i>D.</i> ( <i>Rhipidodonta</i> ).	PÁG. 84
3.7.6	Varianza de las variables canónicas (VC) para los ejemplares del género <i>Diplodon</i> de Argentina. A) Análisis con el total de 40 Componentes Principales; B) análisis con los primeros 3 Componentes Principales.	PÁG. 85
3.7.7	Distancias de Mahalanobis y probabilidad asociada (p) del Análisis de Variables Canónicas para los ejemplares del género <i>Diplodon</i> de Argentina. Los números en rojo indican un valor de probabilidad menor a 0,05 (significativo).	PÁG. 86
3.7.8	Resultados de la clasificación cruzada en el Análisis Canónico para las especies del género <i>Diplodon</i> de Argentina.	PÁG. 87
4.7.1	Ejemplares de <i>Diplodon</i> sp. utilizados para el análisis molecular y morfométrico. Promedio de los valores de cuantificación de ADN obtenidos en la extracción. Con asterisco (*) los individuos excluidos <i>a posteriori</i> . Los valores faltantes corresponden a medidas incongruentes. MLP-Ma= número de catálogo de ejemplar en la Colección Malacológica de la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata (FCNyM-UNLP), Argentina.	PÁG. 106
4.7.2	Números de catálogo de los ejemplares de <i>Diplodon</i> sp. ingresados a la colección malacológica del MLP.	PÁG. 107
4.7.3	Composición de bases de las secuencias del género <i>Diplodon</i> y de <i>Castalia ambigua</i> analizadas en este Trabajo de Tesis Doctoral.	PÁG. 108
4.7.4	Resultados del análisis de regresión (test de alometría) entre las coordenadas de Procrustes y el tamaño del centroide para los de ejemplares del género <i>Diplodon</i> del arroyo Yuquerí Grande. Se brinda el valor de probabilidad para diez mil permutaciones. SC= Suma de Cuadrados.	PÁG. 109

<b>4.7.5</b>	Varianza de las variables canónicas (VC) para los ejemplares del género <i>Diplodon</i> del arroyo Yuquerí Grande. A) Análisis con el total de 19 Componentes Principales; B) utilizando los primeros 5 Componentes Principales.	PÁG. 109
<b>4.7.6</b>	Distancias de Mahalanobis entre morfotipos para los de ejemplares del género <i>Diplodon</i> del arroyo Yuquerí Grande y su valor de probabilidad (p) asociado. En rojo los valores por debajo del 0,05 de valor de probabilidad.	PÁG. 109
<b>4.7.7</b>	Resultados de la clasificación cruzada entre morfotipos del género <i>Diplodon</i> .	PÁG. 109
<b>5.7.1</b>	Material utilizado en el análisis de <i>Diplodon delodontus</i> . MACN= Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"; MLP= Museo de La Plata.	PÁG. 125
<b>5.7.2</b>	Clasificación espacial de las localidades de los 20 lotes de <i>D. delodontus</i> de Argentina.	PÁG. 126
<b>5.7.3</b>	Resultados del análisis de regresión (test de alometría) entre las coordenadas de Procrustes y el tamaño del centroide para los ejemplares de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina. SC= Suma de Cuadrados.	PÁG. 127
<b>5.7.4</b>	Varianza de las variables canónicas de cada clase para los ejemplares de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina, en el Análisis Canónico con el total de 61 Componentes Principales.	PÁG. 127
<b>5.7.5</b>	Distancias de Mahalanobis y su valor de probabilidad (p) entre las agrupaciones para el Análisis Canónico por clases, para los ejemplares de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina. En rojo se expresaron los valores de probabilidad menores que 0,05.	PÁG. 127
<b>5.7.6</b>	Varianza de las variables canónicas de cada clase para los ejemplares de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina, en el Análisis Canónico con los primeros 7 Componentes Principales para la Clase 1, los primeros 5 Componentes Principales para la Clase 2 y los primeros 7 Componentes Principales para la Clase 3.	PÁG. 128
<b>5.7.7</b>	Resultados de la clasificación cruzada para el conjunto de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina.	PÁG. 128
<b>A1</b>	Especies de unionoideos presentes en las regiones de América del Sur establecidas por Graf & Cummings (2019). El asterisco (*) corresponde a especies endémicas de cada región mencionada.	PÁG. 145
<b>A2</b>	Ejemplares del género <i>Diplodon</i> de Argentina analizados. MLP= Museo de La Plata, MACN= Museo Nacional de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia".	PÁG. 149
<b>A3</b>	Aporte de cada Componente Principal (CP) a la variabilidad total del material tipo de las especies del género <i>Diplodon</i> .	PÁG. 152
<b>A4</b>	Aporte (eigenvalor) de cada Componente Principal (CP) a la variabilidad total de ejemplares de <i>Diplodon</i> de Argentina.	PÁG. 153
<b>A5</b>	Alineamiento de bases de secuencias del fragmento de COI para el conjunto estudiado.	PÁG. 154
<b>A6</b>	Porcentajes de varianza aportados por cada Componente Principal (CP) en el Análisis de Componentes Principales de los ejemplares de <i>Diplodon</i> sp. del arroyo Yuquerí Grande.	PÁG. 160
<b>A7</b>	Eigenvalores y porcentajes de varianza aportados por cada Componente Principal (CP) en el Análisis de Componentes Principales de los ejemplares de <i>Diplodon delodontus</i> de Argentina.	PÁG. 161

## RESUMEN

Sobre la base de los conocimientos previos, los bivalvos dulciacuícolas unionoideos conforman uno de los grupos en mayor peligro de extinción, por lo cual los estudios sobre su distribución y sistemática son importantes para su conservación. A pesar de esto, se han llevado a cabo pocos estudios en Argentina. El objetivo del siguiente Trabajo de Tesis Doctoral fue realizar aportes al conocimiento de la taxonomía y distribución del género *Diplodon* Spix in Wagner, 1827 (Bivalvia: Unionoidea: Hyriidae) y más específicamente de *Diplodon delodontus* (Lamarck, 1819) en Argentina, abordando los siguientes objetivos específicos: 1) analizar si las variaciones morfométricas de las valvas de ejemplares adultos del género *Diplodon* apoyan las agrupaciones *D. (Rhipidodonta)*, *D. (Diplodon)* y *D. (Australis)* y establecer su estatus taxonómico; 2) identificar los caracteres de la conchilla que permitan la identificación de las especies de *Diplodon* y, a su vez, poner a prueba la validez de dichas especies en Argentina; 3) establecer la variabilidad genética de ejemplares de *Diplodon* sp. del balneario El Retobado, arroyo Yuquerí Grande, Entre Ríos, y contrastar las agrupaciones de los análisis moleculares con el estudio de la morfometría geométrica; 4) determinar si existen diferencias morfométricas entre poblaciones de *Diplodon delodontus* de Argentina, y si las mismas, presentan relación con regiones biogeográficas. Utilizando herramientas bioinformáticas se combinó la ejecución de estudios moleculares con análisis de morfometría geométrica y distribución. El análisis molecular incluyó la comparación de las secuencias de bases del fragmento de ADN mitocondrial que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I (COI). Para la obtención de las secuencias de interés se utilizó la técnica de amplificación por PCR y secuenciación. En los estudios de morfometría geométrica se utilizó el análisis de la variación en la disposición de *landmarks*. Se realizaron ajustes de Procrustes, se calculó la forma consenso entre las muestras y se realizaron Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminantes. A pesar de que se observaron diferencias en la morfología de la conchilla entre *Diplodon (Diplodon)* y *Diplodon (Rhipidodonta)*, los resultados estadísticos no mostraron una agrupación robusta ni tampoco una función discriminante confiable para separar ambos subgéneros. El método utilizado no permitió corroborar la validez de *D. (Australis)* ( $p > 0,05$ ). El análisis comparativo entre las especies del género *Diplodon* de Argentina permitió delimitar a la mayoría en forma significativa. Los resultados apoyaron la sinonimización de *D. fortis* con *D. chilensis* y *D. piceus* con *D. rhuacoicus*. No hubo diferencias significativas entre los ejemplares de *D. chilensis* y los de *D. patagonicus* ( $p = 0,79$ ). La especie mejor delimitada fue *D. parallelopipedon* ( $p < 0,01$  en todas las comparaciones). Los resultados del análisis morfométrico de los ejemplares del arroyo Yuquerí Grande indicaron la presencia de al menos tres especies simpátricas del género *Diplodon*: *D. parallelopipedon*, *D. wymanii*, *D. rhuacoicus* y *D. burroughianus* ( $p < 0,01$ ). El análisis molecular también las separó de manera robusta, relacionando a *D. rhuacoicus* con *D. wymanii* y, en última instancia, con *D. burroughianus*. *D. parallelopipedon* fue la especie más diferenciada en ambos análisis. El análisis de la variabilidad morfométrica de *Diplodon delodontus* corroboró las diferencias entre regiones malacológicas. Se identificaron tres morfotipos: 1) Río Uruguay, 2) Paraná Medio y 3) Paraná Inferior y Río de la Plata. El análisis apoyó la agrupación de los ejemplares del Río Uruguay en un morfotipo más diferenciado morfológicamente ( $p < 0,01$ ), manteniéndose más relacionados aquellos ejemplares localizados en el Río Paraná y en el Río de la Plata. Del Trabajo de Tesis Doctoral expuesto, se pudieron extraer las siguientes conclusiones finales sobre la taxonomía del género *Diplodon*: 1) Si bien los estudios mostraron tendencias

en la variación morfométrica dentro del género *Diplodon*, no se observaron diferencias en la morfología de la conchilla que permitan justificar la separación de las especies del género *Diplodon* en grupos distintos; 2) debido a la metodología aplicada, no fue posible contrastar la validez del subgénero *Diplodon* (*Australis*); 3) se sustentó la sinonimización de *D. fortis* con *D. chilensis* y *D. piceus* con *D. rhuacoicus*; 4) los resultados del análisis de morfometría geométrica no apoyaron la separación entre *D. chilensis* y *D. patagonicus*. Los ejemplares de ambos conjuntos deberán denominarse como *D. chilensis* (Gray, 1828) de acuerdo con el Principio de Prioridad de la Nomenclatura Zoológica. Del estudio comparativo entre datos morfométricos y moleculares, en ejemplares de *Diplodon* sp. del arroyo Yuquerí Grande, se concluyó la separación de los individuos en al menos especies: *D. parallelopipedon*, *D. wymanii*, *D. rhuacoicus* y *D. burroughianus*, siendo *D. parallelopipedon* la especie más diferenciada en ambos análisis. La separación entre *D. wymanii* y *D. rhuacoicus* no fue robusta, pudiendo tratarse de subespecies de la misma especie o de especies estrechamente cercanas. El estudio de la distribución y de la morfometría geométrica de los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina, permitió concluir lo siguiente: 1) se identificaron tres morfotipos correspondientes a: 1) Río Uruguay, 2) Paraná Medio y 3) Paraná Inferior y Río de la Plata; 2) *Diplodon delodontus* se localiza en el Río Paraná y en el Río de la Plata. A su vez, *D. delodontus* incluyó una población ubicada en el Paraná Medio y otra distribuida en el Paraná Inferior y Río de la Plata. Los resultados de este análisis no fueron robustos, por lo que deben ser contrastados con otras evidencias. Por último, se establecieron afirmaciones sobre la metodología y objetivos a futuro: 1) es necesario un estudio filogeográfico que incluya toda la Cuenca del Plata; 2) los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis son base para establecer el estado de conservación de *Diplodon delodontus* en la región; 3) este Trabajo de Tesis Doctoral remarcó la importancia de la combinación de estudios morfológicos con datos de análisis moleculares para el estudio taxonómico de un grupo.

## ABSTRACT

Based on previous knowledge, Unionoida freshwater mussels are one of the most endangered groups, whereby research about their distribution and systematics are important for their conservation. Nevertheless, research on this topic in Argentina is scarce. The main purpose of the following PhD Thesis was to make contributions on the knowledge about taxonomy and distribution of the genus *Diplodon* Spix in Wagner, 1827 (Bivalvia: Unionoida: Hyriidae) and more specifically of *Diplodon delodontus* (Lamarck, 1819) in Argentina, assessing the following specific aims: 1) to analyze if morphometric variability in valves of *Diplodon* adults support *D. (Rhipidodonta)*, *D. (Diplodon)* and *D. (Australis)* groups and establish their taxonomic status; 2) to identify features in valves that allow identification of *Diplodon* species and, at the same time, to test the validity of the taxonomical species in Argentina; 3) to establish genetic variability of *Diplodon* specimens from El Retobado shore in Yuquerí Grande Stream, Entre Ríos Province, to then contrast groups of molecular analysis with groups obtained by morphometric analysis; 4) to determine if different populations of *Diplodon delodontus* from Argentina show morphometric differences, and if those differences match with biogeographical regions. A molecular study with geometric morphometrics and distribution analysis was combined applying bioinformatic tools. Molecular analysis included a comparison of sequences of Citocrome Oxidasa I (COI) mitochondrial DNA fragment. Sequences were obtained by PCR amplification and sequencing techniques. For geometric morphometric studies, variation in landmark positions were analysed. Procrustes adjustments were made, consensus shape between samples was calculated and Principal Component Analysis and Discriminant Analysis were performed. Despite of the differences found between *Diplodon (Diplodon)* y *Diplodon (Rhipidodonta)* shells, statistical results neither show a robust grouping nor a reliable discriminant function para separar ambos subgéneros. The method applied did not support *D. (Australis)* as valid ( $p > 0,05$ ). Comparative analysis between species of *Diplodon* from Argentina allowed significant delimitations for most of the species. Results supported synonymization of *D. fortis* within *D. chilensis* and *D. piceus* within *D. rhuacoicus*. There were not significant differences between *D. chilensis* and *D. patagonicus* specimens ( $p = 0,79$ ). Best delimited species was *D. parallelopipedon* ( $p < 0,01$  in all comparissons). Morphometric analysis of the specimens of *Diplodon* sp. from Yuquerí Grande Stream indicated the presence of at least three different species of *Diplodon*: *D. parallelopipedon*, *D. wymanii*, *D. rhuacoicus* and *D. burroughianus* ( $p < 0,01$ ). Molecular study also showed robust groups, relating *D. rhuacoicus* more closely with *D. wymanii*, and with *D. burroughianus* in last. *D. parallelopipedon* species was the less morphologically and genetically related. Morphometric analysis of *Diplodon delodontus* confirmed the differences between malacological regions. Three morfotypes were identified: 1) Uruguay River; 2) Middle Paraná and 3) Lower Paraná and Río de la Plata River ( $p < 0,01$ ). Analysis of *D. delodontus* specimens supported the presence of a less related morphotype including Uruguay River specimens, showing a closer relationship for those specimens from Paraná River and Río de la Plata River. From the PhD Thesis exposed, the following final conclusions about the taxonomy of *Diplodon* were extracted: 1) Even though morphometric variation within *Diplodon* was observed, the differences in shell morphology did not justify a division in subgenra; 2) the method applied did not support *D. (Australis)* as a valid subgenus; 3) morphometric analysis sustained synonymization of *D. fortis* within *D. chilensis* and *D. piceus* within *D. rhuacoicus*; 4) *D. chilensis* specimens did not show significative differences with *D. patagonicus* specimens, hence they must be called as *D.*

## **ABSTRACT**

*chilensis* (Gray, 1828) by the Priority Principle of Zoological Nomenclature. Comparative analysis of morphometrics and molecular data in specimens of *Diplodon* sp. from Yuquerí Grande stream concluded in classification of individuals into at least three species: *Diplodon parallelopipedon*, *D. wymanii*, *D. rhuacoicus* and *D. burroughianus*, with *D. parallelopipedon* as the most different species by both analyses. *D. wymanii* and *D. rhuacoicus* species were not strongly differentiated. The study of distribution and geometric morphometrics in specimens of *Diplodon delodontus* from Argentina allowed to conclude the following: 1) three morphotypes of *D. delodontus* were identified: 1) Uruguay River; 2) Middle Paraná and 3) Lower Paraná and Río de la Plata River; 2) *D. delodontus* included one population located in Middle Paraná and other one distributed along Lower Paraná and Río de la Plata River. Results from this analysis were not robust. Ultimately, affirmative propositions about methodology and future aims were established: 1) a phylogeographic study including exhaustive molecular sampling along the whole extension of la Plata Basin is necessary; 3) results obtained in this PhD Thesis are basic to establish the conservation status of *D. delodontus* in the region; 4) the importance of combining morphological and molecular studies in taxonomic research is remarkable.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al laboratorio GMP del IMBICE La Plata, a Claudio Bravi por darme la oportunidad de desarrollar mi idea y muy especialmente a Mariela Cuello, quien me enseñó todo lo que debía saber sobre el trabajo en un laboratorio y las técnicas básicas de genética aplicadas en este Trabajo de Tesis, siempre de manera amable, desinteresada y con un trato maternal.

A Federico Márquez del Instituto CEMPAT, Puerto Madryn, quien me instruyó de manera desinteresada en las técnicas de morfometría geométrica y me invitó a pasar un momento muy agradable en su casa con su familia. Me hicieron sentir muy bien recibida.

A Teofânia Vidigal y Hugo Paixao, del Laboratorio de Malacología y Sistemática Molecular del Departamento de Zoología- Instituto de Ciencias Biológicas- Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. Por recibirme en su laboratorio y permitirme obtener en él las secuencias moleculares utilizadas en este Trabajo de Tesis.

A Roberto Vogler y Ariel Beltramino, por sus explicaciones sencillas y su gran criterio para aconsejar en el campo de los estudios moleculares.

A la Secretaría de Posgrado, por su trato servicial y amable durante toda la jornada.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo, el lugar donde elegí ser mi mejor versión.

A la Universidad Nacional de La Plata, por facilitar y defender la educación pública, laica y gratuita.

A la Asociación Grupo Montevideo, la cual me otorgó una beca completa y una ayuda económica para viajar a Belo Horizonte, Brasil y así poder obtener las secuencias moleculares utilizadas en este Trabajo de Tesis.

A Daniela Ruiz, codirectora honoris causa, gestora, consejera, amiga del alma que la Facultad me permitió conocer. No me faltes nunca y espero siempre estar a la altura de nuestra amistad.

En el ámbito personal, a todas las personas que me escucharon, me aconsejaron y/o calmaron mi angustia y mi ansiedad. A todas las personas que no permitieron que me rindiera nunca, a pesar de todos los obstáculos. A los que no dejaron que abandonara el Doctorado y me pusiera a vender ollas. El agradecimiento para estas personas va a ser individual y cara a cara, abrazo y llanto de por medio, como corresponde.

***CAPÍTULO 1***

***INTRODUCCIÓN***

## 1.1. SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD

El orden Unionoidea se ubica dentro del clado Paleoheterodonta (**figura 1.1.1**) y se considera el grupo hermano de los bivalvos marinos del orden Trigonioidea, cuyo único representante actual es el género *Neotrigonia* (Combosch et al. 2016; Graf, 2013; Graf & Cummings, 2006). Según Graf & Cummings (2006) los unionoideos se habrían diversificado durante el Triásico, en un único evento evolutivo a partir de un antecesor marino. Se reconocen seis familias, con un total de 900 especies aproximadamente: Hyriidae, Mycetopodidae, Unionidae, Margaritiferidae, Iridinidae y Etheriidae (Bieler et al. 2010; Graf & Cummings 2006, 2007).

La familia Hyriidae se compone de 17 géneros y 94 especies, aunque el número puede variar según la fuente consultada (**tabla 1.1.1**). Se han realizado estudios filogenéticos para determinar la relación de Hyriidae con las demás familias de unionoideos. En ellos hubo consenso en cuanto a considerarla un grupo monofilético. Bogan & Hoeh (2000) realizaron un árbol filogenético basado en el gen que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I (COI), en el cual Hyriidae resultó como el taxón basal. Graf & Cummings (2006) argumentaron que Hyriidae sería el grupo hermano de un clado formado por las familias gondwánicas Etheriidae, Mycetopodidae e Iridinidae (**figura 1.1.2**). Estos investigadores combinaron el análisis de datos morfológicos y moleculares (de los genes 28S y COI) publicados previamente. Según Bonetto et al. (1986) la similitud en la morfología larval permite asociar a las especies de Hyriidae sudamericanas con las especies australianas. En América del Sur, según la *Mollusca Base* (2020), los géneros representados de esta familia son 8: *Callonaia* Simpson, 1900; *Castalia* Lamarck, 1819; *Castaliella* Simpson, 1900; *Diplodon* Spix in Wagner, 1827; *Paxyodon* Schumacher, 1817; *Prisodon* Schumacher, 1817; *Rhipidodonta* Mörch, 1853; *Triplodon* Spix in Wagner, 1827. En Argentina están presentes los géneros *Diplodon* y *Castalia* (**tabla 1.1.2**) (**figura 1.2.3**).

*Diplodon* Spix in Wagner, 1827 cuyas especies fueron asignadas previamente a su formación al género *Unio* Philipsson in Retzius, 1788, pertenece a la tribu Rhipidodontini Starobogatov, 1970 (Graf & Cummings 2007, Santos-Neto et al. 2016). Este género fue mencionado en el trabajo de Wagner (1827) pero no fue descrito. Wagner tomó el nombre que Spix había creado (y que no pudo publicar debido a una muerte prematura) para designar cuatro sinónimos: *D. ellipticum* Spix, *D. rotundum* Spix, *D. rhombeum* y *D. furcatum* Spix. Sin embargo, Wagner consideraba que la designación correcta de las cuatro especies anteriores era *U. ellipticus* Wagner, *U. rotundus* Wagner, *U. rhombeus* Wagner y *U. caudatus* Wagner, respectivamente. *Diplodon* fue descrito más tarde por Simpson (1914). Posteriormente fueron incorporándose otras especies y las anteriormente mencionadas volvieron a ser parte de *Diplodon*. Las características más sobresalientes del género son la escultura del umbo formada por estrías radiales y charnela compuesta por dientesseudocardinales y laterales. La especie tipo es *D. ellipticus* Spix in Wagner, 1827 y se muestra en la **figura 1.1.3**. A continuación, se brinda la descripción de Simpson (1914) según Castellanos (1960).

*“Valva elíptica, redondeada, alargada o trapezoidal, con umbos bastante bajos, con escultura radial, más o menos definida, superficies laterales curvas, superficie esculturada concéntrica, a veces con finos*

## 1.1. SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD

nódulos. Charnela con dos dientes pseudocardinales comprimidos y un lateral en la valva derecha y en la valva izquierda dos pseudocardinales, uno enfrente del otro, y dos laterales. Nácar azulado a blanco, umbos bajos, casi siempre horadados, cavidades poco profundas, con numerosas impresiones formando una hilera en la cavidad de los umbos, paralelos al borde superior. Animal con marsupio, ocupando casi el propio ancho de la branquia interna. Epidermis generalmente gruesa y oscura. Branquias bastante anchas, angulares en la base, branquia interna unida en toda su longitud al saco abdominal, los palpos se proyectan posteriormente, manto muy delgado, espeso en los bordes, abertura branquial papilosa, separada de la abertura anal, por una traba, abertura supranal continuándose con la anal”.

Desde que comenzaron a realizarse estudios de las especies de *Diplodon* (Conrad, 1836; Lea, 1860; Marshall, 1917; Simpson, 1900) hasta la actualidad, no se ha llegado a un consenso en cuanto al número de especies que componen el género y la delimitación del mismo (tabla 1.1.3). Esta incertidumbre se ve agravada por el hecho de que las descripciones de las especies son poco claras, haciendo discutible la validez de dichas especies. Actualmente se mencionan menos especies que en un comienzo debido a sucesivas sinonimizaciones (Graf & Cummings, 2019). No se han realizado hasta ahora estudios de filogenia en *Diplodon*.

A su vez, *Diplodon* se compone de tres subgéneros: *D. (Australis)* Bonetto, Tassara & Rumi, 1986, *D. (Diplodon)* Spix in Wagner, 1827 y *D. (Rhipidodonta)* Mörch, 1853. Simpson (1900) mencionó otro subgénero: *D. (Cyclomya)*. Sin embargo, al consultar las bases de datos y publicaciones actuales, se observó que este nombre cayó en desuso (Graf & Cummings, 2019; Mollusca Base, 2020). Sin embargo, autores como Graf & Cummings (2006, 2007), Quintana Cardona et al. (2013) y Miyahira et al. (2019) han seguido la opinión de Simone (2006), quien ha elevado el estatus de *Rhipidodonta* a género. Simone (2006) incluyó en el género *Diplodon* a aquellas especies con gloquidio parásito, mientras que las que presentan un gloquidio no parásito resultaron agrupadas en el género *Rhipidodonta*. El subgénero *D. (Australis)*, conformado por una sola especie: *D. solidulus* (Philippi, 1869), está caracterizado por presentar un gloquidio con valvas más equiláteras que las del gloquidio de *D. (Diplodon)* y dientes triangulares rectos, mientras que el gloquidio de *D. (Diplodon)* los tiene curvados en forma de “S”. *D. solidulus* fue descrita solamente para Puerto Montt, Chile. En este trabajo de tesis se tomará como hipótesis a contrastar el criterio de Pereira et al. (2014), quienes mencionan a *D. (Diplodon)* y *D. (Rhipidodonta)* como subgéneros del género *Diplodon*, con lo cual se utilizará esta clasificación en las secciones subsiguientes.

Las especies *D. flucki* Morrison, 1943; *D. fluctiger* (Lea, 1859), *D. fontainianus* (d'Orbigny, 1835) *D. gratus* (Lea, 1860); *D. greeffeanus* (Ihering, 1893); *D. guaporensis* Bonetto & Tassara, 1987; *D. losadae* Haas, 1966; *D. patagonicus* d'Orbigny, 1835; *D. pfeifferi* (Dunker, 1848); *D. rotundus* (Spix in Wagner, 1827); *D. solisianus* (d'Orbigny, 1835); *D. uruguayensis* (Lea, 1860) y *D. voltzi* Vernhout, 1914 no han sido aún incluidas en ningún subgénero, debido a la falta de información sobre la morfología de sus gloquidios (tabla 1.1.3).

## 1.1. SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD

Parodiz (1973) planteó la existencia de un complejo supraespecífico de *D. delodontus* formado por las especies *D. wymanii*, *D. solisianus*, *D. uruguayensis*, *D. martensi*, *D. expansus* y *D. paulista*. El autor realizó una revisión de las características morfológicas de la conchilla de estas especies a lo largo de su distribución. Sin embargo, como bien ha aclarado Miyahira (2017), los complejos o grupos de especies no tienen estatus taxonómico y sólo sirven para organizar las especies según similitudes morfológicas. Parodiz (1973) reconoció que muchas de estas características pudieron deberse a los que el interpretó como resultado de procesos de hibridación entre especies cercanas.

*Diplodon delodontus* (Lamarck, 1819) (= *Unio delodonta* Lamarck, 1819) es una especie de distribución amplia que habita en los ríos Paraná, Paraguay y Río de la Plata. Sus registros abarcan parte de Argentina, Uruguay, y sur de Brasil (figura 1.2.4). El ejemplar tipo está depositado en el Museo Nacional de Historia Natural del Instituto Smithsoniano, Washington D.C., Estados Unidos, con el número USNM\_150390 (figura 1.1.4). A continuación, se brinda una traducción de la descripción de esta especie, a partir del texto de Parodiz (1973), quien a su vez la tomó de Lamarck (1819):

*“Conchilla elíptica, margen anterior normalmente redondeado desde el final de la muy corta lúnula hasta el margen ventral, el cual es recto en los especímenes más grandes y algo curvado en los más pequeños. Margen dorsal descendiendo oblicuamente, o en una suave curva, desde el umbo hasta el margen posterior, el cual comienza aproximadamente hacia la mitad del ala dorsal; la conexión de estos dos márgenes forma un ángulo obtuso. El margen posterior contacta el ventral en un punto debajo de la mitad inferior de la valva; aquí de nuevo puede formarse un suave ángulo, o ambos márgenes posterior y ventral se funden en una curva continua. Estos ángulos son variables de acuerdo con los individuos, los más largos siendo más elípticos, los más cortos más romboidales. El declive dorsal debajo del ala es redondeado, pero algunas veces se insinúa una débil carena. Las valvas son infladas desde el umbo hasta la mitad de la conchilla, y desde ese punto se hacen rápidamente comprimidas hacia el centro del margen ventral, donde aparecen algunas rugosidades radiales; la mayor inflación es posterior al umbo, un poco debajo del declive. Los umbos son prominentes en relación con el extremo anterior, pero bajos en comparación con el área ligamental; el disco umbonal, sin embargo, es bastante sobresaliente a causa de la inflación lateral. La escultura umbonal consiste de 13, ocasionalmente 15, costillas regularmente distribuidas, pero extendiéndose debajo de la línea del comienzo del margen anterior (que es, no más bajo que la lúnula). Hay también una microescultura de líneas concéntricas entre las costillas, y a veces por cada cuatro o cinco de estas líneas costulares hay una más fuerte la cual atraviesa las costillas, formando pequeños nódulos (pero esta no es una característica diagnóstica confiable). Hay tres o cuatro de estas costulas por milímetro. Tres de las costillas principales que irradian desde la punta del umbo son coalescentes; las dos del lateral se encuentran a una corta distancia desde la punta formando una V, y la central se une con ellas en el ángulo. En todos los casos esa escultura no es tan fuerte ni tan conspicua como en *Diplodon solisianus*. El resto de la conchilla es muy rugosa, con*

*gruesos pliegues concéntricos de crecimiento y algunas líneas radiales centralmente las cuales son*

## 1.1. SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD

*estrictamente cuticulares. El color del periostraco es marrón muy claro en el centro de la conchilla, pero se torna muy oscuro hacia los márgenes, principalmente en el declive posterior en una mezcla de verde oscuro con castaño oscuro. El ligamento es bastante angosto, con su inserción ligeramente posterior a la mitad del diente lateral, no profunda. La angosta lúnula no está siempre bien marcada. El interior de la conchilla es blanco puro (por lo que Lea lo nombró *Unio lacteolus*) e iridiscente hacia los márgenes anterior y posterior. La cavidad umbonal tiene cuatro o cinco cicatrices irregulares y bastante grandes del músculo del manto. Un corto, pero relativamente ancho interdentum es evidente. Una línea, visible dentro de las valvas y corriendo desde el umbo al aductor, corresponde a la cresta externa dorsal. La deprimida área media exterior de la porción anterior muestra dentro como un engrosamiento. La línea paleal está bien impresa. Valva izquierda con pseudocardinales divididos en dos piezas cónicas, la anterior más grande con filoso borde crenulado, y la posterior un diente agudamente puntiagudo; entre ellos hay una fosa profunda dividida por una barra interna, y toda la superficie de esta fosa está rugosamente estriada. En la base del denticulo anterior hay una profunda cavidad circular correspondiendo al retractor anterior, separada del aductor anterior por una pared de la base del diente que cae, perpendicularmente, a la impronta del aductor, que es semicircular y confluyente a la elongada cicatriz inferior. Hay dos dientes laterales, paralelos, arqueados, de los cuales el inferior es más ancho, terminando en el aductor posterior, el cual es muy superficial. La valva derecha tiene su pseudocardinal bifurcado en una dirección longitudinal oblicua, la parte inferior de éste formando un diente grueso, grande y rugoso; la parte superior es solamente una barra angosta.*

Parodiz (1968) y Haas (1969) dividieron a *Diplodon delodontus* en dos subespecies: *D. delodontus delodontus* (Lamarck, 1819) y *D. delodontus wymanii* (Lea, 1860). La primera incluye a las poblaciones del sistema de cuencas de los ríos Paraguay y Paraná. La segunda representa los ejemplares encontrados en el Río Uruguay. Graf & Cummings (2007), Pereira (2014), Simone (2006) y Simpson (1914) propusieron la separación en dos especies distintas: *D. delodontus* (Lamarck, 1819) y *D. wymanii* (Lea, 1860). Sin embargo, ninguno de ellos ha expuesto las razones de este cambio taxonómico. En este trabajo de tesis se tomarán como válidas las especies *D. delodontus* y *D. wymanii*, con lo cual se seguirá esa designación en las secciones subsiguientes.

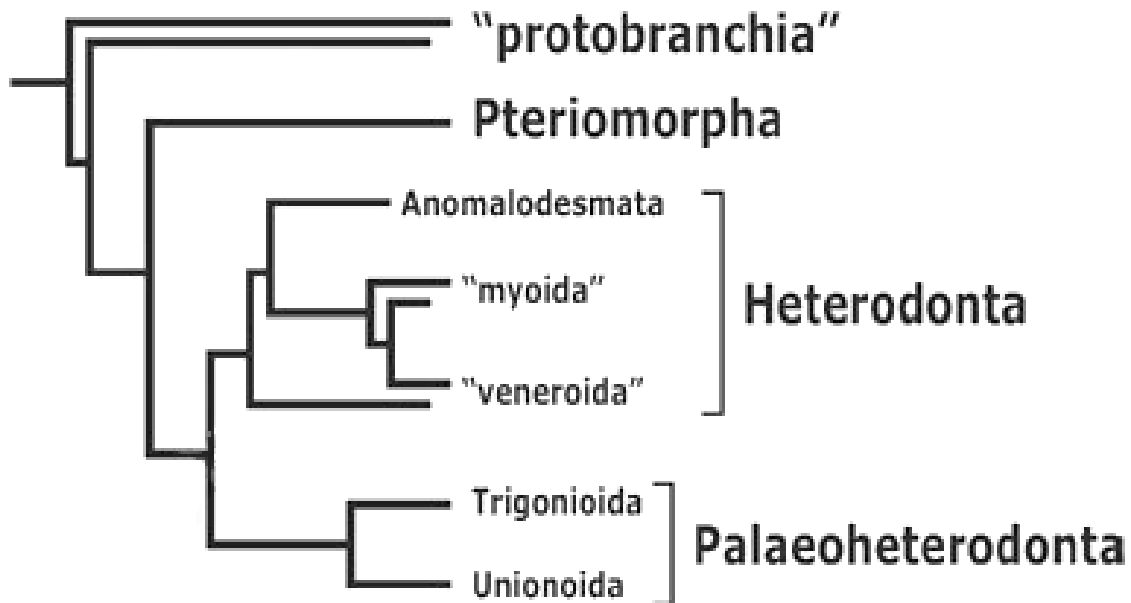


FIGURA 1.1.1 Filogenia de Bivalvia, tomada de Graf & Cummings (2006).

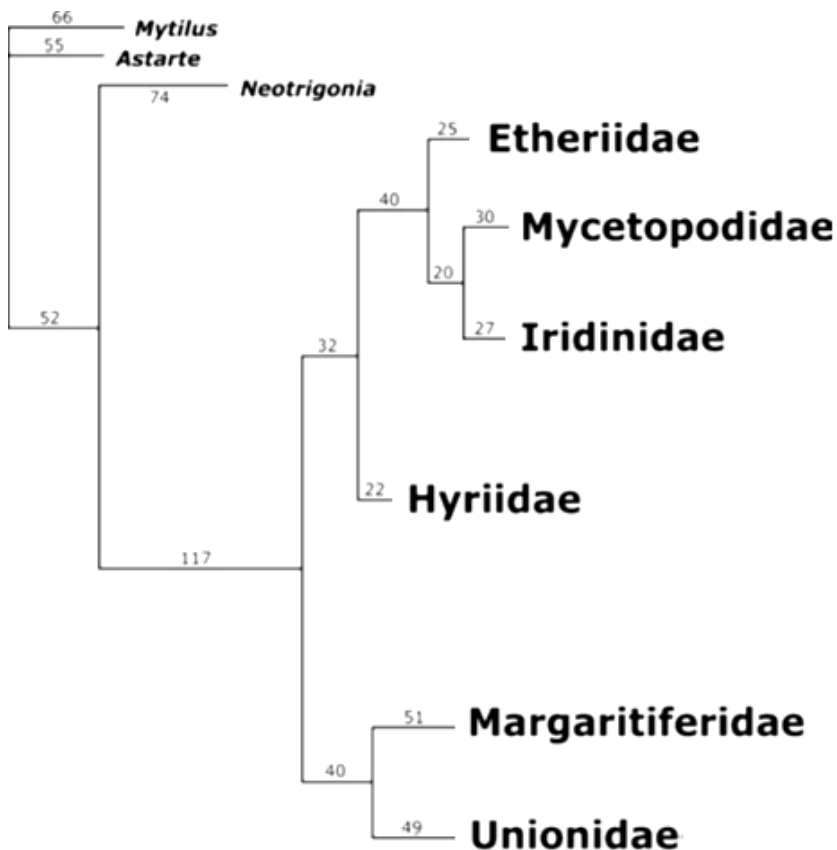
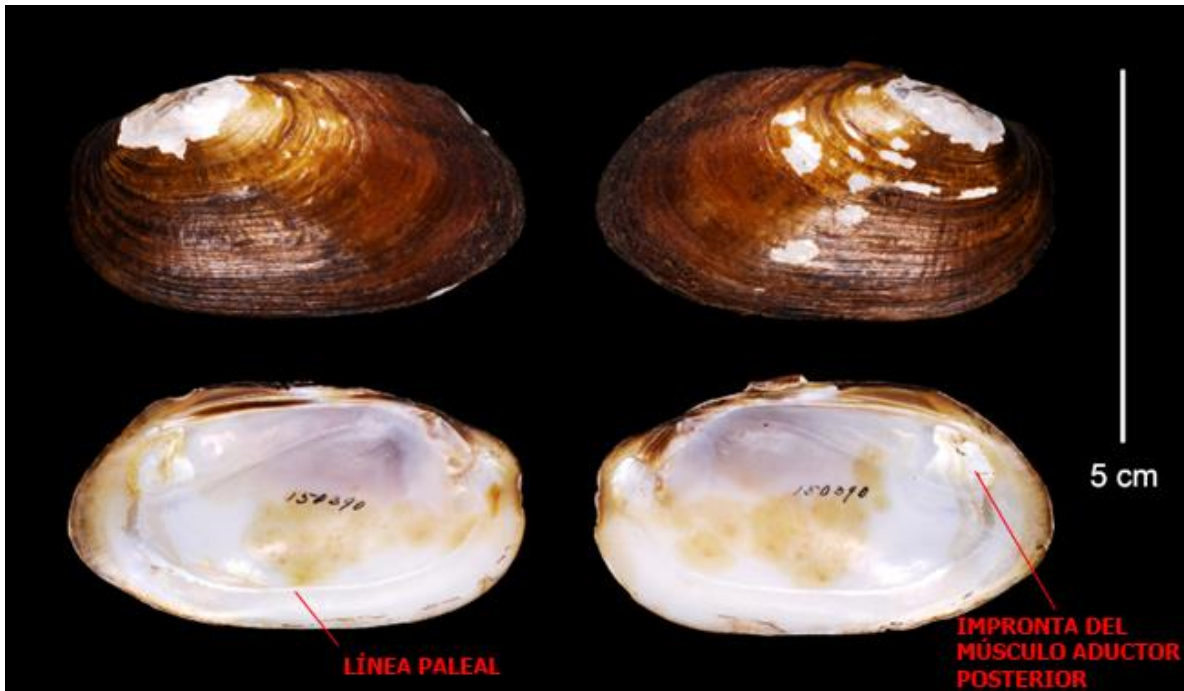


FIGURA 1.1.2 Hipótesis de relaciones filogenéticas dentro de Unionoidea. Modificada de Graf & Cummings (2006).

## 1.1. SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD



**FIGURA 1.1.3** Valvas izquierda (izquierda) y derecha (derecha) del holotipo de *Diplodon ellipticus*. Tomada de Miyahira et al. (2013). Arriba: cara externa; abajo: cara interna.



**FIGURA 1.1.4** Valvas izquierda (izquierda) y derecha (derecha) del ejemplar tipo de *Diplodon delodontus* USNM\_150390. Arriba: cara externa; abajo: cara interna. Cortesía de Robert Hershler, curador de Malacología del Museo Nacional de Historia Natural del Instituto Smithsonian.

## 1.1. SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD

**TABLA 1.1.1** Géneros que componen la familia Hyriidae según Mollusca Base (2020).

GÉNERO	CANTIDAD DE ESPECIES	DISTRIBUCIÓN
<i>Alathyria</i> Iredale, 1934	4	Oceanía
<i>Callonaia</i> Simpson, 1900	1	América del Sur
<i>Castalia</i> Lamarck, 1819	14	América del Sur
<i>Castaliella</i> Simpson, 1900	3	América del Sur
<i>Cucumerunio</i> Iredale, 1934	1	Oceanía
<i>Diplodon</i> Spix in Wagner, 1827	31	América del Sur
<i>Echyridella</i> McMichael & Hiscock, 1958	4	Oceanía
<i>Hyridella</i> Swainson, 1840	7	Oceanía
<i>Lortiella</i> Iredale, 1934	3	Oceanía
<i>Microdonta</i> Tapparone Canefri, 1883	1	Oceanía
<i>Paxyodon</i> Schumacher, 1817	1	América del Sur
<i>Prisodon</i> Schumacher, 1817	1	América del Sur
<i>Rhipidodonta</i> Mörch, 1853	11	América del Sur
<i>Triplodon</i> Spix in Wagner, 1827	2	América del Sur
<i>Velesunio</i> Iredale, 1934	6	Oceanía
<i>Virgus</i> Simpson, 1900	1	Oceanía
<i>Westralunio</i> Iredale, 1934	3	Oceanía
<b>TOTAL=17</b>	<b>94</b>	

**TABLA 1.1.2** Especies válidas de Hyriidae en Argentina.

			PEREIRA ET AL. (2014)	RUMI ET AL. (2008)
<b>HYRIIDAE</b>	<i>Diplodon</i>	<i>Diplodon (Diplodon)</i>	<i>D. (D.) chilensis</i> (Gray, 1828)	<i>D. (D.) chilensis</i> (Gray, 1828)
			<i>D. (D.) delodontus</i> (Lamarck, 1819)	<i>D. (D.) delodontus</i> (Lamarck, 1819)
			-	<i>D. (D.) granosus</i> (Bruguiere, 1792)
			<i>D. (D.) parallelopedon</i> (Lea, 1834)	<i>D. (D.) parallelopedon</i> (Lea, 1834)
			<i>D. (D.) parodizi</i> Bonetto, 1962	<i>D. (D.) parodizi</i> Bonetto, 1962
			<i>D. (D.) rhuacoicus</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>D. (D.) rhuacoicus</i> (d'Orbigny, 1835)
			-	<i>D. (D.) rotundus</i> (Wagner, 1827)
			-	<i>D. (D.) trifidus</i> (Lea, 1860)*
			<i>D. (D.) wymanii</i> (Lea, 1860)	-
			<i>Diplodon (Rhipidodonta)</i>	<i>D. (R.) burroughianus</i> (Lea, 1834)
	<i>D. (R.) charruanus</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>D. (R.) charruanus</i> (d'Orbigny, 1835)		
	<i>D. (R.) hylaeus</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>D. (R.) hylaeus</i> (d'Orbigny, 1835)		
	<i>D. (R.) peraeformis</i> (Lea, 1860)	-		
	<i>D. (R.) variabilis</i> (Maton, 1811)	<i>D. (R.) variabilis</i> (Maton, 1811)		
	<i>D. (R.) paranensis</i> (Lea, 1834)	-		
	<i>Castalia</i>	<i>C. inflata</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>C. inflata</i> (d'Orbigny, 1835)	
		<i>C. psammoica</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>C. psammoica</i> (d'Orbigny, 1835)	

\* Considerado sinónimo de *Diplodon parallelopedon* (Lea, 1834) por Graf & Cummings (2019).

## 1.1. SISTEMÁTICA Y DIVERSIDAD

**TABLA 1.1.3** Especies de *Diplodon* mencionadas (X) y no mencionadas (-) según distintas fuentes consultadas. \*Considerada dentro del género *Rhipidodonta*.

ESPECIE	ENCYCLOPEDIA OF LIFE (2020)	ITIS (2020)	FADA (2020)	GRAF & CUMMINGS (2019)	MOLLUSCA BASE (2020)	PEREIRA ET AL. (2014)
1	<i>D. (D.) aethiops</i> (Lea, 1860)	-	X	-	X	X
2	<i>D. (D.) berthae</i> Ortmann, 1921	-	X	-	X	X
3	<i>D. (D.) besckeanus</i> (Dunker, 1848)	X	X	X	-	X
4	<i>D. (R.) burroughianus</i> (Lea, 1834)	X*	X	X*	X*	X
5	<i>D. (D.) caipirus</i> (Ihering, 1893)	-	X	-	X	X
6	<i>D. (R.) charruanus</i> (d'Orbigny, 1835)	X*	X	X*	X*	X
7	<i>D. (D.) chilensis</i> (Gray, 1828)	X	X	X	X	X
8	<i>D. (R.) deceptus</i> Simpson, 1914 sensu Ortmann, 1921	-	X	-	-	X
9	<i>D. (D.) delodontus</i> (Lamarck, 1819)	X	X	X	X	X
10	<i>D. (D.) dunkerianus</i> (Lea, 1856)	-	X	-	-	X
11	<i>D. (D.) ellipticus</i> (Spix in Wagner, 1827)	X	X	X	X	X
12	<i>D. (D.) expansus</i> (Küster, 1856)	X	X	X	-	X
13	<i>D. flucki</i> Morrison, 1943	X	X	X	-	-
14	<i>D. fluctiger</i> (Lea, 1859)	X	X	X	-	-
15	<i>D. fontainianus</i> (d'Orbigny, 1835)	X	X	X	X	-
16	<i>D. (R.) funebris</i> (Lea, 1860)	X*	X	X*	X*	X
17	<i>D. (R.) garbei</i> Ihering, 1910	-	-	-	X*	-
18	<i>D. (D.) granosus</i> (Bruguière, 1792)	X	X	X	X	X
19	<i>D. gratus</i> (Lea, 1860)	X*	X	X*	X	-
20	<i>D. greeffeanus</i> (Ihering, 1893)	-	X	-	X	X
21	<i>D. guaporensis</i> Bonetto & Tassara, 1987	X	X	X	X	-
22	<i>D. (D.) guaranianus</i> (d'Orbigny, 1835)	-	X	-	X	X
23	<i>D. (R.) hildae</i> Ortmann, 1921	-	X	-	X*	X
24	<i>D. (R.) hylaeus</i> (d'Orbigny, 1835)	X*	X	X*	X*	X
25	<i>D. (R.) iheringi</i> Simpson, 1914	-	X	-	X*	X
26	<i>D. (D.) imitator</i> Ortmann, 1921	-	X	-	X	X
27	<i>D. (R.) koseritzi</i> (Clessin, 1888)	-	X	-	X*	X
28	<i>D. losadae</i> Haas, 1966	X	X	X	X	-
29	<i>D. (D.) martensi</i> (Ihering, 1893)	-	X	-	X	X
30	<i>D. (D.) multistriatus</i> (Lea, 1831)	X	X	X	X	X
31	<i>D. (D.) obsolescens</i> F. Baker, 1913	-	X	-	X	X
32	<i>D. (D.) parallelopipedon</i> (Lea, 1834)	X	X	X	X	X
33	<i>D. (R.) paranensis</i> (Lea, 1834)	-	X	-	X*	X
34	<i>D. (D.) parodizi</i> Bonetto, 1962	X	X	X	X	X
35	<i>D. patagonicus</i> d'Orbigny, 1835	X	-	X	-	-
36	<i>D. (D.) paulistus</i> (Ihering, 1893)	-	X	-	X	X
37	<i>D. (R.) peraeiformis</i> (Lea, 1860)	-	X	-	X*	X
38	<i>D. pfeifferi</i> (Dunker, 1848)	-	X	-	-	X
39	<i>D. (D.) piceus</i> (Lea, 1860)	-	X	-	X	X
40	<i>D. (D.) rhombeus</i> (Spix in Wagner, 1827)	X*	X	X*	X	X
41	<i>D. (D.) rhuacoicus</i> (d'Orbigny, 1835)	X	X	X	X	X
42	<i>D. rotundus</i> (Spix in Wagner, 1827)	-	X	-	X	X
43	<i>D. (A.) solidulus</i> (Philippi, 1869)	X	X	X	X	X
44	<i>D. solisianus</i> (d'Orbigny, 1835)	-	X	-	X	X
45	<i>D. (D.) suavidicus</i> (Lea, 1856)	X*	X	X*	X	X
46	<i>D. uruguayensis</i> (Lea, 1860)	-	X	-	X	X
47	<i>D. (R.) variabilis</i> (Maton, 1811)	X*	X	X*	X*	-
48	<i>D. (D.) vicarius</i> Ortmann, 1921	-	X	-	X	X
49	<i>D. voltzi</i> Vernhout, 1914	X	X	X	X	X
50	<i>D. (D.) wymanii</i> (Lea, 1860)	X	X	X	X	X

## 1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

Los Unionoida son bivalvos dulceacuícolas, infaunales superficiales, que pueden habitar distintos tipos de sustratos, tanto duros como blandos, en ambientes lóticos y lénticos. Su distribución es mundial, ocupando todos los continentes excepto Antártida (Bogan, 2008; Graf & Cummings, 2006).

Se ha hecho un aporte al conocimiento de la distribución de unionoideos en América del Sur desde el sitio “Mussel Project” (Graf & Cummings, 2019). El mismo fue creado por The National Science Foundation of The University of Wisconsin-Stevens Point y fue destinado a recopilar datos sobre unionoideos. Los autores dividieron la región sudamericana en seis subregiones, indicadas en la **figura 1.2.1**. Con la información científica disponible, Graf & Cummings (2019) realizaron una lista de especies de unionoideos presentes en cada una de ellas. Según estos autores, la región está habitada por 115 especies de unionoideos, ubicadas en 19 géneros y cuatro familias: Unionidae, Hyriidae, Mycetopodidae y Etheriidae. Las mismas se enumeran en la **tabla A1**.

Según Graff & Cummings (2019), la subregión Magdalena-Pacífica (SA1), área entre el Istmo de Panamá y el noroeste andino, presenta cinco géneros y 13 especies. La subregión Orinoco-Guayana (SA2), con 10 géneros y 33 especies, ocupa la cuenca este del Orinoco hasta las Guayanas. Estas cuencas están al norte de la subregión Amazónica (SA3), la cual ocupa toda la Cuenca del Amazonas y es subregión con mayor riqueza genérica, con 16 géneros y 37 especies. Los afluentes costeros del Atlántico en el este de Brasil (incluyendo la cuenca del río San Francisco) forman la subregión San Francisco-Atlántica (SA4), con cinco géneros y 17 especies. La subregión Paraná-Paraguay (SA5) está compuesta por todos los ríos afluentes del Río de la Plata y los afluentes costeros de Uruguay y del sur de Brasil. Es la más rica en especies, con 54 especies en 11 géneros. Finalmente, en la subregión Patagonia (SA6) que incluye el sur de Argentina y Chile se registran dos géneros con tres especies.

La familia Hyriidae presenta una distribución típicamente gondwánica, ocupando prácticamente todo el territorio de América del Sur y de Oceanía (**figura 1.2.2**). En Argentina, esta familia se encuentra en la Cuenca del Plata y en los lagos andino-patagónicos, con escasos registros en el noroeste argentino, el Río Negro y la costa sur de la provincia de Buenos Aires (Torres et al., 2018). La familia está representada por dos géneros, *Diplodon* (Spix in Wagner 1827) y *Castalia* (Lamarck, 1819). *Diplodon* es endémico de la región Neotropical y habita, en Argentina, principalmente en dos regiones: los lagos andino-patagónicos y la Cuenca del Plata (**figura 1.2.3A**). *Castalia* presenta una distribución similar, pero está ausente en los lagos andino-patagónicos (**figura 1.2.3B**). Graf & Cummings (2007), Quintana Cardona et al. (2013), Miyahira et al. (2019) y Simone (2006) también reconocen al género *Rhipidodonta* Mörch, 1853 (**sección 1.1**).

*Diplodon delodontus* (Lamarck, 1819) es una especie de distribución amplia en la Cuenca del Plata. Habita en los ríos Paraná, Paraguay y Río de la Plata. Su distribución abarca parte de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (**figura 1.2.4**).

## 1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

Otras especies de *Diplodon* mencionadas para la Cuenca del Plata en Argentina son *D. burroughianus* (Lea, 1834), *D. charruanus* (d'Orbigny, 1835), *D. enno* Ortmann, 1921 (sinónimo de *D. rhombeus*), *D. funebris* (Lea, 1860), *D. fontainianus* (d'Orbigny, 1835), *D. hyaleus* (d'Orbigny, 1835), *D. parallelopipedon* (Lea, 1834), *D. paranensis* (Lea, 1834), *D. parodizi* Bonetto, 1962, *D. peraeiformis* (Lea, 1860), *D. rhuacoicus* (d'Orbigny, 1835), *D. solicianus* (d'Orbigny, 1835) *D. trifidus* (Lea, 1860) (sinónimo de *D. parallelopipedon*), *D. wymanii* (Lea, 1860), y *D. variabilis* (Maton, 1811) (Bonetto, 1965; Castellanos, 1960; Pereira et al., 2014; Torres et al., 2018).

La única especie de *Diplodon* presente en la región de lagos patagónicos de Argentina es *Diplodon chilensis* (Gray, 1828). Esta se encuentra solamente en los lagos andinos tanto de Chile como de Argentina, desde el Río Limari (30°28'S; 71°05'W) en el extremo boreal, al Lago Diana (51°50'S; 72°9'W) en el extremo austral (Parada & Peredo, 2008). Sin embargo, algunos autores discuten la presencia de dos entidades (especies o subespecies) distintas: *D. chilensis* (= *D. chilensis chilensis*) en Chile y *Diplodon patagonicus* (d'Orbigny, 1835) (= *D. chilensis patagonicus*) en Argentina (Parada & Peredo, 2002; 2008). A continuación, se brinda una breve descripción de los ambientes donde habita *Diplodon*.

Según Baigun (2001), la Patagonia andina ocupa la franja occidental desde Neuquén hasta Tierra del Fuego y representa el 8% del territorio argentino. El clima de la Patagonia puede definirse como templado-frío, con temperaturas medias desde los 12°C en su sector noroeste hasta 3°C en la parte más austral. La humedad de los vientos provenientes del Pacífico es mayormente removida por el efecto orográfico de la Cordillera sobre la ladera oeste (Chile), resultando en un marcado gradiente de humedad hacia el este. El gradiente de precipitaciones desciende desde 2000-4000 mm anuales, que caracterizan el bosque templado-frío lluvioso cordillerano, a 200-1000 mm anuales propios de la estepa desértica patagónica.

Esta región conforma un sistema de lagos de origen tectónico, periglacial, volcánico, eólico y cárstico. Los lagos pueden ser desde someros a profundos, intermitentes a permanentes, localizándose en la Cordillera de los Andes aquellos de tipo periglaciales y volcánicos. La mayoría de los lagos patagónicos resultan monomícticos cálidos o polimícticos fríos. Los lagos se estratifican en verano hasta el otoño temprano, ya que los fuertes vientos durante el resto del año impiden una estratificación adicional. En general, los lagos patagónicos no se congelan durante el invierno, pero aquellos ambientes de altura o bien los ambientes pequeños, someros y protegidos del viento, localizados en los Andes, pueden presentar una gruesa capa de hielo (Baigun, 2001).

La Cuenca del Plata ocupa la quinta parte de América del Sur y es, por su extensión geográfica de 3,1 millones de kilómetros cuadrados y por el caudal de sus ríos, una de las más importantes del mundo (figura 1.2.5). Las aguas de dos grandes ríos confluyen en el Río de la Plata: el Paraná y el Uruguay que, a su vez, recogen el caudal de otros ríos muy importantes, como el Paraguay, el Bermejo, el Pilcomayo y el Iguazú, entre muchos otros (CIC Cuenca del Plata, 2019). Es así que la gran Cuenca del Plata se divide, a su vez, en

## **1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN**

subcuencas conformadas por sus ríos principales y los afluentes relacionados, las cuales se indican en la **figura 1.2.6**.

En Argentina, la Cuenca del Plata se desarrolla en la región noreste o litoral y está representada por el Paraguay Inferior, el Paraná Medio e Inferior, gran parte de la subcuenca del Uruguay, y el Río de la Plata (**figura 1.2.7A**). Este sistema está conformado por los ríos principales ya mencionados, numerosos arroyos y vertientes, y lagunas que se forman en las planicies de inundación de estos ríos.

Bonetto (1960) planteó diferencias en la distribución de las especies de unionoideos en esta cuenca (**figura 1.2.7B**). Según el autor, en el noreste argentino existe una región que abarca la cuenca del Paraguay junto con el Paraná Medio e Inferior, otra región formada por el Paraná Superior, y una tercera constituida por la cuenca del Uruguay. Núñez et al. (2010) determinaron ocho regiones hidro-biogeográficas en Argentina basándose en los datos de distribución de gasterópodos de agua dulce (**figura 1.2.8A**). Para la Cuenca del Plata identificaron cuatro regiones: Misionera (1), Paraná Medio (2), Río Uruguay (3) y Paraná Inferior- Río de la Plata (4).

La existencia de regiones biogeográficas distintas en la porción argentina de la Cuenca del Plata ha sido planteada también por López et al. (2002) y López y Michelarena (2005), sobre la distribución de especies de peces de agua dulce. Estos autores distinguieron una zona correspondiente a la provincia de Misiones (Región Misionera), otra al Río Uruguay (Región Río Uruguay Inferior) y una tercera que abarcaría el resto de la cuenca (Región Eje Potámico Subtropical) (**figura 1.2.8B**).

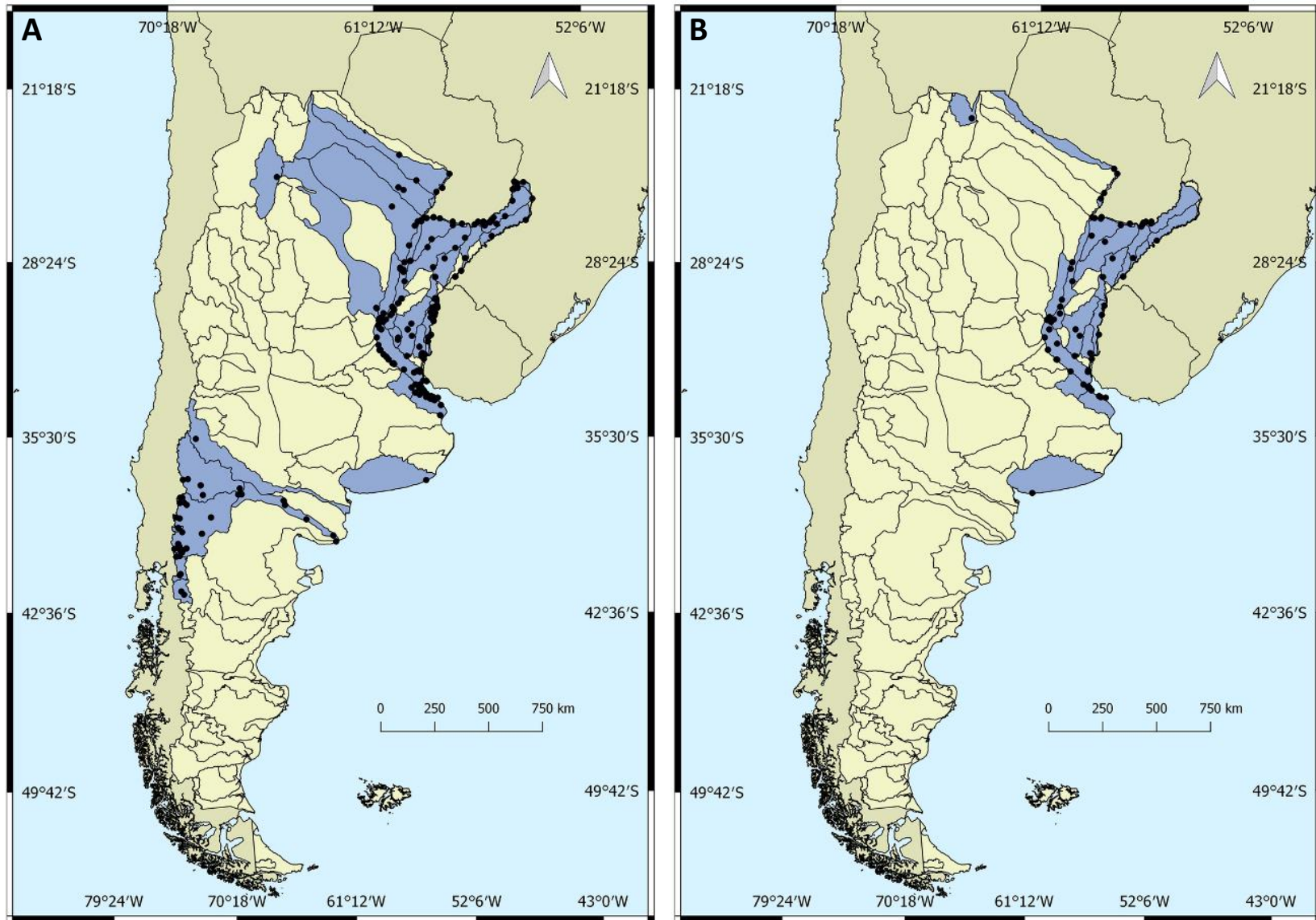


**FIGURA 1.2.1** Mapa de las subregiones de América del Sur basadas en la distribución de bivalvos de agua dulce. Tomado de Graf & Cummings (2019).



**FIGURA 1.2.2** Distribución a nivel global de la familia Hyriidae tomada de Graf & Cummings (2019). El gráfico de torta representa la diversidad relativa de cada familia de unionoideos. La porción en verde representa la diversidad relativa de especies actuales de Hyriidae en relación con el total de especies de unionoideos.

## 1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN



**FIGURA 1.2.3** Mapas de distribución de los géneros de Hyriidae presentes en Argentina. A) *Diplodon*; B) *Castalia*. Los puntos negros indican registros para cada género. Las áreas azules muestran las cuencas de drenaje superficial con presencia de híridos. Tomados de Torres et al (2018).

## 1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN



**FIGURA 1.2.4** Distribución de *Diplodon delodontus* tomada de Graf & Cummings (2019).



## 1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN

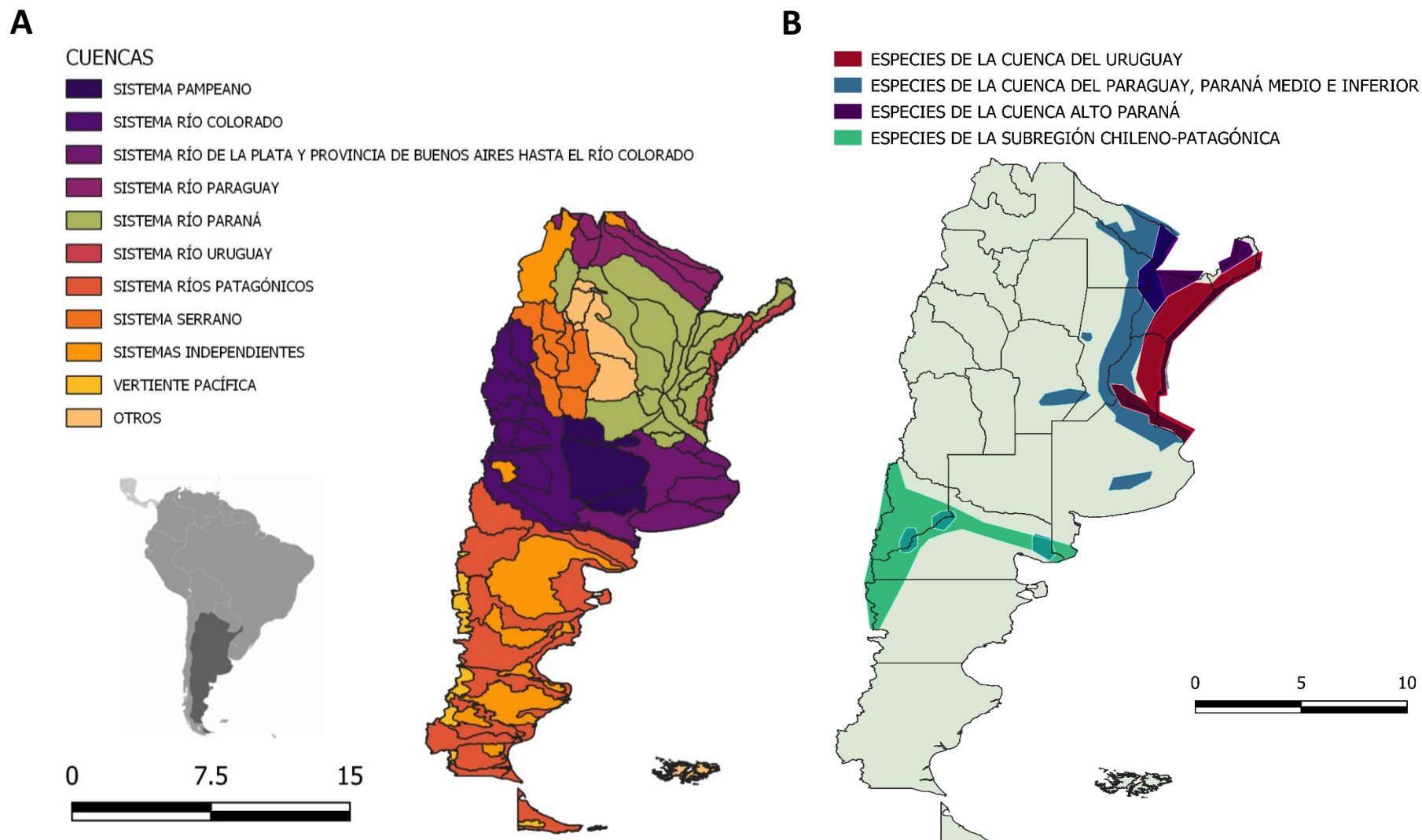


**FIGURA 1.2.5** Mapa de la Cuenca del Plata y sus subcuencas. Modificado del sitio oficial del Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata (CIC Cuenca del Plata, 2019).



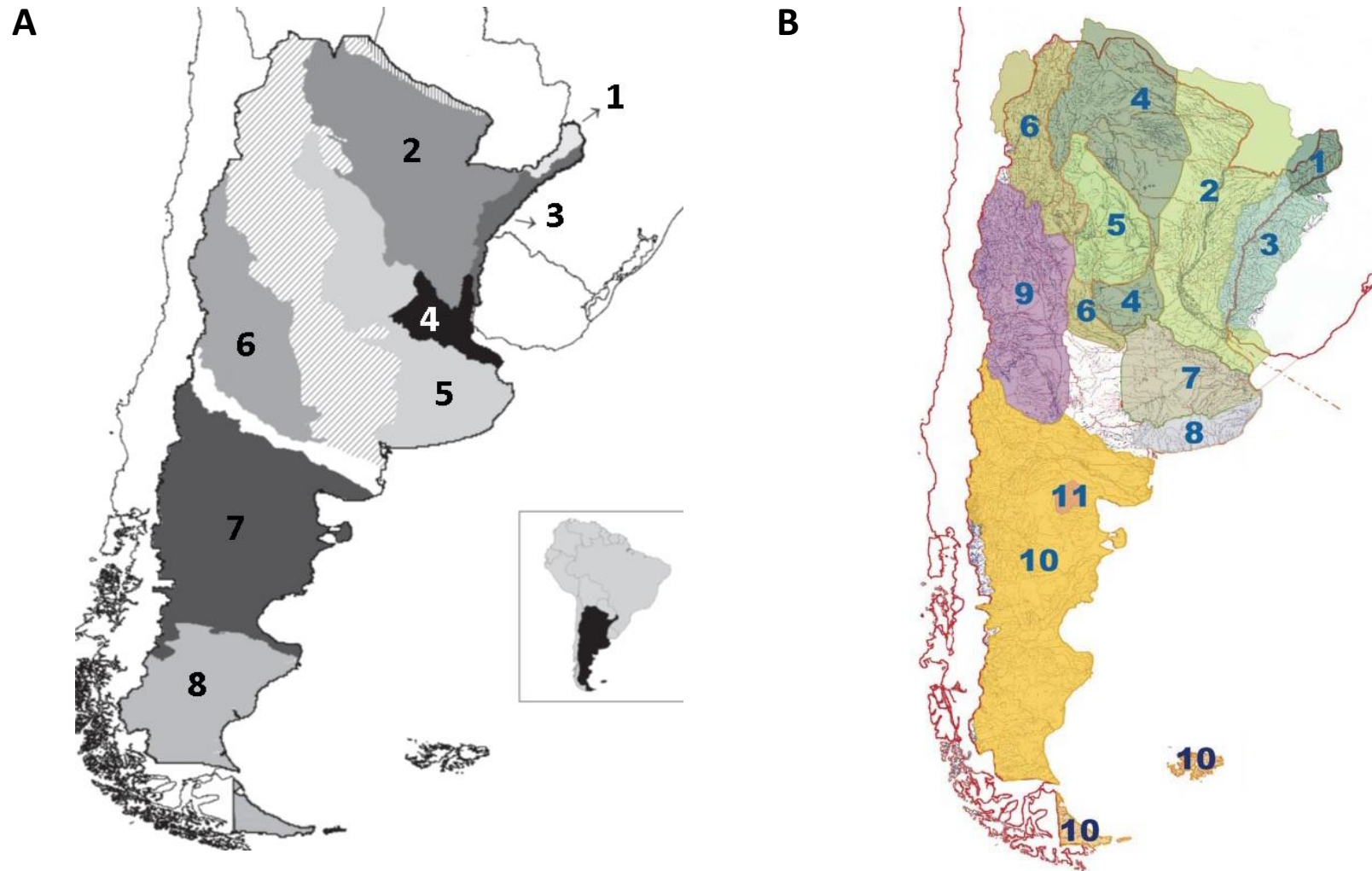
**FIGURA 1.2.6** Detalle del área de la Cuenca del Plata y sus subcuencas (izquierda) y su pertenencia por país (derecha). Tomado de CIC Cuenca del Plata (2019).

## 1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN



**FIGURA 1.2.7** A) Mapa de las cuencas hidrográficas de Argentina generado con los datos del portal del Programa 2Mp (CONAE-2Mp, 2020); B) Mapa de las regiones biogeográficas basadas en bivalvos de agua dulce. Modificado de Bonetto (1960). Las escalas representan las unidades de mapa.

## 1.2. HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN



**FIGURA 1.2.8** Mapas de las regiones biogeográficas.

A) Basado en la distribución de gasterópodos de agua dulce. Tomado de Núñez et al. (2010). 1) Misionera; 2) Paraná Medio; 3) Río Uruguay; 4) Paraná Inferior - Río de la Plata; 5) Central; 6) Cuyo; 7) Patagonia Norte; 8) Patagonia Sur. Patrón diagonal: Zona de Transición. Patrón vertical: cuencas no asociadas a ninguna región. Área blanca: cuencas sin registros y no asociadas a ninguna región.

B) Basado en la distribución de peces de agua dulce. Tomado de López et al. (2002). 1) Misionera; 2) Eje Potámico Subtropical; 3) Río Uruguay Inferior; 4) Paranoplatense Este; 5) Endorreica Central; 6) Paranoplatense Oeste; 7) Salado del Sur-Vallimanca; 8) Drenaje Atlántico Bonaerense; 9) Subandina-Cuyana; 10) Patagónica; 11) Somuncurá.

### 1.3. FISIOLÓGÍA Y CICLO DE VIDA

Los bivalvos del clado Unionoidea son organismos exclusivamente dulciacuícolas de crecimiento lento (Valdovinos & Pedreros, 2007), longevos (Morris & Corkum, 1999; Roper & Hickey, 1994; Rocchetta et al., 2014; Soldati et al., 2009) y que presentan tasas de reproducción y metabólicas relativamente bajas comparadas con las de otros bivalvos (Aldrige, 1999). Los unionoideos son organismos que se alimentan principalmente por filtración de partículas en suspensión mediante branquias eulamelibranquias (**figura 1.3.1**). En general, se considera que las microalgas del fitoplancton son el principal alimento de los bivalvos de agua dulce (Kovitvadi et al., 2008; Stuart et al., 2001). Sin embargo, también se ha demostrado la filtración de bacterias (Lara et al., 2002a; Sabatini et al., 2011b; Turick et al., 1988) y la incorporación de nutrientes a partir del sedimento y algas de fondo (Lara et al., 2002b). Existen algunos trabajos orientados a establecer el tipo de alimentación de *Diplodon*. López Van Oosterom et al. (2013) identificaron el detritus como el alimento principal de *Diplodon delodontus*. Alves et al. (2016) estudiaron la alimentación de *Diplodon enno* (sinónimo de *D. rhombeus*), demostrando que las poblaciones del Río Sao Francisco tienen una dieta basada en variedad de algas. Sabatini et al. (2011b, c) determinaron la capacidad de *D. chilensis* para filtrar tanto bacterias coliformes como cianobacterias.

Debido a su hábito filtrador de partículas, el cual manifiestan desde la etapa juvenil, los unionoideos han despertado un gran interés ecológico, relacionado a su potencial capacidad depuradora del agua. Esto se ha visto reflejado en una variedad de trabajos sobre su fisiología, en especial sobre su rendimiento filtrador (Busse, 1970; Byllaardt & Ackerman, 2014; Cyr et al., 2017; Doering & Oviatt, 1986; Eversole et al., 2008; Kim et al., 2011; Kryger & Riisgard, 1988; Loayza-Muro & Elias-Letts, 2007) y su reacción ante diferentes condiciones ambientales (Archambault et al., 2013; Falfushynska et al., 2014; Ganser et al., 2015; Grandon et al., 2012; Hartmann et al., 2016; Lurman et al., 2014; Sheldon & Walker, 1989). Todos los estudios se realizaron en mesocosmos de laboratorio y se han aportado pocas mediciones en campo (Nobles & Zhang, 2015).

Los estudios sobre toxicología en bivalvos unionoideos reconocen la capacidad de estos organismos para absorber y acumular sustancias tóxicas como, por ejemplo, metales pesados (Hickey et al., 1995; Kováts et al., 2010; Rodrigues et al., 2012), lo cual los hace especialmente aptos como biomarcadores de contaminación (Silva et al., 2007; Tomazelli et al., 2003). Sin embargo, se ha demostrado que algunas de estas sustancias pueden tener efectos negativos en los individuos a nivel tisular (Carella et al., 2016; Sabatini et al., 2011a). Sabatini et al. (2011c) han puesto a prueba la capacidad de resistencia de *Diplodon chilensis patagonicus* a las microcistinas, sustancias nocivas producidas por determinadas cianobacterias. En su estudio demostraron que estos bivalvos, al ser alimentados con cepas tóxicas de *Microcystis aeruginosa*, pueden resistir exposiciones prolongadas a la microcistina y acumularla en cantidades significativas.

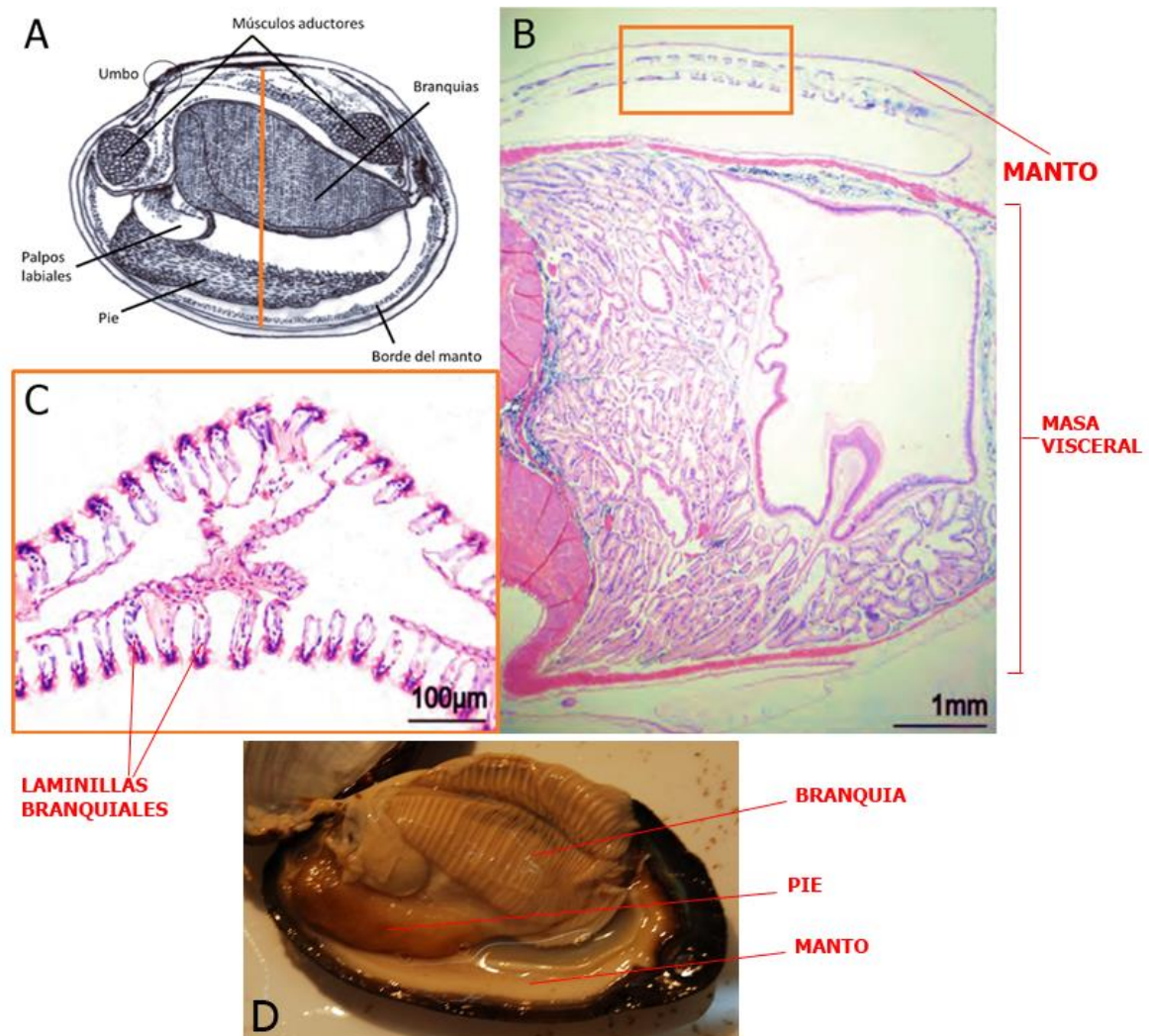
En cuanto a su reproducción y ciclo de vida, los unionoideos son organismos mayoritariamente dioicos, sin dimorfismo sexual (Aldrige, 1999). La mayor parte de las especies -de las que se conoce el ciclo de vida-

### 1.3. FISIOLÓGÍA Y CICLO DE VIDA

presentan un estadio larvario ectoparásito de peces (**figura 1.3.2**) (Modesto et al., 2018). Luego de la liberación de espermatozoides por parte de los machos y la posterior fecundación de los óvulos en la cavidad branquial de las hembras, las branquias de las mismas se modifican formando sacos de incubación llamados marsupios. Los embriones se alojan allí y continúan su desarrollo hasta formar una larva que permanece un tiempo breve en estado libre, para luego hallar un hospedador. La larva se denomina gloquidio y está provista de ganchos y un filamento adhesivo para fijarse a las branquias o aletas del pez (**figura 1.3.3**) (Wächtler et al., 2001). Algunos unionoideos hembra desarrollan estrategias que promueven el acercamiento de los peces que serán parasitados. Éstas incluyen modificaciones del manto o de la masa gloquidial que ha sido liberada, de forma que simulen una carnada tentadora (Cummings & Graf, 2015).

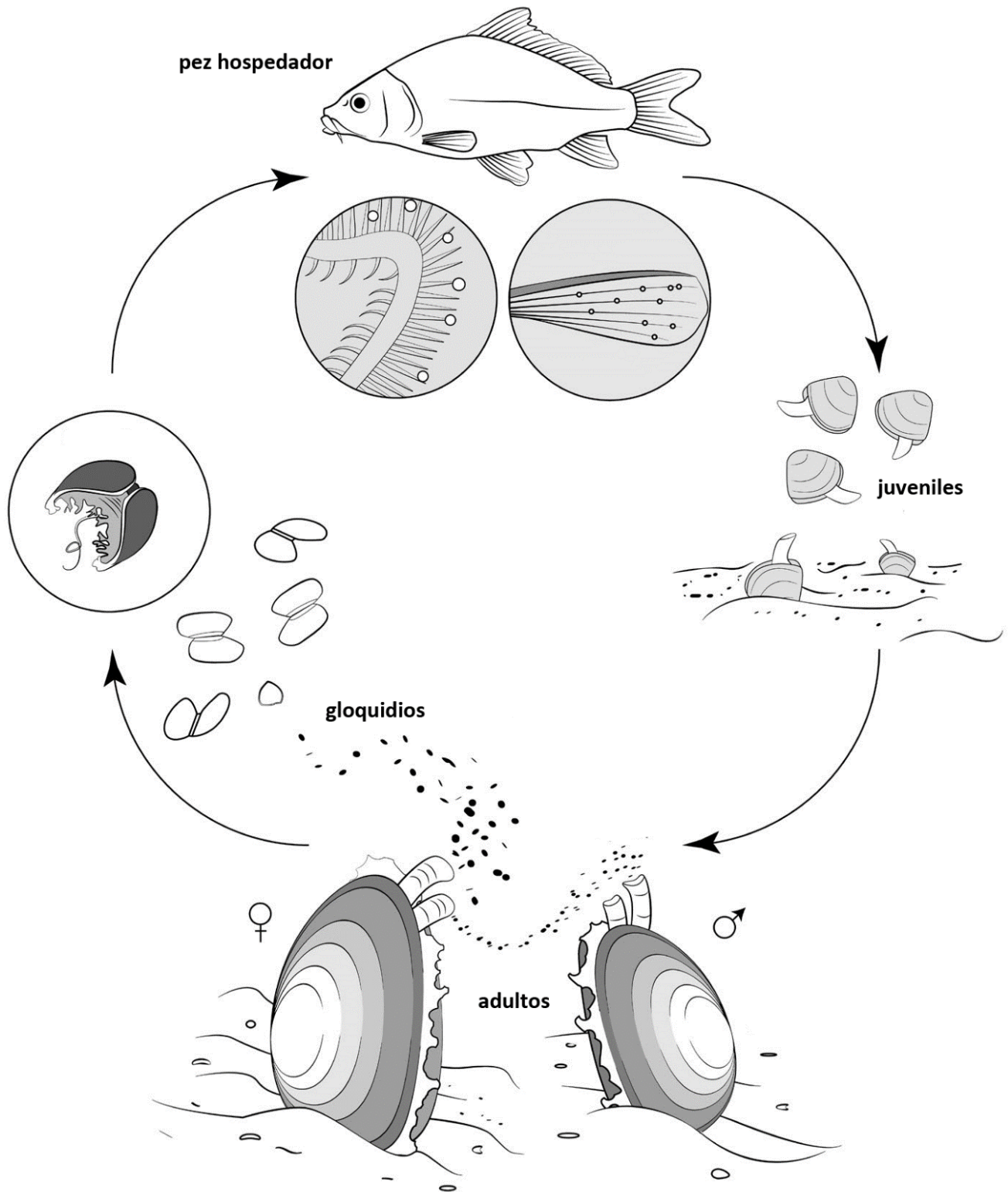
Secundariamente, algunas especies de *Diplodon* han desarrollado gloquidios sin ganchos, con lo cual se interpreta que su ciclo de vida es libre (Bonetto, 1961; Bonetto et al., 1986; Simone, 2006). Bonetto (1961) describió los gloquidios de vida libre de *D. bulloides* (Lea, 1859) (sinónimo de *D. variabilis*); *D. burroughianus*; *D. charruanus*; *D. garbei* Ihering, 1910; *D. hildae*; *D. hasemani* Ortmann, 1921 (sinónimo de *D. guaranianus*); *D. iheringi*; *D. paranensis*; *D. suavidicus*; *D. subquadratus* Marshall, 1923 (sinónimo de *D. variabilis*); *D. suppositus* Simpson, 1914 (sinónimo de *D. martensi*) y *D. variabilis*. El gloquidio de *D. parodizi* fue descrito más tarde por Parodiz y Bonetto (1963). Mansur (1999) determinó el gloquidio de *D. martensi* y sus posibles hospedadores. *Diplodon delodontus* presenta un gloquido parásito, el cual fue descrito por Bonetto & Ezcurra (1963) (**figura 1.3.4**):

*“Tales valvas, de contorno marcadamente subtriangular, poseen un tamaño relativamente grande, midiendo 0,31mm de longitud por 0,25mm de altura. La línea dorsal alcanza a los 0,20mm, el “desplazamiento de la punta ventral” llega a los 0,03mm, mientras que el “ángulo de oblicuidad”, es de unos 15 a 16 grados. Las valvas, de estructura porosa, aparecen rodeadas de un fino reborde, mucho más liso, el que se ensancha progresivamente a medida que se aproxima al punto de implantación del diente larval. En este lugar se expande el reborde originando una breve punta o una especie de púa doblada hacia adentro, por debajo de la cual se desprende el largo y curvo diente que existe en cada valva glochidial. Tal diente está constituido por dos finas láminas de conquiolina dispuestas en ángulo y soldadas hacia afuera. Inmediatamente después de su nacimiento el diente de la larva se flexiona hacia adentro para hacerlo luego hacia afuera, adquiriendo una forma sigmoidea que remata en dos (y más raramente en tres) cortas espínulas. Por lo que respecta a la organización interna cabe expresar que ella se ajusta a lo conocido dentro de este tipo de forma larval. Sus detalles más conspicuos están dados por una fuerte y única masa muscular y una cubierta de células del manto de contornos redondeados o ligeramente poliédricos, aplicada contra la superficie interna de las valvas. El filamento larval es fino, largo y arrollado, apareciendo cubierto de cortas y densas proyecciones pilosas. Además, presenta un diámetro uniforme (careciendo de expansiones distales) y posee un fino conducto longitudinal. Completan los rasgos más salientes de su organización la existencia de dos pares de ralos mechones sensitivos, uno de los cuales se encuentra inmediatamente por debajo del diente larval, en tanto que el otro aparece ubicado más hacia adentro.”*



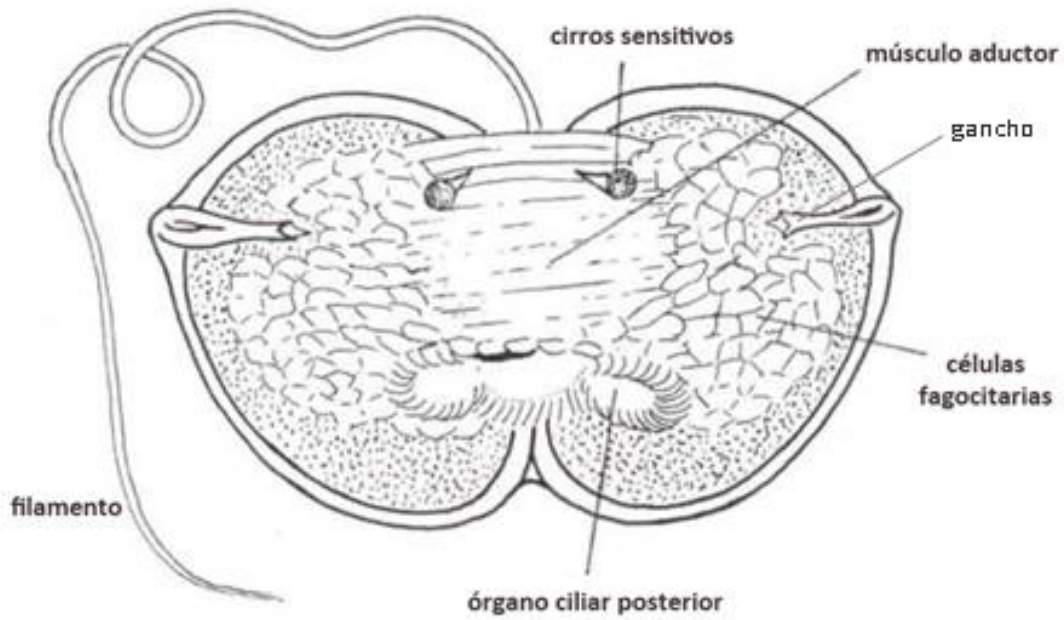
**FIGURA 1.3.1** A) Anatomía interna de *Diplodon rhombeus fontainianus* (d'Orbigny, 1835). Modificado de Avelar & Cunha (2009); B) Corte transversal de *Pseudodontoideus connasaugaensis* (Lea, 1858) (Unionidae, Anodontini) a la altura de la línea anaranjada de la figura A; C) detalle de la branquia eulamelibranchia de *Pseudodontoideus connasaugaensis*. Figuras B y C modificadas de McElwain & Bullard (2014); D) Disección de *Anodontites trapesialis* (Etheriidae) donde se observa la branquia eulamelibranchia.

### 1.3. FISIOLÓGÍA Y CICLO DE VIDA

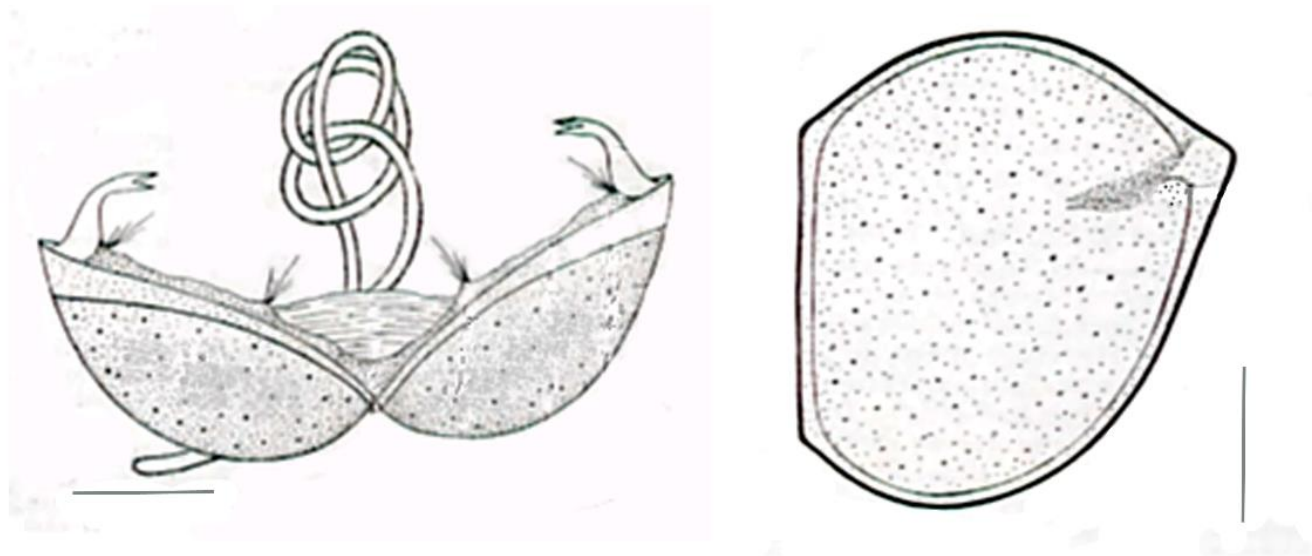


**FIGURA 1.3.2** Ciclo de vida generalizado de los bivalvos unionoideos con larva gloquidio parásita. Modificado de Modesto et al. (2018).

### 1.3. FISIOLÓGÍA Y CICLO DE VIDA



**FIGURA 1.3.3** Gloquidio. A) Esquema de la estructura general modificado de Mansur (1999).



**FIGURA 1.3.4** Gloquidio de *Diplodon delodontus*. Imágenes tomadas de Bonetto & Ezcurra (1963). Escala=100µm.

## 1.4. CONSERVACIÓN

En el año 1964 fue establecida La Lista Roja de Especies Amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y, desde ese momento, ha sido un criterio ampliamente utilizado para estandarizar la información sobre el estado de conservación de las especies biológicas de todos los taxones (IUCN, 2020). Según el **Subcomité de Estándares y Peticiones de la IUCN (2017)** los criterios pueden aplicarse a cualquier unidad taxonómica a nivel de especie o inferior. Existen nueve categorías de riesgo, que se muestran en la **figura 1.4.1**. La categoría a la que pertenece una especie debe ser determinada según la información compilada en los cuatro criterios expuestos en la **tabla 1.4.1**. Las mismas se basan en aspectos geográficos y poblacionales que expresan la probabilidad de que la especie en cuestión se extinga o disminuya en número de individuos. En caso de no completar la información básica para establecer la clasificación de dicha especie, la misma cae en la categoría Datos Insuficientes (DD de sus siglas en inglés). La aplicación de los criterios de la IUCN para las especies de Brasil dejó en evidencia la falta de información sobre la mayoría de las especies de unionoideos (Miyahira, 2017).

A escala global la tasa de extinción de los bivalvos dulciacuícolas es muy elevada, ya que, de las 306 especies evaluadas por la IUCN, el 41% está seriamente amenazado, siendo Unionoidea uno de los grupos biológicos con más especies en peligro de desaparecer (Bogan, 2008; Strayer et al., 2004). Sin embargo, no todos los unionoideos están en riesgo de extinción. La especie *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Unionoidea: Unionidae) proveniente de Asia, ha demostrado potencial como organismo invasor en Europa (Adam, 2010).

Al ser Unionoidea considerado uno de los grupos en mayor peligro de extinción, los estudios sobre su distribución y sistemática son importantes para su conservación (Bogan & Roe, 2008). Por ende, la información taxonómica precisa sobre las especies cobra vital importancia en términos de conservación. Miyahira (2017) evidenció esta problemática describiendo el ejemplo de *Diplodon pfeifferi* (Dunker, 1848). Al considerarse una especie válida endémica del estado de Río de Janeiro, fue incluida en la edición del Libro Rojo de Brasil de 2008 como especie amenazada. Sin embargo, algunos autores (Haas, 1969; Simpson, 1914; Simone, 2006) consideraron esta especie como un sinónimo de *D. granosus*, la cual presenta una distribución más amplia y se clasificó como una especie de Preocupación Menor (LC de sus siglas en inglés). En consecuencia, el estado de conservación que se le asigne a una especie va a estar estrechamente ligado con la delimitación geográfica y la identificación taxonómica de dicha especie. Esto supone una dificultad en los taxones en los cuales aún no existe un consenso sobre el número de especies, como ocurre en el género *Diplodon* (sección 1.1).

En cuanto a los Hyriidae, hasta la fecha sólo 24 especies de un total de 66 descritas han sido catalogadas según los criterios de la IUCN (2020), siendo sólo ocho de estas pertenecientes a *Diplodon* (tabla 1.4.2). Sin embargo, la información poblacional de estas especies no está completa para los cuatro criterios mencionados anteriormente, con lo cual su clasificación podría modificarse al profundizar los estudios. En el caso de *Diplodon chilensis*, sólo se aportaron datos sobre su distribución, presentando un área de hábitat

## 1.4. CONSERVACIÓN

extensa (**sección 1.2**), lo cual disminuye su riesgo de conservación. Las especies *D. parallelopedon*, *D. expansus* y *D. pfeifferi* fueron clasificadas como Vulnerables (VU), mientras que *D. fontaineanus* y *D. dunkerianus* fueron catalogadas como especies En Peligro (EN). No obstante, no hay información suficiente a disposición y la IUCN (2020) recomienda una revisión. Datos sobre la distribución de *D. expansus* fueron comentados en Miyahira et al. (2013). *D. granosus* y *D. hyleus* (= *Rhipidodonta hylea*) fueron clasificadas como Preocupación Menor (LC) y Datos Insuficientes (DD), respectivamente, debido a la ausencia de datos completos y precisos sobre sus distribuciones.

Como se mencionó en la **sección 1.3**, los unionoideos tienen un crecimiento lento y presentan tasas de reproducción y metabólicas relativamente bajas comparadas con las de otros bivalvos. Muchas especies fueron extensamente explotadas por la industria del nácar hasta mediados del siglo XX. Esta actividad ya no es tan extensiva debido al reemplazo del nácar por el plástico. Sin embargo, en la región amazónica de Brasil, poblaciones de *Triplodon* y *Castalia* aún son extraídas para la fabricación de botones y otras artesanías (Miyahira, 2017). El cambio de régimen y la contaminación en algunos cursos de agua altera profundamente las condiciones físicas y químicas del agua y las características del sedimento. Esto no solo afecta la supervivencia de los bivalvos, sino también de los peces hospedadores, de los cuales las especies de bivalvos con larvas parásitas dependen para su desarrollo y dispersión (Bogan, 2008; Miyahira, 2017; Rocchetta et al., 2014) (**sección 1.3**). La interacción con especies de bivalvos invasoras como el ‘mejillón zebra’ *Dreissena polymorpha* Pallas, 1771 en América del Norte (Baker & Hornbach, 1997; Parker et al., 1998), la ‘almeja asiática’ *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) y ‘el mejillón dorado’ *Limnoperna fortunei* Dunker, 1857 (Darrigran et al., 1998), ha sido registrada como negativa para las poblaciones de bivalvos nativos (Bogan, 1993; 2008; Torres et al., 2013).

La importancia ecológica de los unionoideos relacionada a su actividad filtradora (**sección 1.3**), sumada a su vulnerabilidad ecológica, han promovido las investigaciones sobre su cultivo en laboratorio, reintroducción y monitoreo, tanto de juveniles como de adultos. Las mismas se desarrollan como parte de programas de recuperación de algunas especies amenazadas en ambientes donde la reducción poblacional fue evidente (Amaral et al., 2007; Barnhart, 2016; Buddensiek, 1995; Hua et al., 2013; Kovitvadhii et al., 2008; Peredo et al., 2006; Thomas et al., 2010).

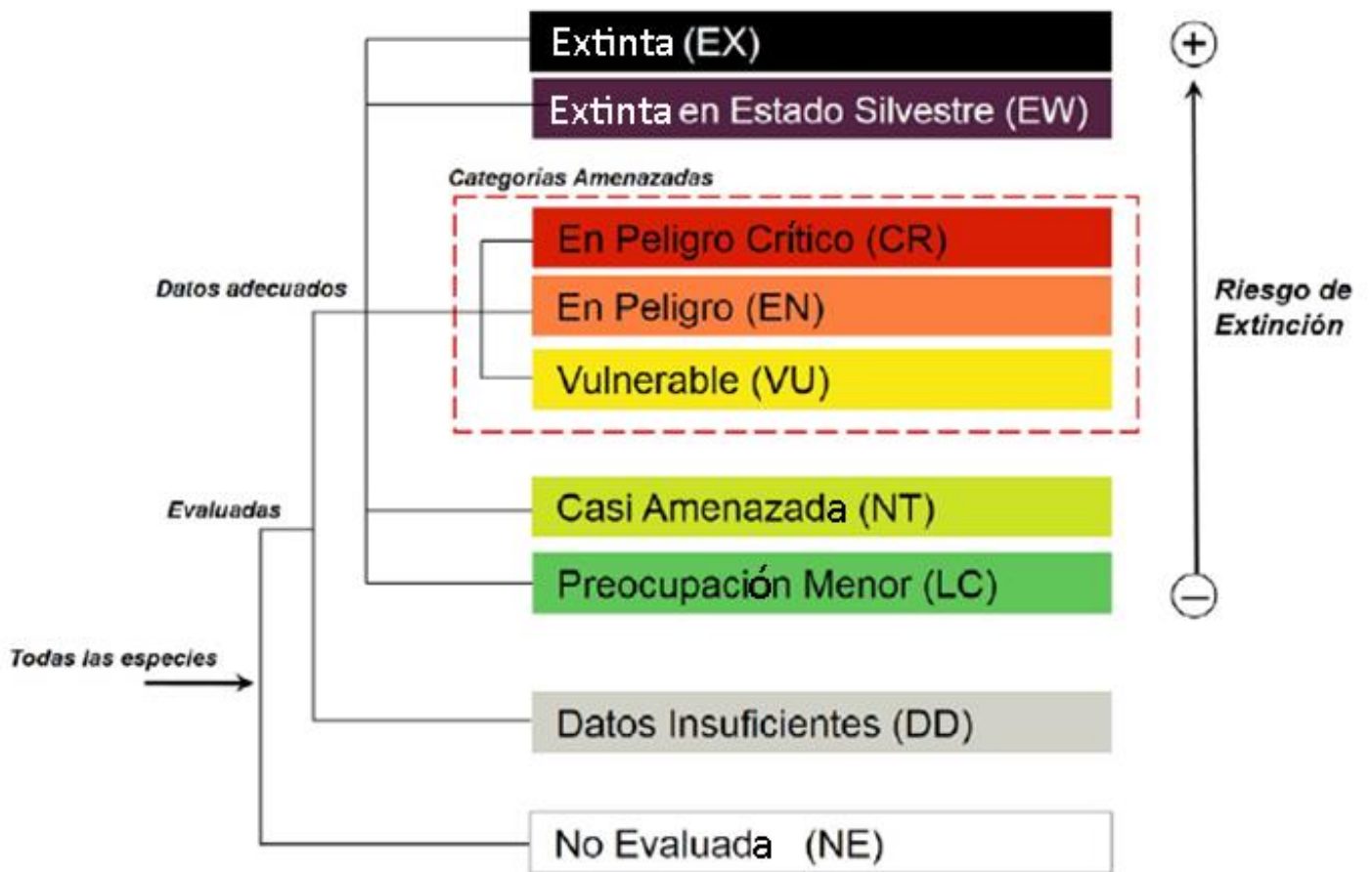


FIGURA 1.4.1 Categorías de Riesgo establecidas por el Subcomité de Estándares y Peticiones de la IUCN (2017).



**TABLA 1.4.1** Criterios utilizados para establecer la categoría de riesgo para una especie (Subcomité de Estándares y Peticiones de la IUCN (2017).

<b>A. Reducción del tamaño poblacional.</b> Reducción del tamaño de la población basada en cualquiera de los subcriterios A1 a A4. El nivel de reducción se mide considerando el período más largo, ya sea 10 años o 3 generaciones.			
	En Peligro Crítico	En Peligro	Vulnerable
A1	≥ 90%	≥ 70%	≥ 50%
A2, A3 & A4	≥ 80%	≥ 50%	≥ 30%
<p>A1 Reducción del tamaño de la población observada, estimada, inferida o sospechada, en el pasado donde las causas de la reducción son claramente reversibles Y entendidas y conocidas Y han cesado.</p> <p>A2 Reducción del tamaño de la población observada, estimada, inferida o sospechada, en el pasado donde las causas de la reducción pudieron no haber cesado O no ser entendidas y conocidas O no ser reversibles.</p> <p>A3 Reducción del tamaño de la población que se proyecta, se infiere o se sospecha será alcanzada en el futuro (hasta un máximo de 100 años) [(a) no puede ser usado].</p> <p>A4 Reducción del tamaño de la población observada, estimada, inferida, proyectada o sospechada donde el período de tiempo considerado debe incluir el pasado y el futuro (hasta un máx. de 100 años en el futuro), y donde las causas de la reducción pueden no haber cesado O pueden no ser entendidas y conocidas O pueden no ser reversibles.</p>	<p>Con base en y especificando cualquiera de los siguientes puntos:</p>		<p>(a) observación directa [excepto A3]</p> <p>(b) un índice de abundancia apropiado para el taxón</p> <p>(c) una reducción del área de ocupación (AOD), extensión de presencia (EOO) y/o calidad del hábitat</p> <p>(d) niveles de explotación reales o potenciales</p> <p>(e) como consecuencia de taxones introducidos, hibridación, patógenos, contaminantes, competidores o parásitos</p>
<b>B. Distribución geográfica representada como extensión de presencia (B1) Y/O área de ocupación (B2)</b>			
	En Peligro Crítico	En Peligro	Vulnerable
B1. Extensión de presencia (EOO)	< 100 km <sup>2</sup>	< 5.000 km <sup>2</sup>	< 20.000 km <sup>2</sup>
B2. Área de ocupación (AOD)	< 10 km <sup>2</sup>	< 500 km <sup>2</sup>	< 2.000 km <sup>2</sup>
<b>Y por lo menos 2 de las siguientes 3 condiciones:</b>			
(a) Severamente fragmentada, O Número de localidades	= 1	≤ 5	≤ 10
(b) Disminución continua observada, estimada, inferida o proyectada en cualesquiera de: (i) extensión de presencia; (ii) área de ocupación; (iii) área, extensión y/o calidad del hábitat; (iv) número de localidades o subpoblaciones; (v) número de individuos maduros			
(c) Fluctuaciones extremas en cualesquiera de: (i) extensión de presencia; (ii) área de ocupación; (iii) número de localidades o subpoblaciones; (iv) número de individuos maduros			
<b>C. Pequeño tamaño de la población y disminución.</b>			
	En Peligro Crítico	En Peligro	Vulnerable
Número de individuos maduros	< 250	< 2.500	< 10.000
<b>Y por lo menos uno de C1 o C2</b>			
C1. Una disminución continua observada, estimada o proyectada (hasta un máximo de 100 años en el futuro) de al menos:	el 25% en 3 años o 1 generación (lo que fuese más largo)	el 20% en 5 años o 2 generaciones (lo que fuese más largo)	el 10% en 10 años o 3 generaciones (lo que fuese más largo)
C2. Una disminución continua observada, estimada, proyectada o inferida Y por lo menos 1 de las siguientes 3 condiciones:			
(a) (i) Número de individuos maduros en cada subpoblación	≤ 50	≤ 250	≤ 1.000
(ii) % de individuos en una sola subpoblación =	90–100%	95–100%	100%
(b) Fluctuaciones extremas en el número de individuos maduros			

## 1.4. CONSERVACIÓN

Continuación Tabla 1.4.1.

D. Población muy pequeña o restringida			
	En Peligro Crítico	En Peligro	Vulnerable
D. Número de individuos maduros	< 50	< 250	D1. < 1.000
D2. Solo aplicable a la categoría VU Área de ocupación restringida o bajo número de localidades con una posibilidad razonable de verse afectados por una amenaza futura que podría elevar al taxón a CR o EX en un tiempo muy corto.	-	-	D2. típicamente: AOO < 20 km <sup>2</sup> o número de localidades ≤ 5

E. Análisis Cuantitativo			
	En Peligro Crítico	En Peligro	Vulnerable
Indica que la probabilidad de extinción en estado silvestre es:	≥ 50% dentro de 10 años o 3 generaciones, lo que fuese más largo (100 años max.)	≥ 20% dentro de 20 años o 5 generaciones, lo que fuese más largo (100 años max.)	≥ 10% dentro de 100 años

**TABLA 1.4.2** Especies de *Diplodon* categorizadas según los criterios de la IUCN (2020).

ESPECIE	CATEGORÍA	AUTOR	FECHA	ENLACE
<i>D. chilensis</i>	Preocupación Menor -LC	Bogan, AE & K Cummings	Julio 2011	<a href="http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T189076A8675023.en">http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T189076A8675023.en</a>
<i>D. dunkerianus</i>	En Peligro -EN	Mansur, MCD	Agosto 1996	<a href="http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6631A12791636.en">http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6631A12791636.en</a>
<i>D. expansus</i>	Vulnerable -VU	Mansur, MCD	Agosto 1996	<a href="http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6632A12791687.en">http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6632A12791687.en</a>
<i>D. fontainianus</i>	En Peligro -EN	Mansur, MCD	Agosto 1996	<a href="http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6633A12791718.en">http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6633A12791718.en</a>
<i>D. granosus</i>	Preocupación Menor -LC	Bogan, AE & K Cummings	Julio 2011	<a href="http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T189568A8749315.en">http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T189568A8749315.en</a>
<i>D. hylaeus</i>	Datos Insuficientes -DD	Bogan, AE & K Cummings	Julio 2011	<a href="http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T189125A8688917.en">http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T189125A8688917.en</a>
<i>D. parallelopipedon</i>	Preocupación Menor -LC	Bogan, AE & K Cummings	Julio 2011	<a href="http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T189073A8674336.en">http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T189073A8674336.en</a>
<i>D. pfeifferi</i>	Vulnerable -VU	Mansur, MCD	Agosto 1996	<a href="http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6634A12791749.en">http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6634A12791749.en</a>

## 1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Mundialmente, la tasa de extinción de los bivalvos dulciacuícolas es elevada, siendo Unionoidea uno de los grupos biológicos con más especies en peligro de desaparecer (Bogan, 2008; Strayer et al., 2004). Al ser considerado uno de los grupos en mayor peligro de extinción, los estudios sobre su distribución y sistemática son importantes para su conservación y la información taxonómica precisa sobre los unionoideos toma vital importancia en ese ámbito (Bogan & Roe, 2008). A pesar de esto, se han llevado a cabo pocos estudios en Argentina (Torres et al., 2018).

Este Trabajo de Tesis Doctoral tiene como objetivo general realizar aportes originales y de base para el futuro desarrollo del conocimiento de la biología y taxonomía del género *Diplodon* Spix in Wagner, 1827 (Bivalvia: Unionoidea: Hyriidae) y más específicamente de *Diplodon delodontus* (Lamarck, 1819) en Argentina. Se ejecutará un estudio sistemático -combinando técnicas de morfometría geométrica y análisis molecular- y de distribución, utilizando técnicas y herramientas bioinformáticas. La información obtenida contribuirá en la elaboración de un plan de acción de conservación. Se prevé que el número de especies reconocidas del género *Diplodon* esté sobreestimado debido a la variabilidad intraespecífica.

En el **Capítulo 3** se propuso analizar si las variaciones morfométricas de las valvas de ejemplares del género *Diplodon* apoyan la separación de las agrupaciones *Rhipidodonta*, *Diplodon* y *Australis* y discutir su estatus taxonómico, es decir, si se justifica su separación en géneros distintos. Además, se buscó establecer los caracteres de la conchilla que determinan la variación entre las especies del género *Diplodon* y, a su vez, poner a prueba la validez de dichas especies en Argentina, incluyendo las que fueron sinonimizadas por otros autores.

El objetivo del **Capítulo 4** fue establecer la variabilidad genética de ejemplares de *Diplodon* sp. de una localidad de Entre Ríos, Argentina, para luego contrastar las agrupaciones de los análisis moleculares con las agrupaciones del estudio de la morfometría geométrica obtenidas para el mismo conjunto de organismos,. Con esto se buscó determinar si la muestra de ejemplares del género *Diplodon* estudiada está compuesta por cuatro especies simpátricas, diferenciadas tanto por su morfología como por sus secuencias moleculares, o representa una población formada por tipos morfológicos distintos.

Por último, en el **Capítulo 5** se propuso determinar si existen diferencias morfométricas entre poblaciones de *Diplodon delodontus* de Argentina, y si dichas diferencias se corresponden con la pertenencia de las poblaciones a diferentes subcuencas hidrográficas, o si se ajustan a las regiones biogeográficas propuestas para moluscos de agua dulce.

## 1.5. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Del objetivo general se desprendieron los objetivos específicos enumerados a continuación, que serán abordados en los respectivos capítulos de este trabajo de Tesis Doctoral:

Establecer los rasgos de la valva que determinan la variación entre las especies de *Diplodon*.

Analizar si las variaciones morfométricas de las valvas de ejemplares del género *Diplodon* apoyan la separación de las agrupaciones *Rhipidodonta*, *Diplodon* y *Australis* y discutir su estatus taxonómico, es decir, si se justifica su separación en géneros distintos.

Poner a prueba la validez de las especies del género *Diplodon* en Argentina.

Establecer la variabilidad genética de ejemplares de *Diplodon* sp. de una localidad Entre Ríos, Argentina.

Contrastar las agrupaciones de los análisis moleculares con las agrupaciones obtenidas para el mismo conjunto de organismos, en el estudio de la morfometría geométrica.

Poner a disposición nuevas secuencias moleculares de individuos del género *Diplodon* para estudios futuros.

Determinar si existen diferencias morfométricas entre poblaciones de *Diplodon delodontus*.

Establecer si dichas diferencias se corresponden con la pertenencia de las poblaciones a diferentes subcuencas hidrográficas, o si se ajustan a las regiones biogeográficas propuestas para moluscos de agua dulce.

Discutir la taxonomía infraespecífica de *Diplodon delodontus*.

Las hipótesis generales, extraídas a partir del objetivo general, fueron las siguientes:

El número de especies reconocidas del género *Diplodon* está sobreestimado debido a la variabilidad intra-específica.

La especie *Diplodon delodontus* exhibe variabilidad morfológica intra e inter-poblacional en Argentina.

Las características conquiológicas de *D. delodontus* varían según la distribución geográfica de los individuos en Argentina.

En los capítulos de este trabajo de Tesis Doctoral se contrastaron las siguientes hipótesis específicas:

Las variaciones en la morfología de la valva apoyan la clasificación actual del género *Diplodon*.

La variabilidad morfológica de la conchilla permite la identificación de las especies del género *Diplodon* en Argentina.

Existen al menos cuatro especies del género *Diplodon* viviendo en simpatria en una localidad de Entre Ríos, las cuales se diferencian tanto por su morfología como por sus secuencias moleculares.

La especie *Diplodon delodontus* presenta diferencias morfométricas de la conchilla entre poblaciones y asociadas a la pertenencia a distintas regiones biogeográficas.

## *CAPÍTULO 2*

# *MATERIALES Y MÉTODOS*

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se desarrollará la metodología utilizada en los capítulos subsiguientes. Si bien cada uno de ellos aborda objetivos distintos, los métodos presentan características comunes que serán las desarrolladas en este capítulo. Además, en este apartado se explicarán los antecedentes de cada metodología en el taxón bajo estudio y los conceptos básicos que se aplicarán a lo largo del Trabajo de Tesis. No obstante, cada capítulo cuenta con un apartado de *Materiales y métodos* donde se detallan los aspectos específicos de cada abordaje.

### 2.1. MATERIAL ESTUDIADO

Para el estudio comparativo de la morfología de las valvas de los subgéneros del género *Diplodon* (**Capítulo 3**), se consultaron ejemplares tipo -holotipos, sintipos y lectotipos- de las especies válidas del género *Diplodon*. Dado que el material se encuentra depositado en distintos museos de Europa, América del Norte y otros países de América del Sur, se trabajó con imágenes fotográficas en dos dimensiones, tanto de la superficie interna de la valva izquierda de cada ejemplar, brindadas por distintas colecciones malacológicas.

Para realizar una comparación entre las especies del género *Diplodon* registradas para Argentina (**Capítulo 3**) se consultaron las colecciones malacológicas del Museo de La Plata (MLP) y del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN). La elección del material de estudio se realizó abarcando la mayor variedad de tamaños y localidades para cada especie, y seleccionando las valvas mejor conservadas para que fueran observables todas las estructuras. En este caso también se trabajó con imágenes en dos dimensiones de la superficie interna en vista dorsal de la valva izquierda. Las mismas fueron digitalizadas mediante un escáner Epson® Perfection V370 y el programa tpsDig (Rohlf, 2017a).

Para el desarrollo del **Capítulo 4** se utilizaron ejemplares vivos de *Diplodon sp* provenientes del balneario El Retobado, arroyo Yuquerí Grande, provincia de Entre Ríos (31°16,816'S; 58°11,48'O) (**figura 2.4.1**). El sitio de muestreo presentó una profundidad máxima de 70cm en una de sus orillas, en la cual el fondo estaba conformado por sedimento limo-arenoso con cantos rodados y raíces de árboles costeros. La otra orilla, de fondo arenoso y playa de poca pendiente, presentó una profundidad media de 50cm. El ancho del arroyo en ese punto de muestreo fue de 9m.

La recolección de los ejemplares se realizó en febrero de 2017, sondeando el sedimento manualmente en un área de 27m<sup>2</sup>. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en contenedores plásticos con algodón embebido en agua y refrigerados. Las muestras fueron conservadas en etanol 70° hasta el momento de la extracción de tejido o se les extrajo el tejido *in vivo*, para lo cual fueron previamente relajadas con mentol. Luego se las conservó en etanol 70° para su posterior ingreso a la Colección Malacológica del MLP (**tabla 4.7.2**).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis de los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina (Capítulo 5) se utilizaron imágenes en dos dimensiones de la superficie interna de la valva izquierda de cada ejemplar. El material provino de las colecciones malacológicas del MLP y del MACN. Los criterios para seleccionar y analizar el material fueron los mismos que para el Capítulo 3.

### 2.2. ANÁLISIS MORFOLÓGICOS: Morfometría Geométrica

#### CONCEPTOS Y FUNDAMENTOS BÁSICOS

La morfometría geométrica es un conjunto de técnicas morfológicas para el análisis estadístico multivariado y la visualización de datos de coordenadas cartesianas (Cooke & Terhune, 2015). En otras palabras, la morfometría geométrica es un grupo de análisis que consideran la forma total del individuo como un solo conjunto de datos (configuración de *landmarks*), tomados a partir de coordenadas, del cual se desprende una forma consenso y se analizan estadísticamente las desviaciones, deformaciones o variaciones espaciales mediante métodos multivariados. El espacio multivariado en el cual se disponen los objetos según sus coordenadas morfométricas se denomina espacio configuracional.

En este trabajo de tesis se utilizó el análisis de la variación en la disposición de puntos denominados *landmarks*. Los *landmarks* fueron definidos por Cooke & Terhune (2015) como *loci* anatómicos discretos, puntos en un espacio bidimensional o tridimensional, que pueden ser biológicamente homólogos, matemáticamente homólogos o ambos. Según Bookstein (1991) existen tres tipos de *landmarks*: los de TIPO 1 se forman a partir de la yuxtaposición discreta de tejidos (por ejemplo, la intersección de dos suturas óseas), son marcas anatómicas bien delimitadas y en general biológicamente homólogas; los de TIPO 2 son *landmarks* de máxima curvatura (*e.g.* el punto más profundo de una depresión o el punto más sobresaliente de un proceso), generalmente son homólogos matemáticos; y los de TIPO 3 o *semilandmarks*, son puntos externos o puntos definidos a partir de la información de otras estructuras o puntos en el objeto (*e.g.* puntos sobre una curvatura).

La forma consenso obtenida mediante el análisis de *landmarks* típicamente es calculada y ajustada por el método de superposición de Procrustes resultando, así como la configuración media (promedio) de las coordenadas de *landmarks* en la muestra. También es conocida como forma media de Procrustes (Cooke & Terhune, 2015). El Análisis General de Procrustes es un método de superposición de *landmarks* que elimina de la muestra las variaciones atribuibles al tamaño, rotación y traslación del objeto. Las variaciones entre los puntos de cada objeto de la muestra y los de la forma consenso se denominan 'distancias de Procrustes' (Jaramillo, 2011).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### ANTECEDENTES EN UNIONOIDEOS

Los análisis de morfometría geométrica fueron ampliamente utilizados en unionoideos (Bailey & Green, 1988; Beauchamp et al., 2020; Beyett et al., 2020; Cano-Otalvaro et al., 2012; Echem et al., 2016; Fassatoui et al., 2015; Inoue et al., 2014; Jeratthitikul et al., 2019; Keogh et al., 2019; Morais et al., 2014; Troncon & Avelar, 2011; Zieritz & Alridge, 2009, 2011; Zieritz et al., 2010). Autores como Baker et al. (2003, 2004); Balla & Walker (1991); Playford & Walker (2008) y Roper & Hickey (1994), aplicaron técnicas moleculares y morfométricas combinadas en Hyriidae australianos. Sin embargo, ninguno de éstos aborda el estudio morfométrico mediante la técnica de *landmarks*, sino que se basan en las medidas clásicas de la conchilla (*e.g.* altura, largo, espesor). Análisis morfométricos utilizando *landmarks* en dos dimensiones han sido realizados por Yusseppone et al. (2018) en *Diplodon chilensis*. Pimpão et al. (2012) usó morfometría clásica en gloquidios para distinguir especies de Hyriidae de Amazonia. Sousa da Mata et al. (2019) aplicaron morfometría geométrica en tres especies de Hyriidae, combinando análisis taxonómicos y poblacionales.

### DIGITALIZACIÓN DE LANDMARKS Y SEMILANDMARKS

Los *landmarks* seleccionados para los análisis se describen en la **figura 2.4.2** y en la **tabla 2.5.1**. En total se utilizó una configuración de *landmarks* compuesta por 13 *landmarks* y 27 *semilandmarks*. La elección supuso la utilización de la menor cantidad de puntos, intentando extraer la mayor cantidad de información sobre cada uno de los ejemplares. Los puntos fueron digitalizados mediante el programa tpsDig (Rohlf, 2017a). El radio de los puntos fue de 3 píxeles en todos los análisis.

Para los casos excepcionales de ejemplares en los cuales no era visible el umbo desde la vista interna de la valva, se estableció la posición del *landmark* 1 a la mitad de la distancia entre los puntos 8 y 3, de manera de no afectar el análisis. Para los casos de ejemplares con bordes rotos, se utilizó como molde una imagen de la valva derecha en vista interna- considerando su carácter de equivalvos- la cual fue rotada y solapada con la imagen izquierda para luego rellenar la parte faltante.

Los *semilandmarks*, al quedar arbitrariamente colocados, presentan libertad de deslizamiento en la dirección paralela a la curva o contorno. Para solucionar esto, fueron homologados matemáticamente mediante el concepto de deslizamiento por *Minimum Bending Energy*- BE. Según Perez et al. (2006), el criterio de BE permite fijar los *semilandmarks* deslizándolos a lo largo de la línea paralela a la curva, y minimizando la energía de deformación necesaria para producir el cambio en el contorno, o curva, de la forma de referencia. Es decir, se asume que el contorno o curva de un determinado objeto es el resultado de la mínima deformación posible del mismo contorno o curva, en la forma de referencia.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### ANÁLISIS DE LAS CONFIGURACIONES MORFOMÉTRICAS

Todas las herramientas digitales utilizadas están disponibles *online* de forma gratuita. Mediante el programa tpsRelw (Rohlf, 2017b) se desarrolló un primer ajuste de Procrustes y se calculó el Tamaño del Centroide de cada muestra. El Tamaño del Centroide (**figura 2.4.3A**) es un factor de escala que da una idea del tamaño del objeto y deriva de la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias cuadradas de cada *landmark* al centroide de la configuración morfométrica de cada individuo (Bookstein, 1991; Cavalcanti et al., 1999).

Como primer paso se testeó la presencia de alometría para cada conjunto estudiado. El test de alometría consta de un análisis de regresión de la variación de la forma de cada objeto (coordenadas alineadas de Procrustes) en relación a su Tamaño de Centroide. La alometría incluye los cambios de una o más variables de tamaño relacionados con la forma de los objetos (Klingenberg, 2016). La ausencia de alometría es un supuesto fundamental para realizar análisis morfométricos en los cuales se pretende relacionar la forma del objeto con una o más variables distintas al tamaño (Viscosi & Cardini, 2011). En el ejemplo de la **figura 2.4.3B** con un triángulo, si existe alometría el ancho del triángulo aumenta más que su altura al crecer el tamaño de la forma (línea azul). En cambio, en la línea roja es la altura la que aumenta de manera desigual al ancho, a medida que crece el triángulo. Si ambos crecen en igual proporción a medida que el tamaño del triángulo aumenta, ese crecimiento es isométrico (línea gris). Si existiera isometría, el tamaño del objeto puede eliminarse como variable al estandarizar las muestras mediante el Análisis General de Procrustes. De lo contrario, si existiera alometría las variaciones entre las configuraciones podrían verse afectadas por procesos de crecimiento dispares de variables entre conjuntos de muestras. El test de alometría se realizó con el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011), transformando la variable independiente (Tamaño del Centroide) a su logaritmo en base 10 debido a la variación de tamaño observada dentro de cada grupo. Se analizaron diez mil permutaciones. Además, se consideró un límite de significación de 0,05.

En aquellos casos en los que se comprobó la existencia de alometría entre variables - es decir, se refutó la hipótesis de independencia entre el Tamaño del Centroide y las coordenadas de Procrustes alineadas - se reemplazaron las variables de Procrustes por los residuos resultantes del análisis de regresión. Los residuos representan la porción del valor de las variables de Procrustes que es independiente del Tamaño del Centroide (Sidlauskas et al., 2011).

Se calculó la forma consenso entre las muestras y se realizaron Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminantes Canónicos. Según Jaramillo (2011), ambos son análisis multivariados que permiten contrastar hipótesis y representar las configuraciones morfométricas en un espacio reducido, conformado por los ejes que brindan mayor información sobre la variación del grupo estudiado. El Análisis de Componentes Principales generalmente se utiliza como una primera aproximación exploratoria, no tiene relevancia estadística (por lo que no es necesario cumplir supuestos tales como un número de muestras grande), pero

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

sirve para explicar tendencias dentro del conjunto. Los componentes principales o ejes de variación - eigenvectores- se relacionan con valores de variación o eigenvalores. El Análisis Discriminante Canónico, en cambio, permite contrastar hipótesis sobre agrupaciones planteadas *a priori* y tiene relevancia estadística. Las variables canónicas representan los ejes de discriminación entre grupos. Para realizar cada Análisis Discriminante Canónico, se utilizó el procedimiento *leave-one-out*, (Viscosi & Cardini, 2011) y el número de permutaciones fue de diez mil. Con el mismo programa se calcularon las distancias de Mahalanobis, definidas como la distancia (en términos multivariados) de cada individuo al centroide de cada grupo (Jaramillo, 2011). A esas distancias se las asoció con la probabilidad de pertenecer a un grupo determinado. Con las distancias obtenidas en los Capítulos 3 y 4 se realizaron análisis de conglomerados utilizando la media aritmética mediante el método UPGMA-MDGC.

Se realizó un primer Análisis Canónico utilizando el total de la variación, es decir, el total de los Componentes Principales. Para robustecer el análisis y cumplir los supuestos estadísticos, se realizó un segundo Análisis Canónico mediante el software Infostat (Di Rienzo, 2019), aplicando un número reducido de Componentes Principales. Luego se compararon los resultados de ambos análisis. En el Capítulo 3, además, se realizaron Análisis Discriminantes Pareados. Este análisis es similar al Análisis Canónico, solo que contrasta grupos de a pares y genera frecuencias de validación, que luego son comparadas mediante un test de medias (T-cuadrado de Hotelling) (Viscosi & Cardini, 2011).

### ANÁLISIS DE DISTRIBUCIÓN

Los ejemplares de *Diplodon delodontus* (Capítulo 5) se clasificaron en tres clases siguiendo distintos criterios espaciales, relacionados con la distribución geográfica de los puntos estudiados. Estas clases fueron utilizadas para agrupar los ejemplares en los análisis de morfometría geométrica. La clase 1 correspondió a los sistemas de cuencas hidrográficas de Argentina. El mapa de cuencas hidrográficas de la **figura 1.2.7A** se obtuvo del portal del Programa 2Mp, un proyecto realizado entre la CONAE y la Subsecretaría Nacional de Recursos Hídricos (CONAE-2Mp, 2020). La clase 2 incluyó las regiones establecidas por Bonetto (1960). Para obtener la capa de base para esta clasificación, se georreferenció el mapa de la **figura 1.2.7B** mediante el software QGIS 3.8.3-Zanzibar (QGIS Development Team, 2019), generando capas vectoriales constituidas por polígonos que representan las áreas de clasificación. La clase 3 abarcó las regiones propuestas por Núñez et al. (2010), georreferenciando el mapa de la **figura 1.2.8** mediante el mismo procedimiento. Las agrupaciones se establecieron aplicando la herramienta de geoprocso “Intersección” del software QGIS 3.8.3-Zanzibar (QGIS Development Team, 2019), superponiendo los puntos de distribución de *D. delodontus* con las áreas delimitadas en las diferentes capas espaciales.

#### CONCEPTOS Y FUNDAMENTOS BÁSICOS

El análisis molecular (**Capítulo 4**) se centró en la comparación de las secuencias de bases del fragmento de ADN mitocondrial que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I (COI), Para la obtención de las secuencias de interés se utilizó la técnica de amplificación por PCR y secuenciación. Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- ~ Elección de fragmento de ADN a secuenciar y cebadores.
- ~ Extracción y cuantificación de ADN.
- ~ Obtención de amplicones por PCR.
- ~ Purificación de amplicones.
- ~ Secuenciación.
- ~ Edición y Alineamiento de secuencias.
- ~ Análisis de agrupación.

A continuación, se brindan algunas definiciones del análisis molecular utilizadas en este Trabajo de Tesis Doctoral:

- ~ Amplicón: fragmento amplificado por la Reacción en Cadena de la Enzima Polimerasa (PCR) (Palacios et al., 2013).
- ~ Haplotipo: conjunto de variaciones del ADN, o polimorfismos, que tienden a ser heredados juntos (National Human Genome Research Institute, 2020).
- ~ Reacción en cadena de la enzima polimerasa (PCR): técnica de laboratorio utilizada para amplificar fragmentos de secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada (National Human Genome Research Institute, 2020).
- ~ Cebador o primer: secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En el método PCR se emplea un par de cebadores para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada. También se les conoce como oligonucleótidos (National Human Genome Research Institute, 2020).
- ~ Índice 260/280: valor de la absorbancia de la muestra a 260nm en relación a la absorbancia a 280nm. Indica el grado de pureza del ADN en una muestra, en la que un valor superior a 1,70-1,80 indica un

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

grado de pureza de ADN alto. Un nivel de alrededor de 1,8 es generalmente aceptado como puro para ADN, alrededor de 2 sería puro para ARN. Si el índice es más bajo podría estar indicando presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben fuertemente la luz alrededor de los 280nm (Glasel, 1995).

### ELECCIÓN DE LA SECUENCIA

Para el análisis molecular se seleccionó la fracción de ADN mitocondrial que codifica para la enzima Citocromo Oxidasa I (COI), conocida por su utilidad como código de barras genético o *DNA barcode*. En unionoideos la misma ha demostrado ampliamente su utilidad como herramienta para estudios supraespecíficos (Bogan & Hoeh, 2000; Chong et al., 2008), para la distinción de especies cercanas (Baker et al., 2003; 2004; Froufe et al., 2016; Konopleva et al., 2016; Reis et al., 2013), y para análisis poblacionales y filogeográficos (Burdick & White, 2007; Froufe et al., 2014; Krebs et al., 2015; Mock et al., 2010). Graf & O’Foighil (2000) y Walker et al. (2006) también utilizaron este fragmento para estudiar la evolución de caracteres reproductivos en bivalvos de agua dulce. Incluso se ha combinado el análisis de COI con el de otros genes (Buhay et al., 2002, Campbell et al., 2005; Huff et al., 2004; King et al., 1999; Pfeiffer & Graf, 2015; Scott et al., 2014; Serb, 2006; Whelan et al., 2011 y Zanatta & Murphy, 2007). Sin embargo, en Hyriidae los estudios de genética molecular son escasos (Fuentealba et al., 2010; Graf et al., 2015; Graf & Foighil, 2000; Hughes et al., 2004; Marshall et al., 2014 y Santos-Neto et al., 2016, 2018).

Se han dado a conocer pocas secuencias genéticas del género *Diplodon*, las cuales han sido utilizadas para estudios taxonómicos a nivel supra-genérico. Las que fueron tomadas del GenBank para realizar el análisis se describen en la **tabla 2.5.2** y corresponden a *D. deceptus* Simpson, 1914; *D. demeraraensis* (Lea, 1859); *D. chilensis* (Gray, 1828) y *D. suavidicus* (Lea, 1856);.

En algunos unionoideos se ha identificado un fenómeno muy particular que involucra un mecanismo de herencia mitocondrial novedoso en metazoos, denominado Herencia Doble Uniparental (DUI, de sus siglas en inglés *Doubly Uniparental Inheritance*). El fenómeno DUI implica dos genomas mitocondriales que se heredan de forma independiente: el materno o femenino (genoma F) y el paterno o masculino (genoma M). Estos genomas se distribuyen de forma distinta en los tejidos y presentan una gran variación entre ellos, estimada alrededor del 19% en mitílidos y alrededor del 33% en unionoideos (Hoeh et al., 1996). Los genomas F ocurren en los tejidos somáticos de ambos sexos y en las células germinales de las hembras (óvulos). Además, son heredados por vía materna (de madres a hijas hembras), ya que sólo los óvulos aportan mitocondrias al embrión luego de la fecundación, ya sea éste macho o hembra. Los genomas M se localizan en las células germinales de los machos (esperma) y son transmitidas a las generaciones siguientes a través de la línea paterna, es decir, de padres a hijos machos (Soroka, 2010; Zouros, 2013). Esto deriva en la presencia de ambos tipos de linajes mitocondriales en los tejidos somáticos de los machos (heteroplasmia).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Según Passamonti & Ghiselli (2009) y Zouros (2013) la ausencia de genoma mitocondrial paterno en hembras podría deberse a la presencia de, al menos, tres factores (**figura 2.4.4**). El factor W sería producido durante la espermatogénesis, marcando las mitocondrias del espermatozoide. Un segundo factor X reconocería las mitocondrias marcadas y las eliminaría (esto es lo que ocurriría en la mayoría de los metazoos). Un tercer factor Z, que presentaría un alelo activo y otro inactivo, sería el encargado de bloquear el reconocimiento entre X y W, evitando la destrucción de las mitocondrias masculinas. El mecanismo por el cual sólo llega el genoma M al espermatozoide es todavía desconocido, pero podría estar ligado a la presencia del factor W. Cabe aclarar que aun no ha sido demostrada la presencia de los tres factores mencionados en Bivalvos.

Este fenómeno se ha observado, hasta ahora, sólo en Bivalvos y es característico también de los Donacidae (Theologidis et al., 2008), Mytilidae (Zouros et al., 1994) y Veneridae (Milani et al., 2014). Al parecer, no estaría relacionado con la presencia de hermafroditismo, pero sí podría estar influyendo en la determinación del sexo (Breton et al., 2011; Machordom et al., 2015). Hoeh et al. (2002) estudiaron la evolución de este fenómeno en Unionoideos (**figura 2.4.5**). En su hipótesis se observó que los genomas mitocondriales masculinos evolucionan separadamente de los genomas femeninos. Además, los primeros acumularon más sustituciones de bases que los segundos. Amaro et al. (2016) y Doucet-Beaupré et al. (2012) estudiaron por separado fragmentos de ADN masculinos y femeninos de COI en unionoideos teniendo en cuenta este fenómeno. Inclusive han sido presentados *primers* especiales para amplificar haplotipos masculinos (Curole, 2004 y Walker et al., 2007). También han surgido, en los últimos años, análisis de genomas mitocondriales masculinos y femeninos completos de distintas especies de unionoideos, tratando de dilucidar fenómenos complejos como la evolución y la herencia de caracteres mitocondriales (Burzynski et al., 2017; Doucet-Beaupré et al., 2010; Fonseca et al., 2016; Froufe et al., 2016; Huang et al., 2013 y Soroka & Burzynski, 2013, 2014).

Si bien hasta ahora no está demostrada la ocurrencia de este fenómeno en el género *Diplodon*, se asumió que está presente, por lo que fue necesario tomar precauciones a la hora de realizar estudios moleculares con genes mitocondriales, desde la toma de muestras de tejidos (evitando la contaminación de las muestras con tejido gonadal) hasta la interpretación de los resultados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para la extracción de ADN del tejido muscular del pie se contó con la ayuda del Laboratorio de Malacología y Sistemática Molecular del Departamento de Zoología- Instituto de Ciencias Biológicas- Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. El ADN se extrajo con un kit de extracción E.Z.N.A.® Mollusc DNA (Omega Bio-tek) siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Se lavó el material con agua para retirar todo el alcohol.
2. Se agregaron 200µL de solución de lisis nuclear con 1µL de proteinasa K.
3. Se incubó a 37°C (*overnight*) o a 56°C hasta que el pie se diluyó totalmente.
4. Se agregaron 80µL de la solución de precipitación proteica y se agitó vigorosamente usando el vórtex por 20 a 30 segundos.
5. Se centrifugó a 14.000rpm por 10 minutos observando la formación de un *pellet* oscuro.
6. Se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo con 200µL de isopropanol y se homogeneizó por inversión durante 20 minutos.
7. Se centrifugó a 14.000rpm por 10 minutos observando la formación de un *pellet* claro.
8. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 300µL de etanol 70%, se homogeneizó por inversión por 5 minutos para lavar el *pellet*.
9. Se centrifugó por 10 minutos.
10. Se retiró cuidadosamente el etanol y se colocó el tubo en la placa térmica hasta la evaporación total del etanol.
11. Se agregaron 25µL de solución de hidratación de ADN y se incubó a 65°C por 1 hora agitando periódicamente.

Luego de la extracción se realizó una corrida electroforética para detectar la presencia de ADN y la calidad del mismo. La electroforesis fue llevada a cabo en gel de agarosa al 1%: 0.8gr agarosa + 80ml *buffer* Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X. La corrida se realizó en *buffer* TBE 1X por 40 minutos a 90v y las muestras fueron teñidas con GelRed™ al 5%. Los resultados fueron observados en un transiluminador UV.

Para la cuantificación se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop™ previamente calibrado con agua Milli-Q® autoclavada y reservada en *freezer*. Se midió 1µl de ADN de cada muestra. Se realizaron 3 repeticiones de cada muestra para obtener un promedio de la concentración de ADN y de su grado de pureza, este último definido como la relación de los espectros 260/280 ya explicado.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE SECUENCIAS

La amplificación de los fragmentos de interés fue realizada mediante la técnica de PCR. Los *primers* utilizados y sus características se describen en la **tabla 2.5.3**. Los mismos fueron previamente hidratados con *buffer*TE y luego diluidos con agua Milli-Q® ultrapura en una relación 1:40. La proporción de cada componente utilizado en la mix para PCR se resume en la **tabla 2.5.4**. Se consideró un error de pipeteo de 10µl, los cuales fueron agregados al total de mix. Con el objetivo de comprobar la ausencia de contaminación de la mix, para cada PCR se preparó un control negativo con mix sin ADN. El ciclado se realizó en un termociclador Mastercycler 384 (EPPENDORF). La temperatura de hibridación del *primer* fue de 48°C. El ciclado completo se detalla en la **tabla 2.5.5**. Para comprobar la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1%. Se sembraron 2µL de amplicón + 2,5µL revelador (GelRed™ + *buffer*). Para comparar se utilizó un *ladder* de 70-1.300 pares de bases, compuesto por el virus φX174 digerido con Hae III. El gel fue observado en el transiluminador ya mencionado. Las muestras amplificadas fueron guardadas en *freezer*.

La purificación del amplicón se realizó por separación magnética colocando los tubos con los productos de PCR en una placa imantada. Luego se agregaron a cada muestra 400µl de la sustancia separadora Agencourt® AMPure® y se colocó la placa imantada en un vórtex. Se dejó reposar en la placa durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Por último, se realizaron dos lavados con 100µl de etanol 70°. Cada muestra se dejó secar y se completó con agua Milli-Q® ultrapura.

### SECUENCIACIÓN Y EDICIÓN DE LAS SECUENCIAS

La secuenciación en ambos sentidos *-forwardy reverse-* fue realizada por separado mediante el método de Sanger con el servicio de MACROGEN Inc, Corea. Las secuencias fueron editadas con el *software* libre Chromas Lite 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, 2018). La edición incluyó el corte de ambos extremos de la secuencia, en los que la lectura de nucleótidos suele ser de baja calidad. Para ello se consideró cortar hasta que la calidad de diez bases contiguas fue de 15. La calidad de cada base representa el orden de magnitud de la probabilidad de error en la secuenciación de esa base, multiplicado por 10. El valor máximo de calidad es 60, indicando una probabilidad de 1:1.000.000 de que la base en cuestión sea incorrecta. La cadena *reverse* fue transformada a su reverso y complementario. Luego ambas cadenas editadas fueron alineadas con el programa Jalview versión 2.11.0 (Waterhouse et al., 2009) y corregidas para obtener la secuencia consenso de cada par. Por último, con el fin de corroborar la identidad de las muestras, todas las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de ejemplares asignados al género *Diplodon* depositadas en GenBank a través de la herramienta BLAST (Altschul et al., 1990) proporcionada por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information Search database, 2020).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Para el alineamiento se utilizaron las secuencias obtenidas por PCR y las secuencias de ejemplares asignados al género *Diplodon* para el fragmento de COI disponibles en GenBank (tabla 2.5.2). Además, se seleccionaron de la misma base de datos como *outgroup* dos secuencias de dos ejemplares de *Castalia ambigua* Lamarck, 1819: JN243889.1 (Whelan et al., 2011) y KU888242.1 (Santos-Neto et al., 2016). El alineamiento se realizó mediante el método de ClustalW (Thompson et al., 1994). Para ello se utilizó el programa MEGA 7.0.26 (Kumar et al., 2016). Los parámetros se conservaron por defecto:

- ~ Penalización a la formación de gaps: 15.
- ~ Penalización a la extensión de gaps: 6,66.
- ~ Costos de las transiciones: 0,5.

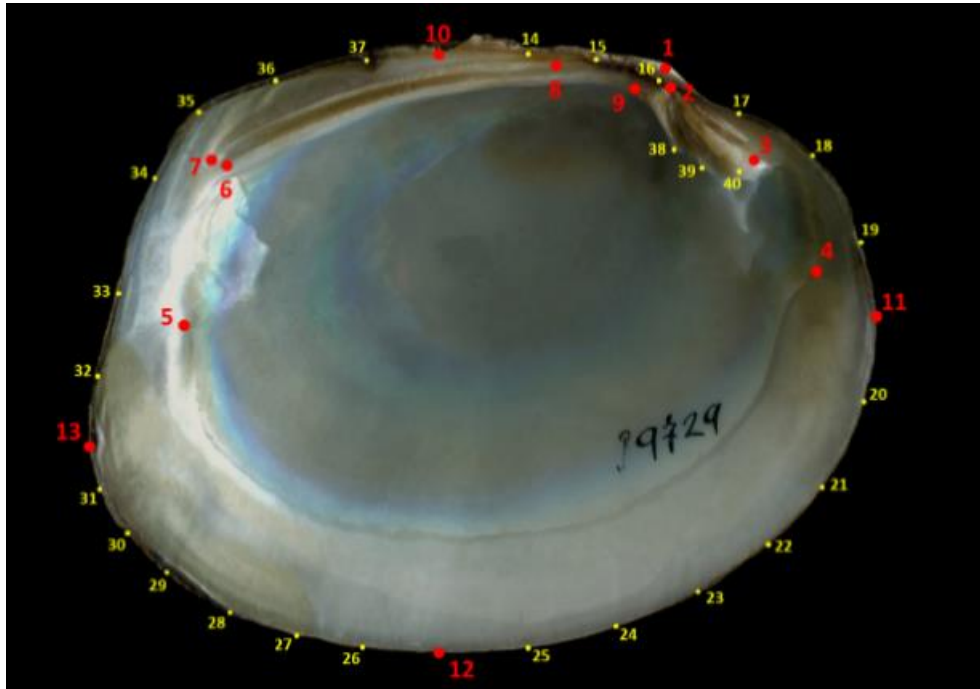
Con el mismo software se calculó el árbol consenso de *Neighbour Joining* (NJ). Este procedimiento se realiza a partir de una matriz de distancias entre secuencias genéticas. De allí se obtiene un árbol consenso realizando permutaciones en las agrupaciones de las secuencias y seleccionando la topología que mejor ajuste a la matriz original. El árbol consenso no tiene raíz y la distancia entre los nodos representa la divergencia entre las secuencias (Saitou & Nei, 1987). También se calcularon los valores de *Bootstrap* - porcentaje de réplicas del árbol en las cuales los taxa se agruparon juntos- asociados a cada rama, realizando mil permutaciones (Felsenstein, 1985; Tamura et al., 2004). Para la formación del árbol de NJ se mantuvieron los parámetros por defecto, como ser: modelo de sustitución de nucleótidos *Maximum Composite Likelihood*, incluyendo transiciones + transversiones, con rasgos uniformes, patrón homogéneo entre linajes y considerando los gaps como deleciones. Con el fin de realizar un árbol a escala se calculó la distancia entre taxa con el método de *Maximum Composite Likelihood* (Tamura et al., 2004), siendo la unidad el número de sustituciones de bases por sitio.



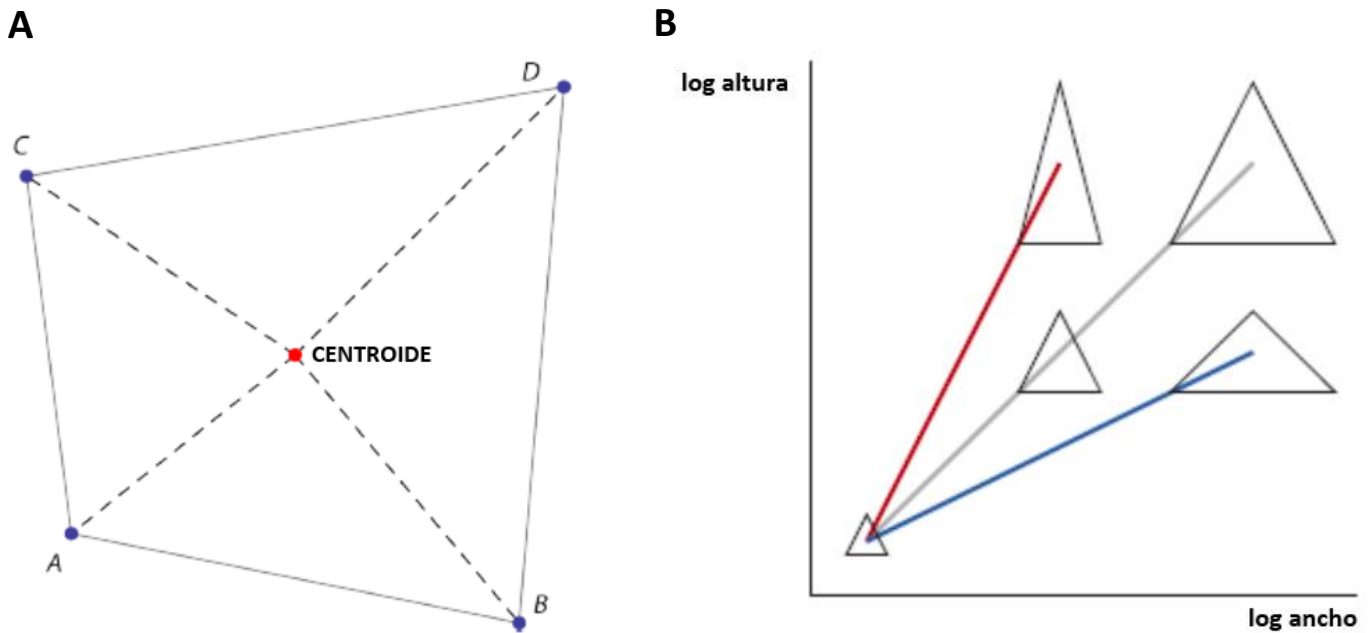
**FIGURA 2.4.1** Sitio de muestreo en el balneario El Retobado, arroyo Yuquerí Grande, Entre Ríos.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

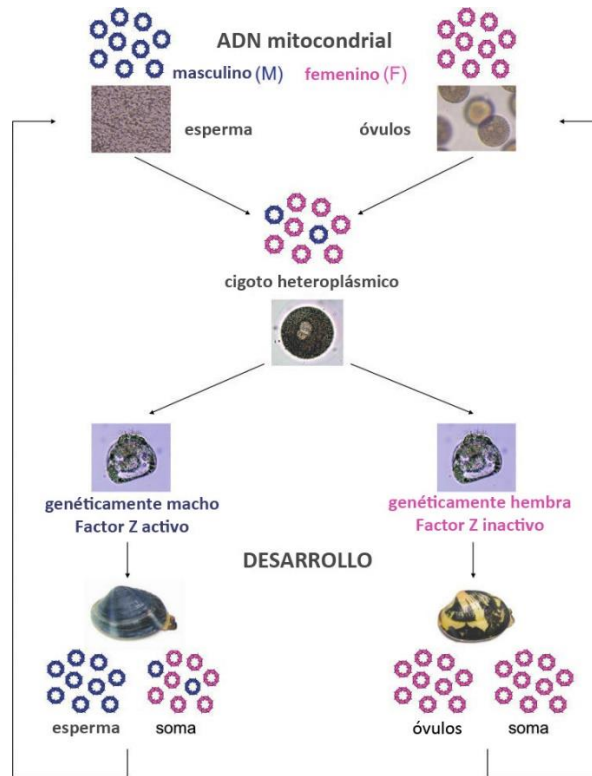


**FIGURA 2.4.2** Configuración de *landmarks* (puntos rojos) y *semilandmarks* (puntos amarillos) sobre la valva izquierda de un ejemplar de *Diplodon* para el análisis preliminar.

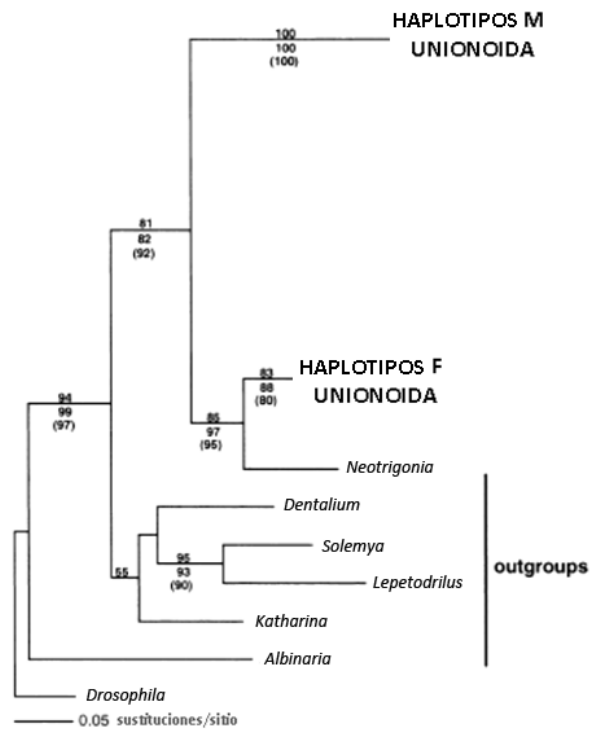


**FIGURA 2.4.3** A) Centroide de un polígono de cuatro puntos. Tomada de Mitteroecker et al. (2013). B) Relación entre la altura y el ancho, en escala logarítmica, en un conjunto de triángulos. Tomada de Klingenberg (2016). Línea roja: alometría de la altura respecto del ancho; Línea azul: alometría del ancho respecto de la altura. Línea gris: crecimiento isométrico.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS



**FIGURA 2.4.4** Hipótesis sobre el mecanismo de herencia en bivalvos que presentan DUI. Modificado de Passamonti & Ghiselli (2009).



**FIGURA 2.4.5** Hipótesis sobre la evolución del DUI en unionoideos. Tomada de Hoeh et al. (2002).

**TABLA 2.5.1** Listado de los *landmarks* y *semilandmarks* seleccionados para el análisis morfométrico.

NÚMERO	NOMBRE	OBSERVACIONES
1	Umbo	
2	Confluencia dorsal de los dientes subcardinales	Si hubiera un solo diente se toma como el extremo dorsal de ese diente
3	Extremo anterior de la charnela	
4	Contacto entre la impronta del músculo aductor anterior y la línea paleal	
5	Contacto entre la impronta del músculo aductor posterior y la línea paleal	
6	Extremo posterior diente lateral inferior	
7	Extremo posterior diente lateral superior	
8	Extremo anterior diente lateral superior	O confluencia del mismo con el diente inferior
9	Extremo posterior de la charnela	Extremo posterior del diente subcardinal más posterior. Si hubiera un solo diente se toma como el extremo posterior de ese diente
10	Máxima curvatura dorsal	Punto tangente entre el borde dorsal y una línea paralela a la línea que cruza los puntos 7 y 8
11	Máxima curvatura anterior	Punto tangente entre el borde anterior y una línea perpendicular a la línea que cruza los puntos 7 y 8
12	Máxima curvatura ventral	Punto tangente entre el borde ventral y una línea paralela a la línea que cruza los puntos 7 y 8
13	Máxima curvatura posterior	Punto tangente entre el borde posterior y una línea perpendicular a la línea que cruza los puntos 7 y 8
14-19	<i>Semilandmarks</i> entre los puntos 10 y 11	<i>Minimum bending energy</i>
20-25	<i>Semilandmarks</i> entre los puntos 11 y 12	<i>Minimum bending energy</i>
26-31	<i>Semilandmarks</i> entre los puntos 12 y 13	<i>Minimum bending energy</i>
32-37	<i>Semilandmarks</i> entre los puntos 13 y 10	<i>Minimum bending energy</i>
38-40	<i>Semilandmarks</i> entre los puntos 3 y 9	<i>Minimum bending energy</i>

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**TABLA 2.5.2** Secuencias moleculares de ejemplares asignados al género *Diplodon* accesibles en GenBank y utilizadas en el análisis molecular.

ESPECIE	CÓDIGO GENBANK	GEN	REFERENCIA
<i>D. chilensis</i>	DQ191410.1	COI	Graf & Cummings (2006)
<i>D. chilensis</i>	AF305380.1	28S	Graf (2002)
<i>D. deceptus</i>	AF231744.1	COI	Bogan & Hoeh (2000)
<i>D. demeraraensis</i>	KP184898.1	COI	Graf et al. (2015)
<i>D. demeraraensis</i>	KP184899.1	COI	Graf et al. (2015)
<i>D. demeraraensis</i>	KP184875.1	28S	Graf et al. (2015)
<i>D. demeraraensis</i>	KP184874.1	28S	Graf et al. (2015)
<i>D. demeraraensis</i>	KP184849.1	16S	Graf et al. (2015)
<i>D. demeraraensis</i>	KP184850.1	16S	Graf et al. (2015)
<i>D. suavidicus</i>	KU888263.1	COI	Santos-Neto et al. (2016)
<i>D. suavidicus</i>	KU888232.1	16S	Santos-Neto et al. (2016)
<i>D. suavidicus</i>	KU888203.1	18S-ITS1	Santos-Neto et al. (2016)

**TABLA 2.5.3** Primers utilizados para el análisis molecular. pb=pares de bases.

PRIMER	LOCUS	DIRECCIÓN	SECUENCIA 5'-3'	FRAGMENTO AMPLIFICADO	REFERENCIA	TEMPERATURA HIBRIDACIÓN
<i>F-LCO1490</i>	COI	Forward	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	≈710pb	Folmer et al. (1994)	48°C
<i>R-HCO2198</i>	COI	Reverse	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	≈710pb	Folmer et al. (1994)	48°C

**TABLA 2.5.4** Composición de la mix de 10µL y 25µL para PCR por muestra de ADN.

	PROPORCIÓN (mM/MUESTRA)	PROPORCIÓN (µL/MUESTRA)
<i>Agua</i>	6,69	16,73
<i>Buffer Magnesio</i>	2	5
<i>Mezcla dNTPs</i>	0,16	0,4
<i>Primer Forward</i>	0,1	0,25
<i>Primer Reverse</i>	0,1	0,25
<i>Taq Go®</i>	0,05	0,25
<i>ADN</i>	1	2,5
<b>TOTAL</b>	<b>10</b>	<b>25</b>

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

**TABLA 2.5.5** Perfil térmico utilizado en la reacción de PCR.

PASOS POR CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO
<i>DESNATURALIZACIÓN</i>	94°C	30 segundos
<i>HIBRIDACIÓN</i>	48°C	30 segundos
<i>ELONGACIÓN</i>	72°C	1 minuto
CICLOS	34	3 horas 48 minutos

**CAPÍTULO 3**

**MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA**

**DEL GÉNERO *Diplodon***

Desde los primeros estudios del género *Diplodon* hasta la actualidad, no hay consenso en cuanto al número de especies que componen el género y la delimitación del mismo. La información taxonómica precisa sobre los unionoideos cobra vital importancia en términos de su conservación. En este capítulo se propuso analizar si las variaciones morfométricas de las valvas de bivalvos adultos apoyan las agrupaciones *D. (Rhipidodonta)*, *D. (Diplodon)* y *D. (Australis)* y discutir su estatus taxonómico, es decir, si se justifica su separación en géneros distintos. Además, se buscó establecer los caracteres de la conchilla que permiten identificar las especies de *Diplodon* y, a su vez, poner a prueba la validez de dichas especies en Argentina, incluyendo las que fueron sinonimizadas por otros autores. Se analizaron un total 43 ejemplares tipo de 38 especies del género *Diplodon*. Este material fue agrupado según el subgénero. Separadamente, se digitalizaron imágenes en dos dimensiones de valvas izquierdas de 440 ejemplares del género *Diplodon* de colecciones nacionales, los cuales fueron agrupados por especie. Sobre la valva izquierda fueron seleccionados 13 *landmarks* y 27 *semilandmarks*. Se realizaron Análisis de Componentes Principales y Análisis de Variables Canónicas. Los resultados del análisis morfométrico comparativo entre subgéneros de este Trabajo de Tesis Doctoral no apoyaron la propuesta realizada por Simone (2006). A pesar de que se observaron diferencias en la morfología de la conchilla entre *Diplodon (Diplodon)* y *Diplodon (Rhipidodonta)*, los resultados estadísticos no mostraron una agrupación robusta ni tampoco una función discriminante confiable para separar ambos subgéneros. En este estudio, además, se observó la existencia de una tercera agrupación, compuesta por especies que no formaron parte de ninguno de los dos subgeneros, denominándose 'Indefinido'. Sin embargo, esta agrupación es ficticia y no fue sustentada al eliminar parte de la variación total. En cuanto al subgénero *Australis*, los resultados de este trabajo de tesis no han corroborado su validez. Si bien el análisis comparativo entre especies argentinas permitió delimitar a la mayoría de las especies de manera significativa, se sustentó la sinonimización de *D. piceus*, con *D. rhuacoicus*, propuesta por otros autores. *D. fortis* estuvo íntimamente relacionada con los ejemplares del género *Diplodon* patagónicos (*D. chilensis* + *D. patagonicus*). Los individuos de *D. chilensis* y *D. patagonicus* conformaron un solo grupo ( $p=0,79$ ). La especie mejor delimitada fue *D. parallelopipedon* ( $p<0,01$  en todas las comparaciones). Es necesario en un futuro realizar estudios de filogenia molecular en el género *Diplodon* y ampliar el conocimiento sobre la morfología de las larvas. El análisis fenético de las distancias morfométricas representa una base para sustentar hipótesis taxonómicas y generar nuevas hipótesis de agrupaciones de las especies del género *Diplodon*.

## CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

### 3.2. INTRODUCCIÓN

Desde que comenzaron a realizarse estudios del género *Diplodon* hasta la actualidad, no se ha llegado a un consenso en cuanto al número de especies que componen el género y la delimitación del mismo. La información taxonómica precisa sobre los unionoideos cobra vital importancia en términos de conservación, como ya se explicó en la **sección 1.4**.

*Diplodon* se compone de tres subgéneros: *D. (Australis)* Bonetto, Tassara & Rumi, 1986, *D. (Diplodon)* Simpson, 2014 y *D. (Rhipidodonta)* Mörch, 1853. Sin embargo Simone (2006), ha elevado el estatus de *D. (Rhipidodonta)* a género. Hasta el momento, sólo se han justificado las agrupaciones por las diferencias encontradas en la morfología de la valva. Simpson (1900) mencionó otro subgénero: *D. (Cyclomya)*. Sin embargo, al consultar las bases de datos y publicaciones actuales, se observó que este nombre cayó en desuso (Graf & Cummings, 2019; MolluscaBase, 2020).

Según Pereira et al. (2014) y Torres et al. (2018), en Argentina están presentes las especies *D. burroughianus*; *D. charruanus*; *D. chilensis*; *D. delodontus*; *D. hylaeus*; *D. parallelopipedon*; *D. paranensis*; *D. parodizi*; *D. peraeiformis*; *D. rhuacoicus*; *D. variabilis* y *D. wymanii*. Otras especies han sido mencionadas para la región, pero su estatus taxonómico no está claro (**tabla 1.1.2**).

La morfometría geométrica es un método que ha sido utilizado en unionoideos (Bailey & Green, 1988; Beauchamp et al., 2020; Beyett et al., 2020; Cano-Otalvaro et al., 2012; Echem et al., 2016; Fassatoui et al., 2015; Inoue et al., 2014; Jeratthitikul et al., 2019; Keogh et al., 2019; Morais et al., 2014; Troncon & Avelar, 2011; Zieritz & Alridge, 2009, 2011; Zieritz et al., 2010). Si bien se probó su capacidad para distinguir especies cercanas, esta herramienta no ha sido aún utilizada para resolver las discrepancias taxonómicas dentro del género *Diplodon*.

En este capítulo se analizó si las variaciones morfométricas de las valvas de ejemplares del género *Diplodon* apoyan las agrupaciones *Diplodon (Rhipidodonta)*, *D. (Diplodon)* y *D. (Australis)* y se discutió su estatus taxonómico, es decir, si se justifica su separación en géneros distintos. Además, se establecieron los caracteres de la conchilla que permiten identificar las especies del género *Diplodon* y, a su vez la validez de las especies mencionadas para Argentina, incluyendo las que fueron sinonimizadas por Graf & Cummings. (2019), como *D. fortis* y *D. trifidus* (sinónimos de *D. parallelopipedon*).

#### MATERIAL ESTUDIADO

Se contó con el aporte de imágenes de material tipo de museos y colecciones malacológicas de distintas partes del mundo (**tabla 3.7.1, figuras A1 y A2**). Se analizaron un total de 43 ejemplares, pertenecientes a un total de 38 especies válidas extraídas de diferentes fuentes de información: Encyclopedia of Life (2020), Freshwater Animal Diversity Assessment - FADA (2020), Graf & Cummings. (2019), Integrated Taxonomic Information System- ITIS (2020), MolluscaBase (2020), Pereira et al. (2014) y Simone (2006) (**tabla 1.1.3**).

El material de *Diplodon* fue separado en tres grupos, según el subgénero asignado en la bibliografía: *D. (Australis)*, *D. (Diplodon)* y *D. (Rhipidodonta)* (**sección 1.1**). Aquellos ejemplares que no aparecen asignados a un subgénero en la bibliografía fueron agrupados en un cuarto conjunto, denominado “Indefinido”.

El ejemplar tipo de *Diplodon obsolescens* Baker, 1913 (ejemplar 27) fue eliminado del análisis, debido al mal estado de conservación de la valva izquierda y la ausencia de la valva derecha, lo cual impidió su reconstrucción. Además, debido a la ausencia de datos como institución y número de catálogo, no se pudo acceder al material tipo de *D. besckeanus* (Dunker, 1848), *D. deceptus* Simpson, 1914, *D. guaporensis* Bonetto & Tassara, 1987, *D. kotserizi* (Clessin, 1888), *D. pfeifferi* (Dunker, 1848), *D. rotundus* (Spix in Wagner, 1827), *D. solidulus* (Philippi, 1869), *D. variabilis* (Maton, 1811) y *D. voltzi* Vernhout, 1914. *D. solidulus* es la única especie perteneciente al subgénero *D. (Australis)*, con lo cual fue necesario incluir esta especie en el análisis de subgéneros (**sección 1.1**). Ante la imposibilidad de utilizar el material tipo de *D. solidulus*, se decidió utilizar un ejemplar cuyos datos de procedencia se muestran en la **tabla 3.7.1**.

Separadamente, se digitalizaron imágenes en dos dimensiones de valvas izquierdas de 440 ejemplares del género *Diplodon* facilitados por las colecciones malacológicas nacionales del Museo de La Plata (MLP) y del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN) (**tabla A2**). Los ejemplares del género *Diplodon* de Argentina fueron agrupados por especie para realizar las comparaciones.

#### ANÁLISIS DE LAS CONFIGURACIONES MORFOMÉTRICAS

Sobre la valva izquierda fueron seleccionados 13 *landmarks* y 27 *semilandmarks*. Se calculó la configuración consenso de los conjuntos estudiados y se realizaron Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminantes (Canónicos y Pareados). Por último, se calcularon las distancias de Mahalanobis entre los grupos (**sección 2.3**). Con la matriz de distancias de Mahalanobis entre especies del género *Diplodon* de Argentina y se realizó un análisis de conglomerados UPGMA-MDGC y se confeccionó un dendrograma de distancias fenéticas.

#### ANÁLISIS DE LOS SUBGÉNEROS DEL GÉNERO *Diplodon*

La configuración consenso de este conjunto de ejemplares (**figura 3.6.1**) presentó una forma ovalada, sin puntas marcadas en los extremos, con el borde dorsal más convexo que el ventral y con dientes subcardinales casi paralelos entre sí y con el borde de la valva.

Los resultados del análisis de regresión se exponen en la **figura 3.6.2** y en la **tabla 3.7.2A**. No se comprobó la presencia de alometría entre el Tamaño del Centroide y las coordenadas alineadas de Procrustes ( $p=0,78$ ), con lo cual se acepta la hipótesis nula de independencia de la forma respecto del tamaño. La alometría explicó el 1,25% de la variación morfométrica en el conjunto estudiado.

En la **figura 3.6.3** y en la **tabla A3** se observa que los componentes principales 1 a 10 fueron los que incluyeron el 95,45% de la variabilidad en la muestra de ejemplares tipo. Se graficó la interacción entre los dos primeros componentes, los cuales abarcan el 66,43% de la variación total. La distribución de las configuraciones del Análisis de Componentes Principales (**figura 3.6.4**) no permitió distinguir agrupaciones de subgéneros. Las formas del género *Diplodon* desplazadas hacia el extremo del Componente Principal 1 presentaron contorno romboidal, con borde dorsal más convexo y borde ventral más cóncavo que la forma consenso. Ejemplos de esta configuración fueron los individuos 20 (*D. solisianus*), 38 (*D. chilensis*) y 41 (*D. caipirus*). Las formas desplazadas hacia el extremo del Componente Principal 2 fueron más ovaladas y mostraron un extremo posterior más alargado y ahusado. Ejemplos de esta configuración fueron los individuos 1 (*D. parallelopipedon*), 2 (*D. parodizi*) y 16 (*D. uruguayensis*).

A continuación, se presentan los resultados de los Análisis Discriminantes para el conjunto del material tipo de las especies de *Diplodon*. En el Análisis Canónico utilizando la variación del total de 40 componentes principales (**tabla 3.7.3A**), la primera variable canónica aportó el 84,35% de la variación total y la segunda el 15,65%. Cuando se realizó el Análisis Canónico con los primeros 6 componentes principales (89,06% de la variación total), la primera variable canónica incluyó un 73,42% y la segunda variable canónica un 26,58% (**tabla 3.7.3B**).

En la **figura 3.6.5A** y en la **tabla 3.7.4** se exponen los resultados del Análisis Canónico con 40 Componentes Principales, comparando las agrupaciones consideradas. Se evidenció una separación entre los subgéneros *Diplodon* (*Diplodon*) y *D. (Rhipidodonta)* (distancia=5,33;  $p<0,01$ ). Los ejemplares del conjunto “Indefinido” formaron una agrupación separada ( $p<0,01$ ) y con una distancia de Mahalanobis mayor que la distancia entre los subgéneros (distancias de 6,45 y 9,8 respectivamente), conformándose así el grupo (*D. (Diplodon)* + *D. (Rhipidodonta)*) + “Indefinido”. El Análisis Canónico llevado a cabo con 6 componentes principales (**figura 3.6.5B**) no mostró diferencias entre las agrupaciones propuestas.

### ***CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO Diplodon***

Los resultados del Análisis Discriminante entre los subgéneros *D. (Diplodon)* y *D. (Rhipidodonta)* se exponen en las **figuras 3.6.6 y 3.6.7** en la **tabla 3.7.5**. Los grupos no se diferenciaron de manera significativa, con lo cual no se obtuvo una función discriminante robusta entre ambos subgéneros. El porcentaje de error total en la clasificación cruzada fue de 23,08%.

#### ***ANÁLISIS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO Diplodon EN ARGENTINA***

La forma consenso (**figura 3.6.8**) expresó una configuración ovalada, con borde ventral cóncavo, borde posterior recto y extremo posterior formando una punta. Los dientes subcardinales fueron largos, con el diente inferior más curvado hacia el borde ventral que el diente superior.

La **figura 3.6.9** y los resultados estadísticos de la regresión (**tabla 3.7.2B**) sustentaron la presencia de alometría en el conjunto de ejemplares estudiados, ya que las coordenadas alineadas de Procrustes crecieron de forma lineal en función del aumento del Tamaño del Centroide ( $p < 0,0001$ ), con lo cual se rechazó la hipótesis nula de independencia de la forma respecto del tamaño. La alometría explicó el 5,66% de la variación morfométrica en el conjunto estudiado. Las especies *D. burroughianus*, *D. parallelopipedon* y *D. rhuacoicus* presentaron alometría positiva, mientras que *D. piceus* mostró una relación alométrica negativa.

Para el grupo de ejemplares del género *Diplodon* de Argentina fueron los nueve primeros componentes principales los que contuvieron el 95,74% de la variabilidad total (**figura 3.6.10 y tabla A4**). La distribución de las configuraciones del Análisis de Componentes Principales (**figura 3.6.11**) no permitió distinguir agrupaciones por especies. Los individuos del conjunto estudiado que estuvieron más desplazados hacia el extremo del Componente Principal 1 (individuos de *D. parallelopipedon*) mostraron configuraciones alargadas y deprimidas, con bordes dorsal y ventral paralelos, borde anterior redondeado, extremo posterior formando una punta desplazada hacia el margen ventral y dientes subcardinales cortos. Algunos individuos de *D. chilensis* y *D. patagonicus*, desplazados hacia el extremo del Componente Principal 2, se caracterizaron por presentar formas ovoides con borde dorsal convexo y dientes subcardinales rectos.

Seguidamente, se detallan los datos obtenidos en el Análisis Canónico para el conjunto de especies del género *Diplodon* de Argentina. La varianza de las variables canónicas en el Análisis Canónico con el total de 76 componentes principales y en el Análisis Canónico con los primeros tres componentes principales (80,97% de la variación total) se presentan en la **tabla 3.7.6**.

El Análisis Canónico por especie con el total de 76 Componentes Principales (**figura 3.6.12A y tabla 3.7.7**) permitió distinguir especies en la mayoría de las comparaciones entre pares de especies del género *Diplodon* de Argentina, con valores de probabilidad significativos ( $p < 0,05$ ). Las excepciones observadas ocurrieron entre *D. fortis* - *D. charruanus* (distancia=6,05;  $p=0,27$ ), *D. fortis* - *D. chilensis* (distancia=5,99;  $p=0,53$ ), *D.*

### **CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon***

*fortis* - *D. peraeformis* (distancia=12,02; p=0,1), *D. fortis* - *D. rhuacoicus* (distancia=5,82; p=0,21), *D. chilensis* - *D. patagonicus* (distancia=3,55; p=0,8), *D. piceus* - *D. peraeformis* (distancia=12,1; p=0,05) y *D. piceus* - *D. rhuacoicus* (distancia=4,45; p=0,22).

El Análisis Canónico con los primeros tres Componentes Principales (**figura 3.6.12B**) no mostró diferencias entre especies, con porcentajes de error mayores al 10% en la clasificación cruzada para todas las especies excepto *D. parallelopedon* (error%=7,58) (**tabla 3.7.8**). De 66 individuos clasificados como *D. parallelopedon*, 61 fueron clasificados dentro de esa especie y 5 fueron clasificados como *D. chilensis*.

Mediante el análisis de conglomerados de la **figura 3.6.13** se observó que las especies más distantes y significativamente distintas del conjunto de especies fueron *Diplodon peraeformis*, *D. paranensis* y *D. parallelopedon*, con distancias mayores a 8 unidades de Mahalanobis con las demás especies. También se observó una agrupación entre *D. fortis* y *D. chilensis* + *D. patagonicus*, aunque no resultó significativa. Lo mismo ocurrió entre *D. piceus* y *D. rhuacoicus*.

Simone (2006) propone elevar a categoría genérica al subgénero *Diplodon (Rhipidodonta)* sobre la base de la presencia de gloquidios parásitos en su ciclo de vida. Sin embargo, el ciclo de numerosas especies no es conocido (sección 1.2). Además, muchas especies del grupo han sido poco estudiadas y se desconoce la morfología del gloquidio. En el caso del género *Diplodon*, son escasos los trabajos referentes al ciclo parasitario completo de las especies (Mansur, 1999), tampoco hay muchos registros de hospedadores confirmados (Bonetto & Ezcurra, 1963) o potenciales (Mansur, 1999; Bonetto, 1954). Clásicamente se considera que los gloquidios que presentan ganchos en sus valvas son de tipo parásito, ya que se interpreta que los mismos son parte fundamental del sistema de fijación a los tejidos del hospedador (sección 1.3). Bonetto et al. (1986) proponen la presencia o ausencia de ganchos en el gloquidio como criterio para determinar los subgéneros, sin hacer mención sobre su ciclo de vida. Miyahira (2017), en relación a esta problemática, remarcó la necesidad de incluir otros aspectos como la morfología de los adultos y estudios moleculares para contrastar la separación en subgéneros.

Los resultados del análisis morfométrico comparativo entre subgéneros de este Trabajo de Tesis Doctoral no apoyaron la propuesta realizada por Simone (2006). A pesar de que se observaron diferencias en la morfología de la conchilla entre *Diplodon (Diplodon)* y *Diplodon (Rhipidodonta)*, los resultados estadísticos no mostraron una agrupación robusta ni tampoco una función discriminante confiable para separar ambos subgéneros.

En este estudio, además, se observó la existencia de una tercera agrupación, compuesta por especies que no formaron parte de ninguno de los dos subgeneros, denominándose 'Indefinido'. Sin embargo, esta agrupación es ficticia y no fue sustentada al eliminar parte de la variación total.

Bonetto et al. (1986) argumentaron la necesidad de crear un tercer subgénero denominado *Diplodon (Australis)* dentro del género *Diplodon*. El mismo tendría sustento debido a que la morfología larval de *D. solidulus* (Philippi, 1869), no se ajusta a la de los otros dos subgéneros. Los resultados de la morfometría geométrica no apoyaron la existencia de *D. (Australis)* como una agrupación independiente del género *Diplodon*. En este Trabajo de Tesis Doctoral se incluyó un ejemplar de *Diplodon solidulus* en el análisis, para contrastar la validez del subgénero *D. (Australis)*. Dicho ejemplar no es un holotipo, ya que Philippi (1869) no designó un holotipo al describir la especie.

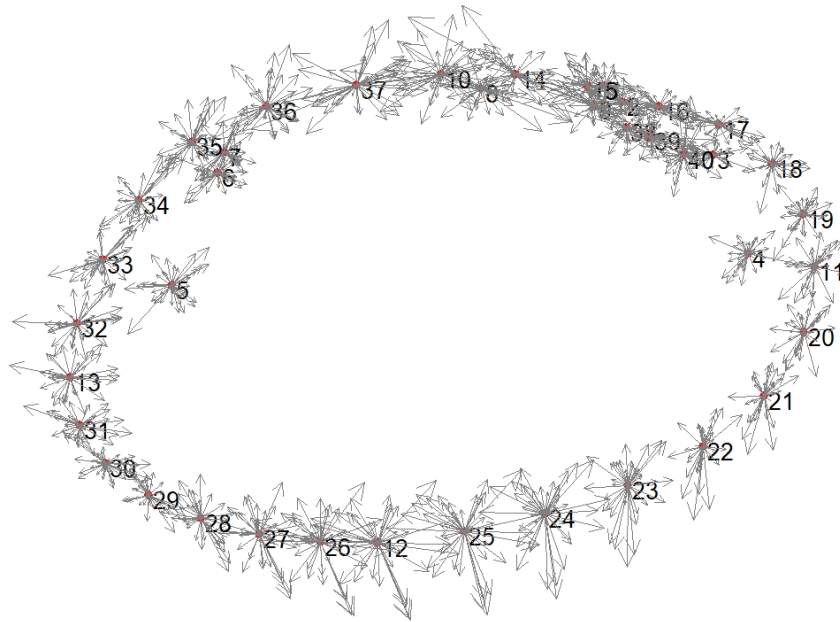
Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis Doctoral mostraron tendencias en la variación de las valvas del género *Diplodon*, pero deben considerarse limitados debido a las diferencias entre los análisis de la variación total y aquellos realizados con un porcentaje reducido de la variación morfométrica.

### **CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon***

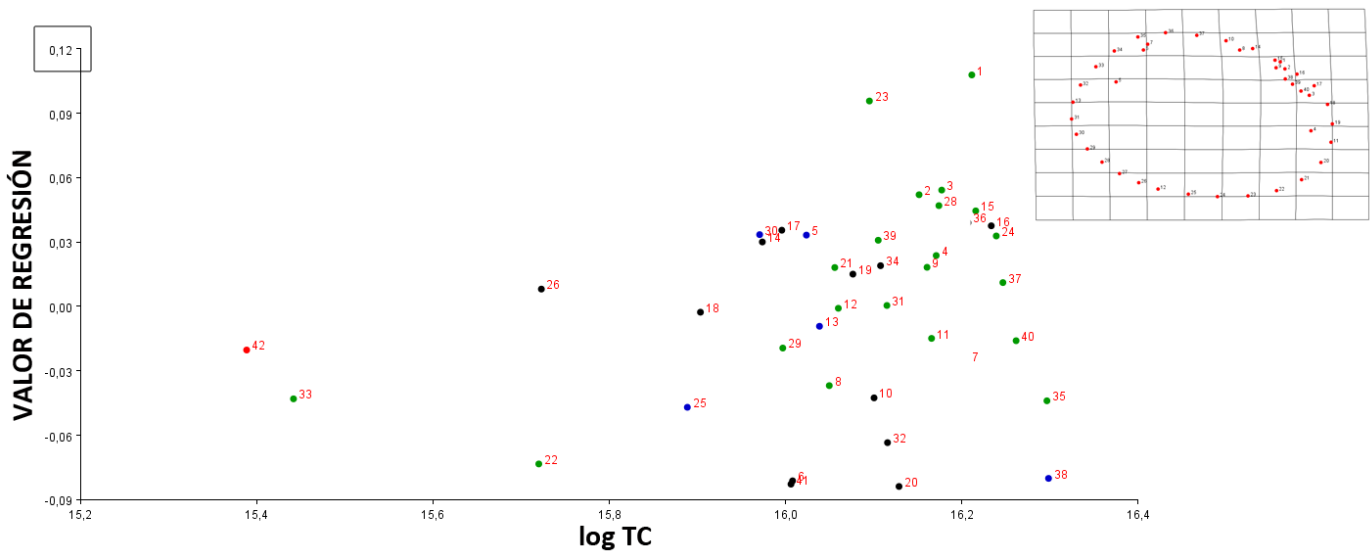
Según los datos de la comparación entre especies del género *Diplodon* de Argentina, la especie más robusta fue *D. parallelopedon*, mientras que la menos robusta fue *D. fortis*. La conformación de los ejemplares de *D. parallelopedon* fue afectada por crecimiento alométrico del extremo posterior. Los resultados del Análisis Canónico no apoyan la separación entre *D. chilensis* y *D. patagonicus* propuesta por Parada & Peredo (2002, 2008) (sección 1.2), ya que no se apreciaron diferencias morfométricas que justifiquen dicha separación. Con lo cual ambos conjuntos deberán denominarse como *D. chilensis* (Gray, 1828) de acuerdo al Principio de Prioridad de la Nomenclatura Zoológica.

Los datos obtenidos en el análisis morfométrico también permitieron sustentar la sinonimización de *D. piceus* con *D. rhuacoicus* propuesta por Graf & Cummings (2019). *D. fortis* estuvo, sin embargo, más relacionada con los ejemplares de las especies del género *Diplodon* de Patagonia (*D. chilensis* + *D. patagonicus*), y no asociada a *D. rhuacoicus* como propusieron los autores. Bonetto (1960) planteó que *D. rhuacoicus* tiene una relación más estrecha con *D. expansus*, especie que se extiende desde el sur de Brasil por el río Paraguay y por el Paraná Superior y Medio. Incluso mencionó la posibilidad de que estas dos especies fueran sinónimos. Haas (1930), Ortmann (1921) y Castellanos (1960) agruparon a *D. rhuacoicus* con las especies de Patagonia.

El análisis fenético de las distancias morfométricas representó una base sólida para sustentar hipótesis taxonómicas y generar nuevas hipótesis de agrupamiento en el género *Diplodon*, las cuales deben contrastarse con otros estudios.

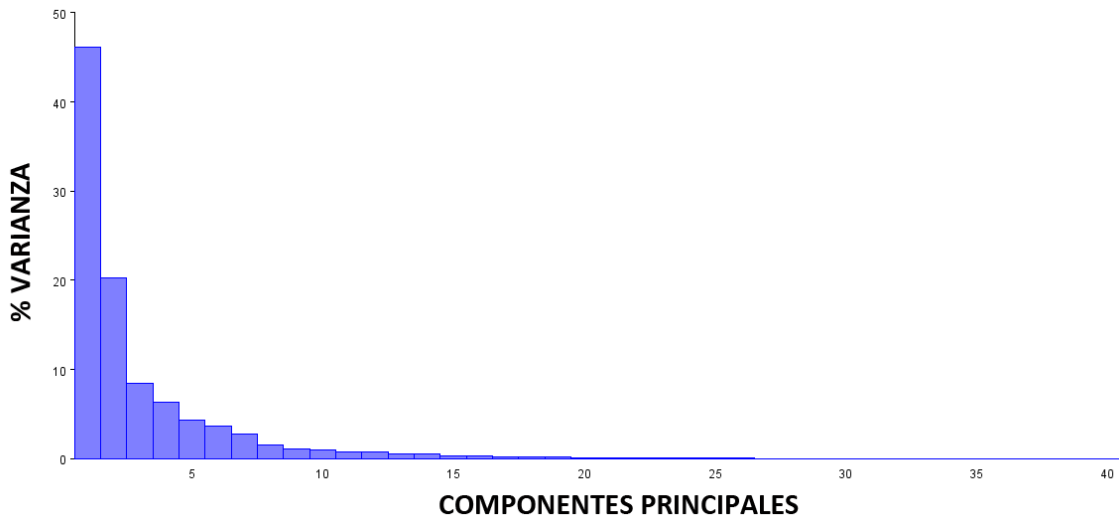


**FIGURA 3.6.1** Configuración consenso del material tipo del género *Diplodon*. Las flechas representan la desviación de los landmarks en los ejemplares estudiados.

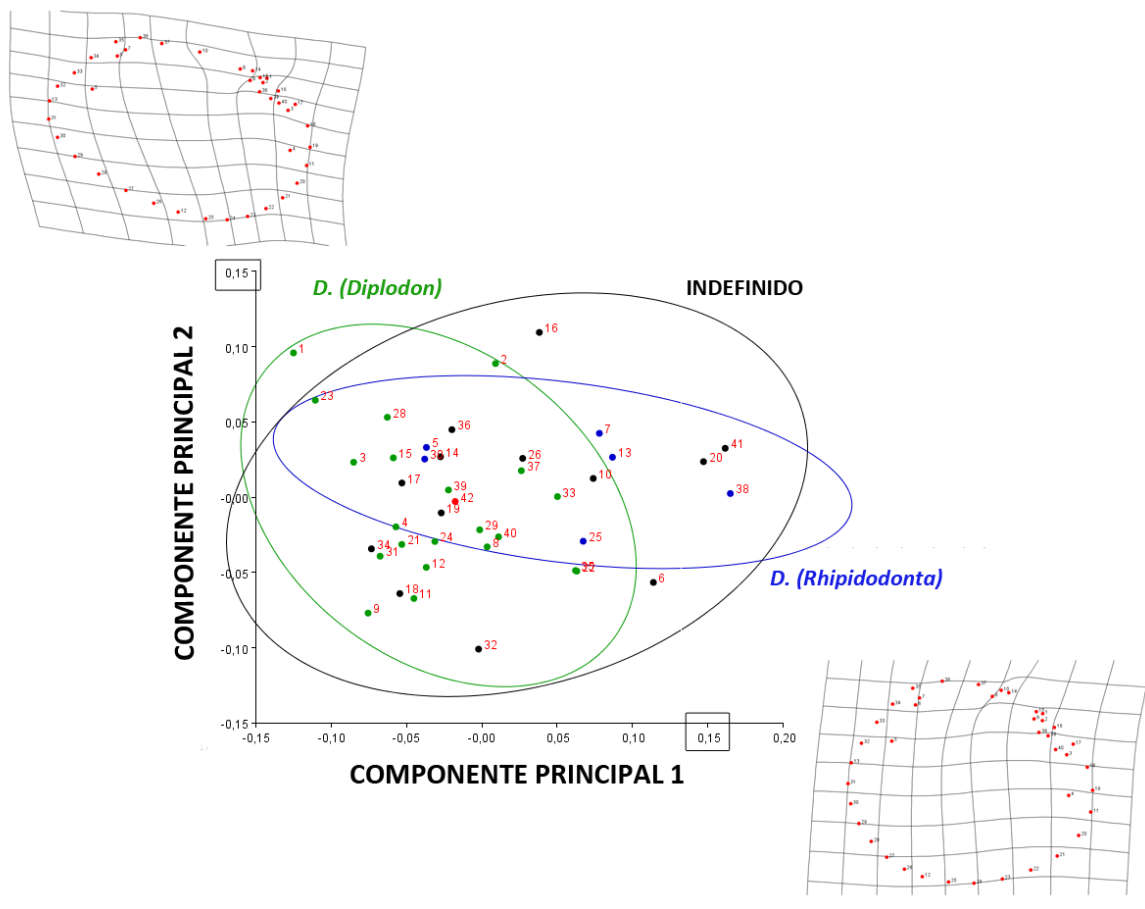


**FIGURA 3.6.2** Análisis de regresión de la variación morfométrica en función del tamaño del centroide, transformado a su logaritmo en base 10, para los ejemplares tipo de las especies del género *Diplodon*. Puntos verdes=*D. (Diplodon)*; puntos azules=*D. (Rhipidodonta)*; puntos rojos=*D. (Australis)*; puntos negros= grupo Indefinido.

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*



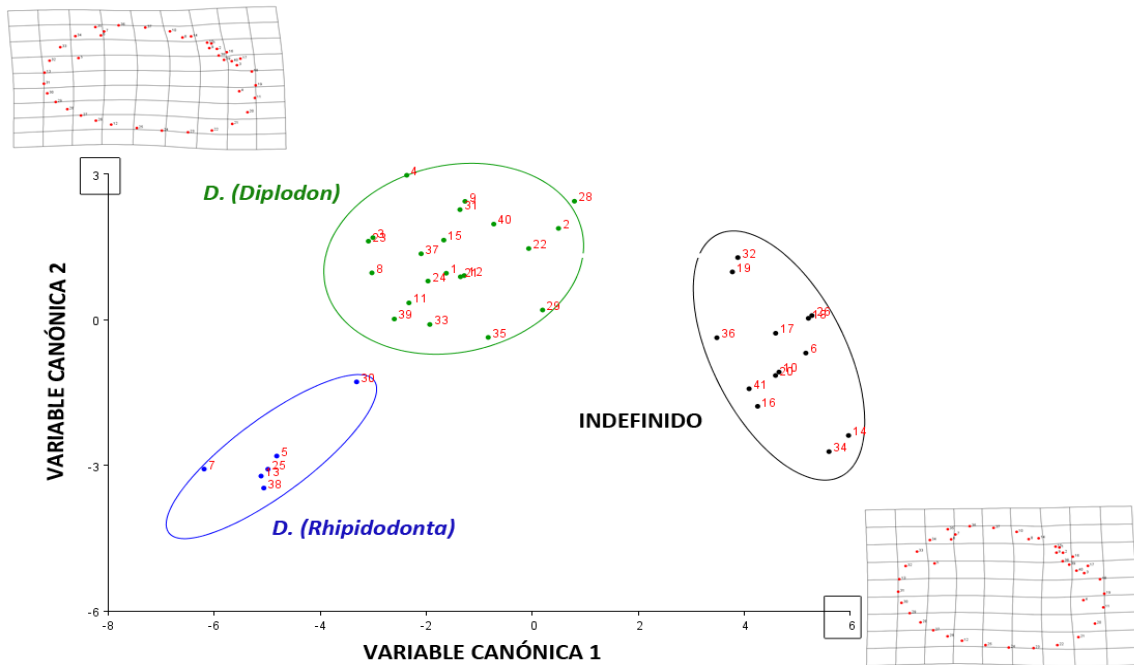
**FIGURA 3.6.3** Porcentajes de varianza aportados por cada componente principal en el Análisis de Componentes Principales para los ejemplares tipo de las especies del género *Diplodon* consideradas para este Trabajo de Tesis Doctoral.



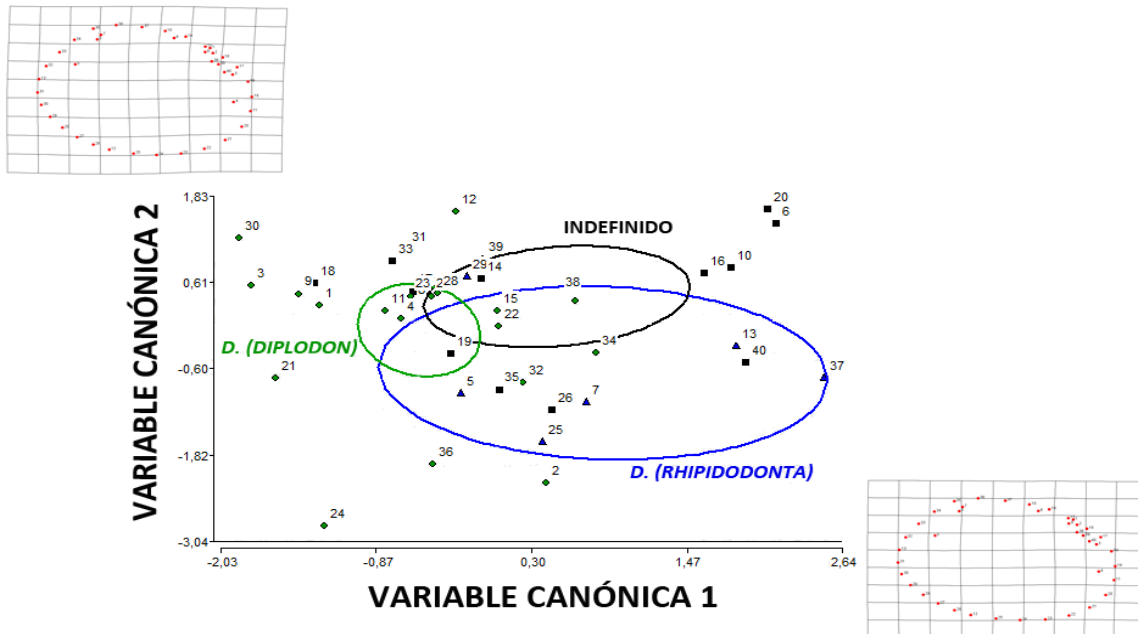
**FIGURA 3.6.4** Resultados del Análisis de Componentes Principales comparando subgéneros del género *Diplodon*. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó cada grilla de deformación.

## CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

A

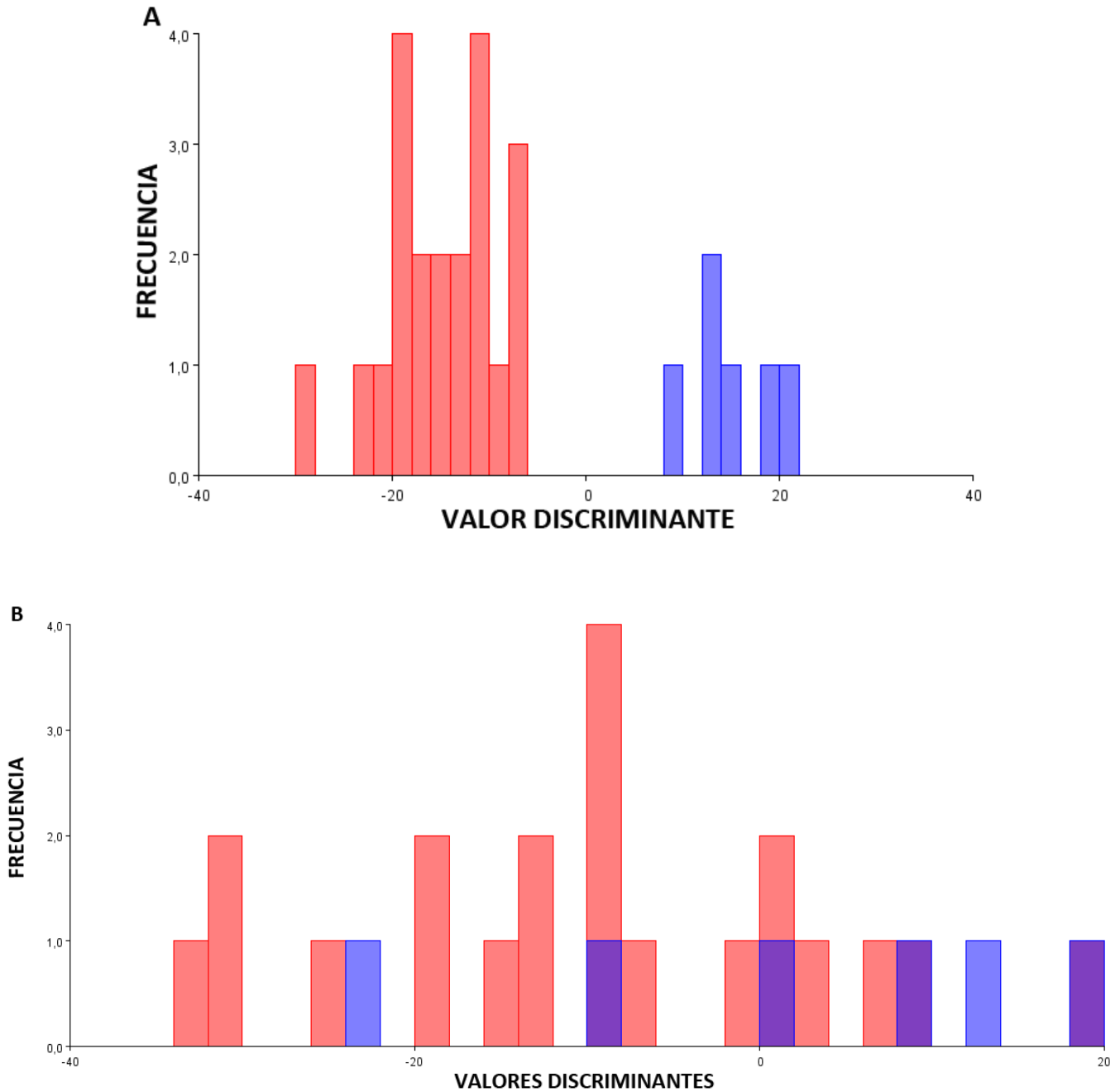


B



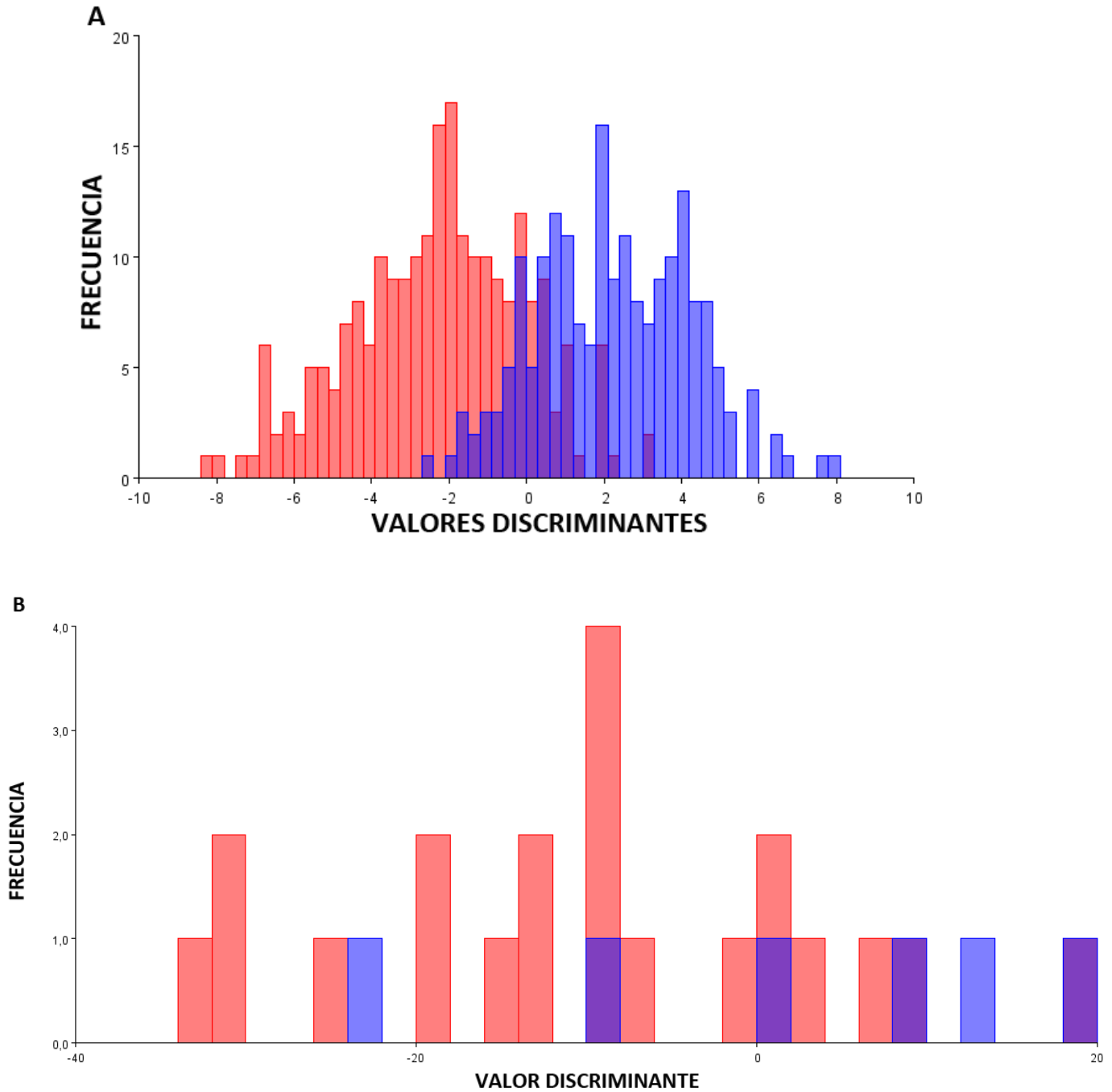
**FIGURA 3.6.5** Resultados del Análisis de Variables Canónicas comparando los subgéneros del género *Diplodon*. Las elipses muestran agrupamientos con probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) Con el total de 40 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó cada grilla de deformación; B) analizando los primeros 6 Componentes Principales. En el eje X se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=2,5. En el eje Y se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=1,5.

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*



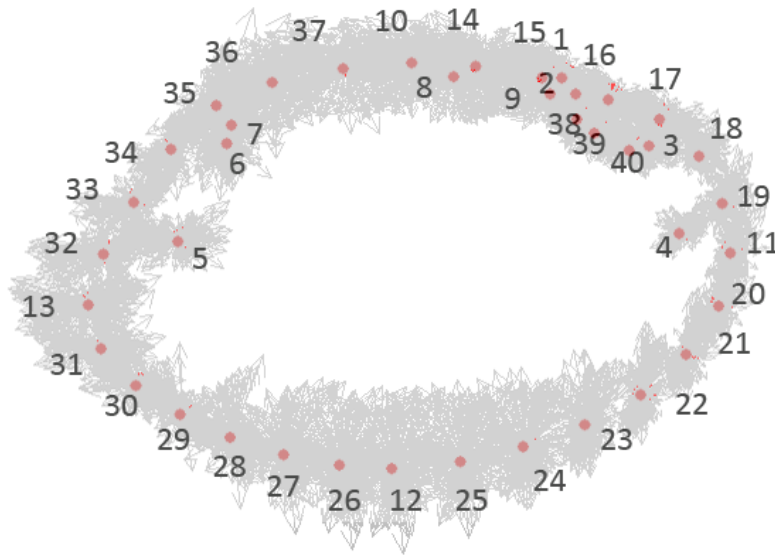
**FIGURA 3.6.6** Resultados del análisis discriminante entre los grupos *D. (Diplodon)* (barras rosas) y *D. (Rhipidodonta)* (barras violetas) realizado con el material tipo del género *Diplodon*. A) distribución de frecuencias de los valores discriminantes; B) Frecuencia de los valores discriminantes en la validación cruzada.

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

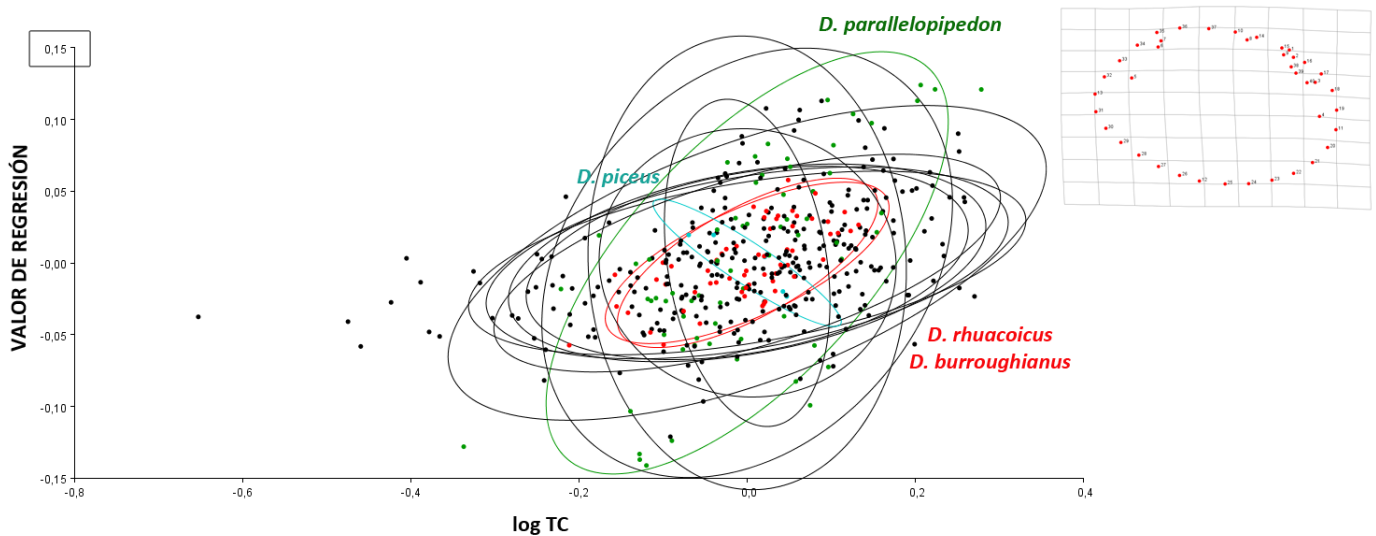


**FIGURA 3.6.7** Resultados del análisis discriminante entre los grupos *D. (Diplodon)* (barras rosas) y *D. (Rhipidodonta)* (barras violetas) realizado con el material del género *Diplodon* de Argentina. A) distribución de frecuencias de los valores discriminantes; B) Frecuencia de los valores discriminantes en la validación cruzada.

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

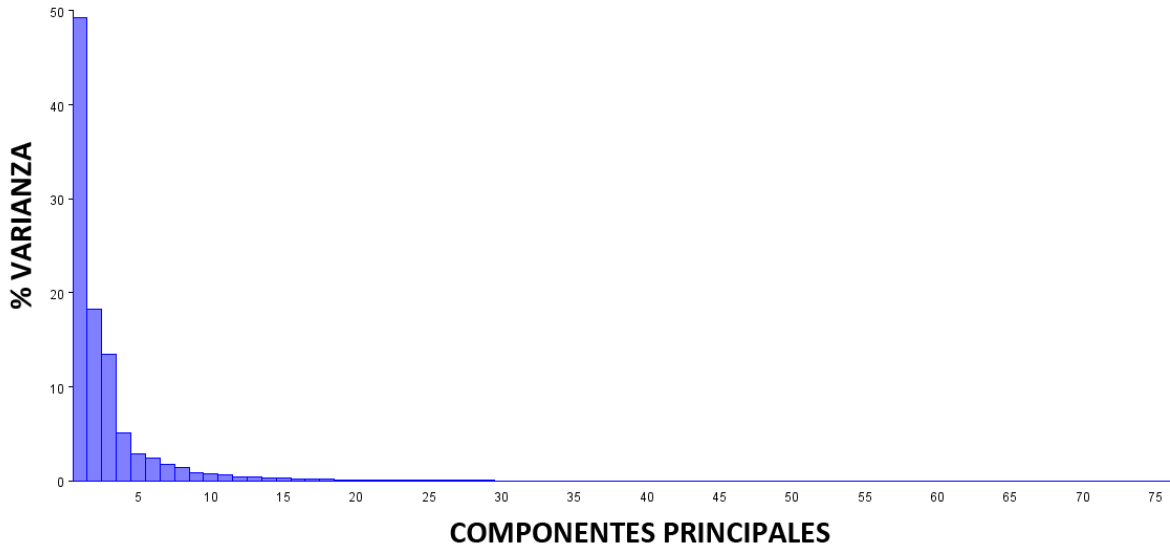


**FIGURA 3.6.8** Configuración consenso para los ejemplares del género *Diplodon* de Argentina. Las flechas representan la desviación de los landmarks en los ejemplares estudiados.

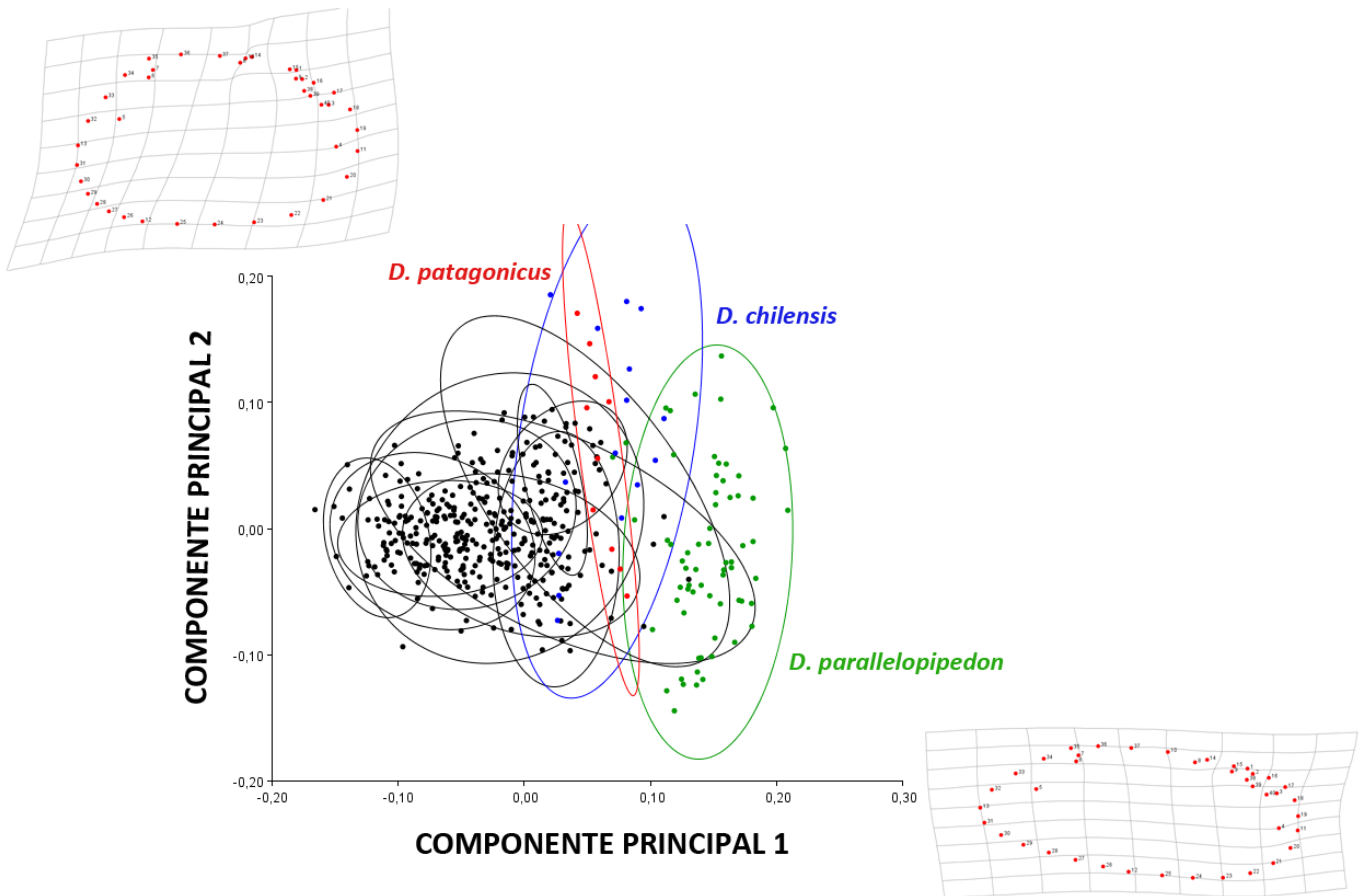


**FIGURA 3.6.9** Análisis de regresión de la variación morfométrica en función del tamaño del centroide transformado a su logaritmo en base 10 para los ejemplares del género *Diplodon* de Argentina, agrupados por especie. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación.

## CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

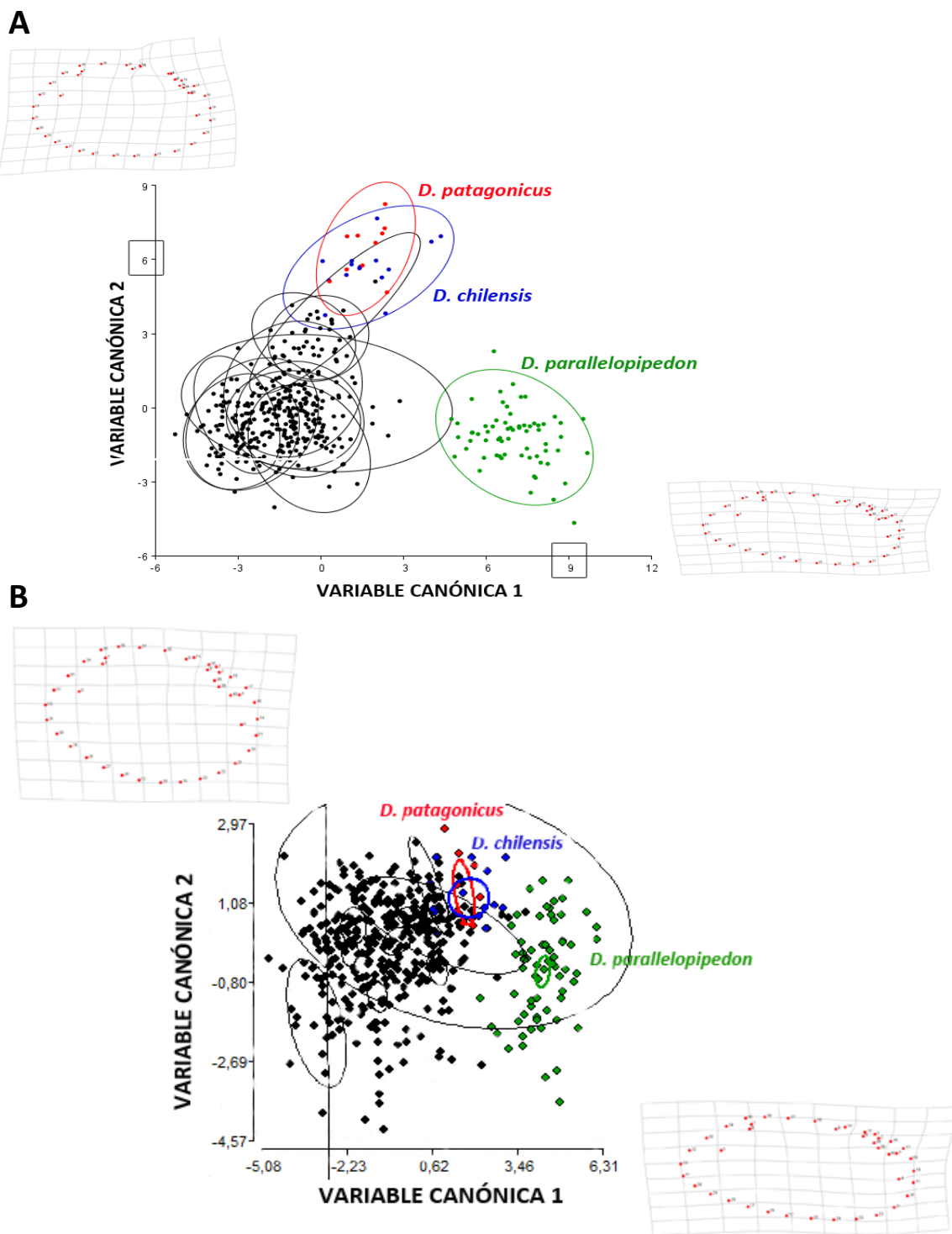


**FIGURA 3.6.10** Porcentajes de varianza aportados por cada Componente Principal en el Análisis de Componentes Principales, para el conjunto de ejemplares del género *Diplodon* de Argentina.



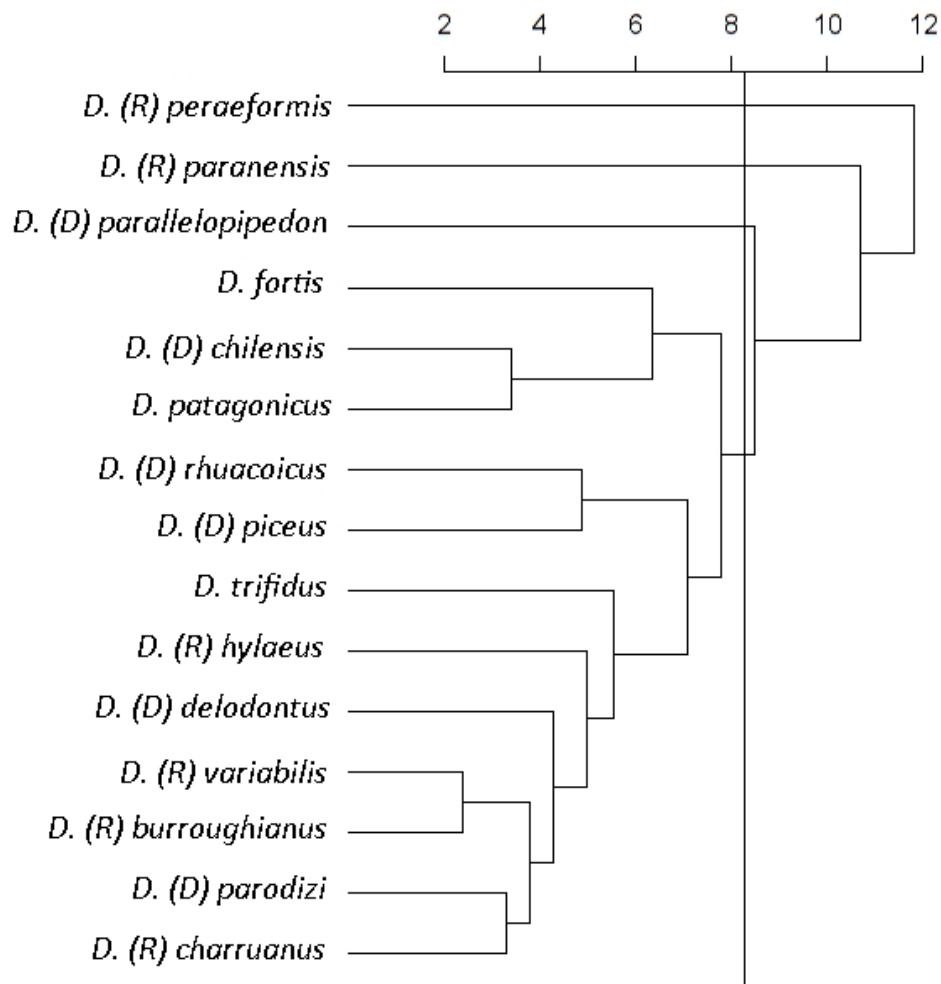
**FIGURA 3.6.11** Resultados del Análisis de Componentes Principales de los ejemplares del género *Diplodon* de Argentina. En cada eje se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=0,15.

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*



**FIGURA 3.6.12** Resultados del Análisis de Variables Canónicas comparando especies del género *Diplodon* de Argentina. Las elipses muestran agrupamientos con probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) Con el total de 76 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó cada grilla de deformación; B) utilizando los primeros 3 Componentes Principales. En el eje X se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=6. En el eje Y se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=2,5.

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*



**FIGURA 3.6.13** Dendrograma del análisis de conglomerados de especies del género *Diplodon* a partir de distancias de Mahalanobis, representadas por la escala. La línea vertical representa el valor de significación para el conjunto estudiado.

# CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

## 3.7. TABLAS

**TABLA 3.7.1** Ejemplares tipo de especies del género *Diplodon* utilizados en el análisis morfométrico. Se indica en qué subgénero ha sido ubicado, institución y número de catálogo de los ejemplares y la localidad como aparece en la etiqueta original.

ANSP= Academy of Natural Sciences of Drexel University; BMNH= Natural History Museum of London; CM= Carnegie Museum of Natural History; FMNH= Field Museum of Natural History; MZL= Musée de Zoologie Lausanne, MNHN= Muséum national d'Histoire naturelle; SMF= Senckenberg Naturmuseum Frankfurt; UMMZ= University of Michigan Museum of Zoology; USNM= Smithsonian National Museum of Natural History; ZMB= Berlin Museum für Naturkunde; ZSM= Zoologische Staatssammlung München.

EJEMPLAR	ESPECIE	SUBGÉNERO	CÓDIGO	MUSEO	LOCALIDAD TIPO	TIPO
1	<i>D. parallelopedon</i> (Lea, 1834)	<i>Diplodon</i>	USNM_85928	USNM	Paraná R., Prov. Corrientes, S. America	Holotipo
2	<i>D. parodizi</i> Bonetto, 1962	<i>Diplodon</i>	ANSP_334552	ANSP	Laguna Vargas at confluence of Arroyo Malabrigo with San Javier River, near Romang (10 km. from Parana Riv.)	Paratipo
3	<i>D. rhuacoicus</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>Diplodon</i>	BMNH_54-12-4-838	BMNH	Maldonado, Banda orientali, Uruguay	Lectotipo
4	<i>D. imitator</i> Ortmann, 1921	<i>Diplodon</i>	CM_61.9248	CM	Rio Vaccacahy-Mirim, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil	Lectotipo
5	<i>D. hylaeus</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>Rhipidodonta</i>	BMNH_54-12-4-843	BMNH	Habit. provincia Chiquitensi (república Boliviana)	Lectotipo
6	<i>D. fontainianus</i> (d'Orbigny, 1835)	Indefinido	BMNH_1854-9-4-49	BMNH	Rio Parahiba, Brazil	Holotipo
7	<i>D. burroughianus</i> (Lea, 1834)	<i>Rhipidodonta</i>	ANSP_41796	ANSP	Rio Paraná	Holotipo
8	<i>D. piceus</i> (Lea, 1860)	<i>Diplodon</i>	USNM_85643	USNM	Uruguay R., S. America	Holotipo
9	<i>D. martensi</i> (Ihering, 1893)	<i>Diplodon</i>	SMF_3929	SMF	Sao Paulo, Bras	Lectotipo
10	<i>D. gratus</i> (Lea, 1860)	Indefinido	USNM_85784	USNM	Uruguay R., S. Amercia	Holotipo
11	<i>D. berthae</i> Ortmann, 1921	<i>Diplodon</i>	CM_61.5865	CM	Rio Jacuhy, Cachoeira, Rio Grande do Sul, Brazil	Lectotipo
12	<i>D. ellipticus</i> (Spix & Wagner, 1827)	<i>Diplodon</i>	ZSM Mol. 20120180	ZSM	São Francisco River	Holotipo
13	<i>D. peraeiformis</i> (Lea, 1860)	<i>Rhipidodonta</i>	USNM_85774	USNM	Uruguay R., S. America	Holotipo
14	<i>D. hildae</i> Ortmann, 1921	<i>Rhipidodonta</i>	CM_61.5864 (ejemplar 1)	CM	Rio Jacuhy, Cachoeira, Rio Grande do Sul, Brazil	Lectotipo
15	<i>D. vicarius</i> Ortmann, 1921	<i>Diplodon</i>	CM_61.9251	CM	creek Aqua Quente, 8 miles W of Iporanga, Sao Paulo, Brazil	Lectotipo
16	<i>D. uruguayensis</i> (Lea, 1860)	Indefinido	USNM_85166	USNM	Uruguay R., S. America	Holotipo
17	<i>D. hildae</i> Ortmann, 1921	<i>Rhipidodonta</i>	CM_61.5864 (ejemplar 2)	CM	Rio Jacuhy, Cachoeira, Rio Grande do Sul, Brazil	Lectotipo
18	<i>D. fluctiger</i> (Lea, 1859)	Indefinido	BMNH_1965169	BMNH	Hab. ? [Asia ?]	Holotipo (Monotipo)
19	<i>D. losadae</i> Haas, 1966	Indefinido	FMNH_114042	FMNH	Cano Losada, alto Guayabero, Orinoco-syst. Departamento de Meta, Colombia	Holotipo
20	<i>D. solisianus</i> (d'Orbigny, 1835)	Indefinido	BMNH_1854-9-4-48	BMNH	Rio de la Plata, near Buenos Aires, Argentina	Holotipo
21	<i>D. multistriatus</i> (Lea, 1831)	<i>Diplodon</i>	USNM_84114	USNM	R. Joanes, near Bahia, Brazil	Possible sintipo
22	<i>D. suavidicus</i> (Lea, 1856)	<i>Diplodon</i>	USNM_85727	USNM	Amazon R., S.A	Holotipo
23	<i>D. aethiops</i> (Lea, 1860)	<i>Diplodon</i>	USNM_85617	USNM	Uruguay R., S. America	Holotipo

## CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

Continuación Tabla 3.7.1.

EJEMPLAR	ESPECIE	SUBGÉNERO	CÓDIGO	MUSEO	LOCALIDAD TIPO	TIPO
24	<i>D. chilensis</i> (Gray, 1828)	<i>Diplodon</i>	BMNH_1986147	BMNH	Chile?	Holotipo
25	<i>D. iheringi</i> Simpson, 1914	<i>Rhipidodonta</i>	SBMF_11312	SMF	Brasil. Rio Grande do Sul. (Rio Guaíba)	Sintipo
26	<i>D. guaranianus</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>Diplodon</i>	BMNH_54-12-4-841	BMNH	Rio Paraná, Prov. Corrientes, Argentina	Lectotipo
27	-	-	-	-	-	-
28	<i>D. charruanus</i> (d'Orbigny, 1835)	<i>Rhipidodonta</i>	BMNH_1854-9-4-15	BMNH	Rio del Rosario, Banda oriental, Uruguay	Lectotipo
29	<i>D. delodontus</i> (Lamarck, 1819)	<i>Diplodon</i>	USNM_150390	USNM	Lake Potero, near Maldonado, Uruguay	Posible sintipo
30	<i>D. imitator</i> Ortmann, 1921	<i>Diplodon</i>	CM_61.9248	CM	Rio Vaccacahy-Mirim, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil	Lectotipo
31	<i>D. hildae</i> Ortmann, 1921	<i>Rhipidodonta</i>	CM_61.5864 (ejemplar 3)	CM	Rio Jacuhy, Cachoeira, Rio Grande do Sul, Brazil	Lectotipo
32	<i>D. dunkerianus</i> (Lea, 1856)	<i>Diplodon</i>	USNM_84155	USNM	Rio Grande, New Grenada	Holotipo
33	<i>D. expansus</i> (Küster, 1856)	<i>Diplodon</i>	MZL-CCh 160	MZL	Cônego River, tributary of Grande River, municipality of Nova Friburgo, state of Rio de Janeiro, Brazil	Sintipo
34	<i>D. wymanii</i> (Lea, 1860)	<i>Diplodon</i>	USNM_84378	USNM	Uruguay River	Holotipo
35	<i>D. flucki</i> Morrison, 1943	Indefinido	USNM_521998	USNM	above Munduapo, Venezuela	Holotipo
36	<i>D. rhombeus</i> (Spix & Wagner, 1827)	<i>Diplodon</i>	SMF_3866	SMF	Rio Solimoes, Amazonas Geb. Brasil	Sintipo
37	<i>D. greeffeanus</i> (Ihering, 1893)	Indefinido	SMF_3876	SMF	Piracicaba, Geb. d Rio Tiete, St. Sao Paulo, Brasil	Lectotipo
38	<i>D. chilensis</i> (Gray, 1828)	<i>Diplodon</i>	BMNH_1986147	BMNH	Chile?	Holotipo
39	<i>D. funebris</i> (Lea, 1860)	<i>Rhipidodonta</i>	USNM_85777	USNM	Uruguay R., S. America	Holotipo
40	<i>D. paulistus</i> (Ihering, 1893)	<i>Diplodon</i>	SMF_3872	SMF	Piracicaba, Geb. d Rio Tiete, St. Sao Paulo, Brasil	Lectotipo
41	<i>D. caipirus</i> (Ihering, 1893)	<i>Diplodon</i>	SMF_3874	SMF	Tanque Paraiso, b. Piracicaba, Geb. d. Rio Tiete, Sao Paulo, Brasil	Lectotipo
42	<i>D. solisianus</i> (d'Orbigny, 1835)	Indefinido	BMNH_1854-9-4-48	BMNH	Rio de la Plata, near Buenos Aires, Argentina	Holotipo
43	<i>D. solidulus</i> (Philippi, 1869)	<i>Australis</i>	UMMZ-22890	UMMZ	Chile	Material no tipo

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

**TABLA 3.7.2** Resultados del análisis de regresión (test de alometría) entre la variación morfométrica y el tamaño del centroide. A) Para el material tipo de las especies del género *Diplodon*; B) para el conjunto de ejemplares del género *Diplodon* de Argentina. SC= Suma de Cuadrados.

A	VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLES DEPENDIENTES		TAMAÑO TOTAL MUESTRA	
	Tamaño del Centroide	Coordenadas de Procrustes 1-80		41	
	SC TOTAL	SC PREDICHO	% PREDICHO	SC RESIDUAL	PROBABILIDAD
	0,4448970	0,00556110	1,25%	0,4393359	0,7771
B	VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLES DEPENDIENTES		TAMAÑO TOTAL MUESTRA	
	Tamaño del Centroide	Coordenadas de Procrustes 1-80		444	
	SC TOTAL	SC PREDICHO	% PREDICHO	SC RESIDUAL	PROBABILIDAD
	2,8799297	0,16307267	5,66%	2,71685703	<0,0001

**TABLA 3.7.3** Varianza de las Variables Canónicas (VC) para el material tipo de las especies del género *Diplodon*. A) Análisis con el total de 40 Componentes Principales; B) análisis con los primeros 6 Componentes Principales.

A	EIGENVALOR	% VARIANZA	% ACUMULADO	B	EIGENVALOR	% VARIANZA	% ACUMULADO
	VC1	12,7840941	84,348		84,348	VC1	0,37
VC2	2,37226248	15,652	100	VC2	0,13	26,58	100

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

**TABLA 3.7.4** Distancias de Mahalanobis entre los subgéneros *Diplodon* (*Diplodon*), *D. (Rhipidodonta)* y el grupo "Indefinido" y su valor de probabilidad ( $p$ ) asociado. En rojo se indican los valores significativos.

	<b>D. (DIPLONDON)</b>	<b>D. (RHIPIDODONTA)</b>
<i>D. (RHIPIDODONTA)</i>	5,3304 <b>p&lt;0,0001</b>	
"INDEFINIDO"	6,4514 <b>p&lt;0,0001</b>	9,7985 <b>p&lt;0,0001</b>

**TABLA 3.7.5** Resultados de la clasificación cruzada en el Análisis de Variables Canónicas entre los subgéneros *Diplodon* (*Diplodon*), *D. (Rhipidodonta)*.

	<b>D. (DIPLONDON)</b>	<b>D. (RHIPIDODONTA)</b>	<b>TOTAL</b>	<b>ERROR(%)</b>
<i>D. (DIPLONDON)</i>	17	4	21	19,05
<i>D. (RHIPIDODONTA)</i>	2	3	5	40
<b>TOTAL</b>	19	7	26	23,08

### CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

**TABLA 3.7.6** Varianza de las variables canónicas (VC) para los ejemplares del género *Diplodon* de Argentina. A) Análisis con el total de 40 Componentes Principales; B) análisis con los primeros 3 Componentes Principales.

A	ANÁLISIS CON 40 COMPONENTES PRINCIPALES			B	ANÁLISIS CON 3 COMPONENTES PRINCIPALES		
	EIGENVALOR	% VARIANZA	% ACUMULADO		EIGENVALOR	% VARIANZA	% ACUMULADO
VC1	10,2855715	50,93	50,93	VC1	4,76	84,38	84,38
VC2	3,42713881	16,97	67,9	VC2	0,57	10,17	94,56
VC3	1,7384549	8,608	76,508	VC3	0,31	5,44	100
VC4	1,10488999	5,471	81,979				
VC5	0,82699879	4,095	86,074				
VC6	0,77565508	3,841	89,915				
VC7	0,50397223	2,495	92,411				
VC8	0,3881049	1,922	94,332				
VC9	0,28427809	1,408	95,74				
VC10	0,23384643	1,158	96,898				
VC11	0,22038427	1,091	97,989				
VC12	0,14803963	0,733	98,722				
VC13	0,13878305	0,687	99,409				
VC14	0,11928977	0,591	100				
VC15	0	0	100				
VC16	0	0	100				
VC17	0	0	100				
VC20	0	0	100				
VC21	0	0	100				
VC22	0	0	100				
VC23	0	0	100				
VC24	0	0	100				
VC25	0	0	100				
VC26	0	0	100				
VC27	0	0	100				
VC28	0	0	100				
VC29	0	0	100				

## CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

**TABLA 3.7.7** Distancias de Mahalanobis y probabilidad asociada (p) del Análisis de Variables Canónicas para los ejemplares del género *Diplodon* de Argentina. Los números en rojo indican un valor de probabilidad menor a 0,05 (significativo).



ESPECIE	<i>D. burroughianus</i>	<i>D. charruanus</i>	<i>D. chilensis</i>	<i>D. delodontus</i>	<i>D. fortis</i>	<i>D. hylaeus</i>	<i>D. parallelopipedon</i>	<i>D. paranensis</i>	<i>D. parodizi</i>	<i>D. patagonicus</i>	<i>D. peraeformis</i>	<i>D. piceus</i>	<i>D. rhuacoicus</i>	<i>D. trifidus</i>
<i>D. charruanus</i>	3,5031 p<0,0001													
<i>D. chilensis</i>	8,1807 p<0,0001	6,5308 p<0,0001												
<i>D. delodontus</i>	4,2833 p<0,0001	3,4472 p<0,0001	7,6738 p<0,0001											
<i>D. fortis</i>	7,4193 p=0,0003	6,0501 p=0,2743	5,9928 p=0,5318	7,2675 p=0,0235										
<i>D. hylaeus</i>	5,0118 p<0,0001	4,6725 p<0,0001	8,6387 p<0,0001	4,9751 p<0,0001	8,3866 p=0,0001									
<i>D. parallelopipedon</i>	9,6873 p<0,0001	8,4615 p<0,0001	9,0888 p<0,0001	8,3507 p<0,0001	9,4154 p<0,0001	8,3821 p<0,0001								
<i>D. paranensis</i>	8,1393 p<0,0001	7,4338 p<0,0001	10,8718 p<0,0001	7,1687 p<0,0001	10,399 p=0,012	9,3795 p<0,0001	12,4481 p<0,0001							
<i>D. parodizi</i>	3,0952 p<0,0001	2,9187 p<0,0001	7,4921 p<0,0001	4,4534 p<0,0001	6,6032 p=0,0009	4,5131 p<0,0001	8,3958 p<0,0001	8,4639 p<0,0001						
<i>D. patagonicus</i>	8,8831 p<0,0001	7,3604 p<0,0001	3,5456 p=0,795	8,4829 p<0,0001	6,6719 p=0,0421	9,3233 p<0,0001	9,8302 p<0,0001	11,5226 p=0,0002	8,3251 p<0,0001					
<i>D. peraeformis</i>	9,7864 p=0,0002	10,4294 p=0,0071	12,4888 p=0,0069	10,3888 p=0,0068	12,017 p=0,103	10,9972 p=0,003	13,8565 p=0,0001	11,6187 p=0,0015	10,5055 p=0,0004	13,1051 p=0,0037				
<i>D. piceus</i>	7,0422 p<0,0001	6,1498 p=0,0013	8,1311 p<0,0001	7,1915 p<0,0001	7,5473 p<0,0001	7,7824 p<0,0001	10,2049 p<0,0001	10,6153 p=0,0045	7,0476 p<0,0001	8,3624 p=0,0001	12,1001 p=0,0507			
<i>D. rhuacoicus</i>	5,9386 p<0,0001	4,6536 p<0,0001	6,6027 p<0,0001	5,5586 p<0,0001	5,8181 p=0,2147	6,6432 p<0,0001	8,8642 p<0,0001	9,4683 p<0,0001	5,6907 p<0,0001	7,0592 p<0,0001	11,2818 p=0,0033	4,451 p=0,2232		
<i>D. trifidus</i>	5,4772 p<0,0001	4,9984 p=0,0262	7,9702 p=0,0001	6,0692 p<0,0001	7,3355 p=0,0321	5,4116 p=0,0012	8,538 p<0,0001	9,7682 p=0,0026	4,5399 p=0,0007	8,2923 p=0,0002	11,1192 p=0,0372	6,8889 p=0,0003	5,9258 p<0,0001	
<i>D. variabilis</i>	2,3609 p=0,0002	3,6499 p<0,0001	8,5644 p<0,0001	4,1988 p<0,0001	7,5205 p=0,0008	4,6969 p<0,0001	9,9735 p<0,0001	7,7476 p<0,0001	3,5808 p<0,0001	9,1377 p<0,0001	9,6353 p=0,0016	7,1592 p<0,0001	5,9992 p<0,0001	5,3733 p=0,0001

## CAPÍTULO 3. MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA DEL GÉNERO *Diplodon*

**TABLA 3.7.8** Resultados de la clasificación cruzada en el Análisis Canónico para las especies del género *Diplodon* de Argentina.



	<i>D. burroughianus</i>	<i>D. charruanus</i>	<i>D. chilensis</i>	<i>D. delodontus</i>	<i>D. fortis</i>	<i>D. hylaeus</i>	<i>D. parallelipipidon</i>	<i>D. paranensis</i>	<i>D. parodizi</i>	<i>D. patagonicus</i>	<i>D. peraeformis</i>	<i>D. piceus</i>	<i>D. rhuacoicus</i>	<i>D. trifidus</i>	<i>D. variabilis</i>	TOTAL	ERROR(%)
<i>D. burroughianus</i>	19	3	0	4	0	0	0	0	2	0	3	1	0	0	3	35	45,71
<i>D. charruanus</i>	3	7	1	5	1	2	0	0	9	1	6	0	8	5	2	50	86
<i>D. chilensis</i>	0	0	8	0	1	0	0	0	2	2	0	1	0	1	0	15	46,67
<i>D. delodontus</i>	3	9	0	32	0	5	0	4	0	0	6	0	0	0	5	64	50
<i>D. fortis</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3	66,67
<i>D. hylaeus</i>	0	2	0	0	2	15	0	0	0	0	0	0	4	1	0	24	37,5
<i>D. parallelipipidon</i>	0	0	5	0	0	0	61	0	0	0	0	0	0	0	0	66	7,58
<i>D. paranensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	1	0	0	0	0	5	20
<i>D. parodizi</i>	7	6	0	0	0	5	1	0	26	0	0	2	0	9	1	57	54,39
<i>D. patagonicus</i>	0	0	5	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	10	90
<i>D. peraeformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	50
<i>D. piceus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	1	0	5	40
<i>D. rhuacoicus</i>	0	0	4	0	2	1	0	0	0	1	0	6	8	1	0	23	65,22
<i>D. trifidus</i>	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	2	0	6	66,67
<i>D. variabilis</i>	26	8	0	8	0	0	0	6	3	0	13	0	0	0	15	79	81,01
<b>TOTAL</b>	<b>59</b>	<b>35</b>	<b>23</b>	<b>49</b>	<b>8</b>	<b>28</b>	<b>64</b>	<b>15</b>	<b>42</b>	<b>5</b>	<b>30</b>	<b>14</b>	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>26</b>	<b>444</b>	<b>54,28</b>

## **CAPÍTULO 4**

# **ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA

### 4.1. RESUMEN

La presencia de una agrupación simpátrica y morfológicamente heterogénea del género *Diplodon* brinda un excelente contexto para combinar estudios morfológicos y moleculares. Hasta la actualidad no se han realizado estudios moleculares dentro del género *Diplodon*. Las pocas secuencias genéticas disponibles de este género se han utilizado para análisis supra-genéricos. Tampoco se han realizado estudios morfológicos exhaustivos que permitan dilucidar la taxonomía del género. Se propuso establecer la variabilidad genética de ejemplares simpátricos de *Diplodon* sp. de una localidad de la provincia de Entre Ríos, Argentina para luego contrastar las agrupaciones de los análisis moleculares con las agrupaciones obtenidas para el mismo conjunto de organismos, en el estudio de la morfometría geométrica. Con esto se buscó determinar, tanto por su morfología como por sus secuencias moleculares, si la muestra de ejemplares del género *Diplodon* estudiada está compuesta por cuatro especies simpátricas diferenciadas, o representa una población formada por tipos morfológicos distintos. Para el estudio molecular se extrajo ADN del tejido muscular del pie de 23 individuos del balneario El Retobado (31°16,816'S; 58°11,48'W), en el arroyo Yuquerí Grande, Entre Ríos. Luego se realizó la amplificación por PCR del fragmento COI. Para el alineamiento se utilizaron las secuencias obtenidas por secuenciación del producto PCR y las secuencias de ejemplares asignados al género *Diplodon* para el fragmento de COI disponibles en *GenBank*. Además, se seleccionaron de la misma base de datos como *outgroup* dos secuencias de ejemplares de *Castalia ambigua*. Por último, se calculó el árbol consenso de *Neighbour Joining* y los valores de Bootstrap asociados a cada rama. Para el análisis morfométrico, los mismos individuos fueron clasificados en cuatro morfotipos y se digitalizaron 40 *landmarks* sobre las valvas izquierdas. Finalmente se realizaron Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminantes y se calcularon las distancias de Mahalanobis entre los grupos. La mayor parte de las muestras de la localidad formaron un grupo bien delimitado con un Bootstrap de 100, y separadas de las demás muestras por una distancia de 0,9 sustituciones por sitio. La única excepción fue el individuo 5. El Análisis Canónico reveló diferencias significativas en todas las comparaciones ( $p < 0,05$ ). Los resultados del análisis de secuencia mitocondrial estarían indicando la presencia de al menos cuatro entidades genéticas distintas del género *Diplodon* y coincidentes, en parte, con los morfotipos identificados *a priori*. Teniendo en cuenta los resultados de ambos abordajes, se justifica la separación en al menos tres especies, siendo la especie 1 (*D. parallelopipedon*) la más lejana tanto morfológicamente como en lo molecular. Las especies *D. wymanii* y *D. rhuacoicus* no resultaron tan robustamente diferenciadas como las demás, con lo cual puede tratarse de subespecies de la misma especie o de especies estrechamente cercanas. El resultado de los análisis de este Trabajo de Tesis Doctoral remarca la importancia de la combinación de estudios morfológicos con datos moleculares. La combinación de estas técnicas es particularmente importante para el caso de la taxonomía de los unionoideos, ya que estos no presentan características morfológicas cualitativas destacadas que permitan diferenciar especies.

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA

### 4.2. INTRODUCCIÓN

La presencia de una agrupación simpátrica y morfológicamente heterogénea del género *Diplodon* brinda un excelente contexto para combinar estudios morfológicos y moleculares. Balla & Walker (1991); Playford & Walker (2008) y Roper & Hickey (1994), aplicaron técnicas moleculares y morfométricas combinadas en Hyriidae australianos. Sin embargo, ninguno de éstos aborda el estudio morfométrico mediante la técnica de *landmarks*, sino que se basan en la toma de medidas clásicas de la conchilla (*e.g.* altura, largo, espesor).

En unionoideos, los análisis moleculares han demostrado ampliamente su utilidad como herramienta para estudios supraespecíficos (Bogan & Hoeh, 2000; Chong et al., 2008), para la distinción de especies cercanas (Baker et al., 2003; 2004; Froufe et al., 2016; Konopleva et al., 2016; Reis et al., 2013), y para análisis poblacionales y filogeográficos (Burdick & White, 2007; Froufe et al., 2014; Krebs et al., 2015; Mock et al., 2010). También se utilizaron para estudiar la evolución de caracteres reproductivos en bivalvos de agua dulce (Graf & Foighil, 2000; Walker et al., 2006). Incluso se han realizado análisis comparando distintos genes (Buhay et al., 2002; Campbell et al., 2005; Huff et al., 2004; King et al., 1999; Pfeiffer & Graf, 2015; Scott et al., 2014; Serb, 2006; Whelan et al., 2011; Zanatta & Murphy, 2007). Sin embargo, en Hyriidae los estudios moleculares para la diferenciación de especies son escasos (Fuentealba et al., 2010; Graf et al., 2015; Graf & Foighil, 2000; Hughes et al., 2004; Marshall et al., 2014; Santos-Neto et al., 2016, 2018).

Hasta la actualidad no se han realizado estudios moleculares dentro del género *Diplodon* con el fin de separar especies. Las pocas secuencias genéticas disponibles de este género se han utilizado para análisis supra-genéricos (Bogan & Hoeh, 2000; Graf, 2002; Graf & Cummings, 2006; Graf et al., 2015; Santos-Neto et al., 2016). Tampoco se han realizado estudios morfológicos exhaustivos que permitan dilucidar la taxonomía del género.

Se propuso establecer la variabilidad genética de ejemplares simpátricos de *Diplodon* sp del balneario El Retobado, Entre Ríos, Argentina para luego contrastar las agrupaciones de los análisis moleculares con las agrupaciones obtenidas para el mismo conjunto de organismos, en el estudio de la morfometría geométrica. Con esto se buscó determinar si la muestra de ejemplares del género *Diplodon* estudiada está compuesta por cuatro especies simpátricas, diferenciadas tanto por su morfología como por sus secuencias moleculares, o representa una población formada por tipos morfológicos distintos.

**MATERIAL ESTUDIADO**

Se utilizaron 23 ejemplares provenientes del balneario El Retobado, a orillas del arroyo Yuquerí Grande, provincia de Entre Ríos (31°16,816'S; 58°11,48'O) (**tabla 4.7.1**). La recolección de los ejemplares se realizó de orilla a orilla en febrero de 2017, sondeando el sedimento manualmente en un área de 27m<sup>2</sup> (**sección 2.1**). El tejido diseccionado fue conservado en etanol absoluto en *freezer* hasta su utilización en estudios moleculares.

**ANÁLISIS DE SECUENCIAS MOLECULARES**

Se realizó la extracción de tejido del pie de los ejemplares. Las muestras de tejidos se conservaron en alcohol puro y frío. Los *vouchers* fueron depositados en la Colección Malacológica del MLP (**tabla 4.7.2**). Los mismos incluyeron tejido blando (MLP-MA Húmedo), conchillas (MLP-MA Seco) y tejido aductor para análisis moleculares (MLP-ZI-RG). La amplificación de los fragmentos de interés fue realizada mediante la técnica de PCR (**sección 2.2**). Los *primers* utilizados y sus características se describen en la **tabla 2.5.2**.

Para el alineamiento se utilizaron las secuencias obtenidas por secuenciación del producto PCR y las secuencias de ejemplares asignados al género *Diplodon* para el fragmento de COI disponibles en *GenBank*. Además, se seleccionaron de la misma base de datos como *outgroup* dos secuencias de *Castalia ambigua*. Se calcularon los árboles consenso de Neighbour Joining y Maximum Likelihood, y se calcularon los valores de *Bootstrap* asociados a cada rama (**sección 2.2**).

**ANÁLISIS DE LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA**

Se digitalizaron imágenes en dos dimensiones de las valvas izquierdas de los 23 individuos ya mencionados (**tabla 4.7.1**). Previamente al análisis los individuos fueron clasificados en cuatro morfotipos por similitud en su aspecto externo (**figura 4.6.1**). Para una identificación aproximada de los cuatro morfotipos reconocidos se observaron las características internas de la valva izquierda. Se compararon las muestras con ejemplares depositados en la colección del MLP y con las descripciones publicadas por Castellanos (1960). Los aspectos más sobresalientes de los morfotipos descritos por Castellanos (1960) y observados en el material fueron los siguientes:

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

El morfotipo 1 fue similar a *Diplodon parallelopipedon* (Lea, 1834). Valvas alargadas, sólidas e infladas. Umbo robusto, pero bajo y desplazado anteriormente. Borde dorsal recto, formando con el borde posterior un ángulo mayor a 90°. Posteriormente se observó una punta cerca de la base. Borde ventral recto o ligeramente curvo, levantándose hacia atrás. En la charnela se observaron dos dientes laterales similares y aserrados, y dos subcardinales, el anterior alto y aserrado y el posterior triangular y subdividido en dentículos. De largo variable, la especie puede superar los 150mm (los ejemplares colectados midieron aproximadamente 80mm)

Los ejemplares del morfotipo 2 se asemejaron a *Diplodon wymanii* (= *D. delodontus wymanii*) (Lea, 1860). Valvas sólidas y convexas. Umbo robusto y alto, con 10 costillas radiales, las centrales convergiendo. Borde dorsal y ventral casi paralelos. Borde posterior sobresale formando una pequeña muesca. Borde ventral ligeramente cóncavo. Individuos de largo variable, alcanzando los 80mm.

El morfotipo 3 coincidió con la descripción de *Diplodon rhuacoicus* (d'Orbigny, 1835). Valvas comprimidas y bajas, borde ventral recto y dorsal ligeramente inclinado en su parte más anterior. Umbo bajo y anterior. Borde anterior corto y curvo. Presentaron una curvatura en la mitad del borde posterior. Charnela formada por dos dientes laterales, siendo el inferior más largo y grueso, y un subcardinal recto. El largo fue de 70mm aproximadamente.

El morfotipo 4 fue comparable con *Diplodon burroughianus* (Lea, 1834). Valvas altas, sólidas y convexas, umbo abultado y ligeramente anterior. Borde dorsal arqueado y borde anterior ligeramente trunco. Las valvas presentaron una punta posterior en la mitad de su altura. Borde ventral cóncavo. Con dos dientes laterales iguales y dos subcardinales, el anterior recto y el posterior ligeramente curvado. Las valvas colectadas midieron entre 60mm y 70mm de largo.

Fueron seleccionados 13 *landmarks* y 27 *semilandmarks* (sección 2.3). Se calculó la forma consenso entre las muestras y se realizaron Análisis de Componentes Principales y Análisis de Variables Canónicas. Por último, se calcularon las distancias de Mahalanobis entre los grupos y su probabilidad en relación al número de permutaciones (sección 2.3).

**ANÁLISIS MOLECULARES**

Los resultados de la PCR realizada se muestran en la **figura 4.6.2**. Las muestras contenían una concentración alta de ADN y mostraron niveles de pureza aceptables (**tabla 4.7.1**). Los individuos 6, 10 y 14 fueron excluidos del estudio, debido a que no pudieron obtenerse amplicones a partir del tejido. Las secuencias más largas fueron las de los individuos 13 y 19 (700 pares de bases-pb), mientras que la más corta fue la del ejemplar 17 (449pb) (**tabla 4.7.3**).

Luego del alineamiento de bases (**tabla A5**), las posiciones que contuvieron gaps y datos faltantes fueron eliminadas, resultando un total de 345 posiciones comparadas en el set de datos final, compuesto por 27 secuencias. En estas posiciones y para el total de muestras no se encontró ninguna región conservada, es decir, no se obtuvo ningún segmento de la secuencia de longitud mayor a 3pb que haya mostrado la misma base en el 100% del set de muestras. Al analizar solamente las 20 secuencias obtenidas en esta tesis, se obtuvieron un total de 27 regiones conservadas. Una sola de ellas con una longitud mayor a 10pb (11pb), en las posiciones 516 a 526 de la secuencia completa. De las restantes, fueron halladas 12 regiones mayores a 5pb.

El árbol filogenético de Neighbour Joining resultante del alineamiento de las secuencias obtenidas se muestra en la **figura 4.6.3**. La mayor parte de las secuencias de los ejemplares de *Diplodon* sp. del arroyo Yuquerí Grande formaron un grupo bien delimitado con un *Bootstrap* de 100, y separadas de las demás muestras por una distancia de 0,9 sustituciones por sitio. La única excepción fue el individuo 5 (asignado al morfotipo 2) que, si bien apareció más relacionado con las muestras del *GenBank*, su distancia fue de 0,8 sustituciones por sitio y el valor de *Bootstrap* fue bajo. Cabe mencionar que las secuencias de ejemplares asignados al género *Diplodon*, extraídas de la base de datos molecular, se mostraron más cercanas al *outgroup* que al grupo de *Diplodon* sp. del arroyo Yuquerí Grande, con un valor de 99 y una distancia menor a 0,1 sustituciones por sitio.

Las muestras 3, 20, 21, 22 y 23, originalmente asignadas al morfotipo 1, formaron una agrupación estable, siendo el valor de *Bootstrap* de la rama de 88 y la distancia entre los ejemplares igual a 0,1 sustituciones por sitio (individuo 3) o menor a 0,1 sustituciones por sitio (los demás). Este grupo se relacionó más con el individuo 17 (asignado preliminarmente al morfotipo 4) con un valor de 42 y una distancia de 0,5 sustituciones por sitio. Los individuos 1, 2 y 8 -pertenecientes al morfotipo 2- se agruparon con un valor de *Bootstrap* de 72 y distancias menores a 0,05 sustituciones por sitio. Los ejemplares 4, 9, 11, 12 y 18 (asignados originalmente al morfotipo 3) se agruparon de forma robusta con un valor de 96 y distancias también bajas (menores a 0,05 sustituciones por sitio). Las muestras 13, 15 16 y 19, asignadas de manera

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

preliminar al morfotipo 4, se agruparon con un valor de 95 y distancias cercanas a 0,01 sustituciones por sitio. En este último grupo también quedó incluido el ejemplar 7, previamente asignado al morfotipo 2.

Los resultados del análisis de Maximum Likelihood apoyaron las agrupaciones obtenidas por el método de Neighbour Joining (**figura 4.6.4**). Las secuencias de los ejemplares de *Mytilus edulis* se relacionaron más con la secuencia de *D. demeraraensis*. Los individuos 5 y 17 se ubicaron en la base de la rama de los individuos de *Diplodon* del arroyo Yuquerí Grande. La rama conformada por los morfotipos 2, 3 y 4 mostró un valor de Bootstrap mayor que con el método anterior.

### **ANÁLISIS DE LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA**

La forma consenso (**figura 4.6.5**), presentó una forma ovalada, con el borde dorsal paralelo al borde ventral y con el extremo posterior en punta.

Los resultados del análisis de regresión *a priori* (**figura 4.6.6** y **tabla 4.7.4**) sustentaron la ausencia de alometría ( $p=0,08$ ), ya que las coordenadas de Procrustes no crecieron de forma lineal en función del aumento del tamaño del centroide. La alometría incluyó el 10,67% de la variación morfométrica para el conjunto estudiado.

La **figura 4.6.7** y la **tabla A6** indican que los seis primeros componentes principales aportaron el 95,15% de la variabilidad total. El Análisis de Componentes Principales realizado con el total de 19 Componentes Principales (**figura 4.6.8**) no justificó la agrupación en morfotipos. Las configuraciones cercanas al extremo del eje del Componente Principal 1 (*e.g.* individuos 21 y 23) mostraron formas más deprimidas y con una punta posterior más marcada que aquellas desplazadas hacia el extremo del Componente 2 (*e.g.* individuo 20).

A continuación, se describen los resultados del Análisis de Variables Canónicas. Las Variables Canónicas 1 y 2 fueron las que aportaron el 95,57% de la variación acumulada en el análisis con el total de 19 Componentes Principales (**tabla 4.7.5A**) y el 99,91% en el realizado con 5 Componentes Principales (**tabla 4.7.5B**).

El Análisis de Variables Canónicas el total de 19 Componentes Principales reveló diferencias significativas en todas las comparaciones ( $p<0,05$ ) (**figura 4.6.9A**, **tabla 4.7.6**). Los morfotipos más cercanos entre sí fueron el 2 y el 3, con una distancia de 6,26 unidades de Mahalanobis. El morfotipo 4 les siguió en cercanía, obteniendo una distancia de 7,72 unidades con el morfotipo 2 y de 7,64 unidades con el 3. El morfotipo 1 fue el más alejado, con distancias de 6,65 unidades con el morfotipo 3; 9,11 unidades con el morfotipo 2 y 13,1 unidades con el morfotipo 4.

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

El Análisis Canónico con 5 Componentes Principales (**figura 4.6.9B**) también corroboró las agrupaciones entre morfotipos con valores significativos para todas las combinaciones ( $p < 0,05$ ) y un factor de error de clasificación de 0%. Sin embargo, se observó una inversión en la disposición de *D. rhuacoicus* y *D. wymanii* con respecto a la Variable Canónica 2.

El análisis de conglomerados (**figura 4.6.10**) no distinguió de manera significativa a los individuos de *D. rhuacoicus* y *D. wymanii*, los cuales resultaron agrupados. *D. burroughianus* se asoció a esta agrupación, pero con diferencias significativas. El morfotipo más diferenciado fue *D. parallelopipedon*.

Los resultados del análisis de la secuencia mitocondrial COI indicaron la presencia de cuatro entidades genéticas distintas entre los ejemplares del género *Diplodon* en la localidad del arroyo Yuquerí Grande y coincidentes, en parte, con los morfotipos identificados *a priori*. La escasez de regiones conservadas entre las secuencias indicaría que el fragmento estudiado de la Citocromo Oxidasa I es altamente variable dentro del grupo considerado en este trabajo de tesis.

Los datos morfológicos obtenidos del análisis de la morfometría geométrica apoyaron la clasificación propuesta para los morfotipos 1 (*Diplodon parallelopipedon*), 2 (*D. wymanii*), 3 (*D. rhuacoicus*) y 4 (*D. burroughianus*). El análisis molecular también los separó de manera robusta, relacionando al morfotipo 3 con el 2 y, en última instancia, con el 4. Teniendo en cuenta los resultados de ambos abordajes, se justifica la separación en al menos tres especies, siendo la especie 1 (*D. parallelopipedon*) la más lejana tanto morfológicamente como en lo molecular. Las especies *D. wymanii* y *D. rhuacoicus* no resultaron tan robustamente diferenciadas como las demás, con lo cual puede tratarse de subespecies de la misma especie o de especies estrechamente cercanas.

Se observó una separación entre secuencias de los ejemplares publicados de *GenBank* y las obtenidas en este Trabajo de Tesis Doctoral. Distintas acciones impidieron comprobar que la identificación de las muestras de GenBank fuera correcta. Al revisar los datos del GenBank asociados a cada secuencia, se pudo observar que la información relativa a la procedencia exacta de los ejemplares, al sexo de los individuos y al tejido utilizado para la extracción, estuvo ausente o incompleta. En cuanto a los *primers* utilizados para la PCR, tanto en el GenBank como en los artículos publicados (tabla 2.5.1) la información faltó o fue confusa, muchas veces nombrando varios *primers* equivalentes, pero sin aclarar cuáles se aplicaron en cada muestra. En las secuencias de *Diplodon demeraraensis* y en la secuencia JN243889.1 de *Castalia ambigua*, el dato de procedencia fue inexacto. Además, Graf & Cummings (2006) no publicaron la procedencia del *voucher* de *Diplodon chilensis*, la especie más cercana a las muestras de este estudio.

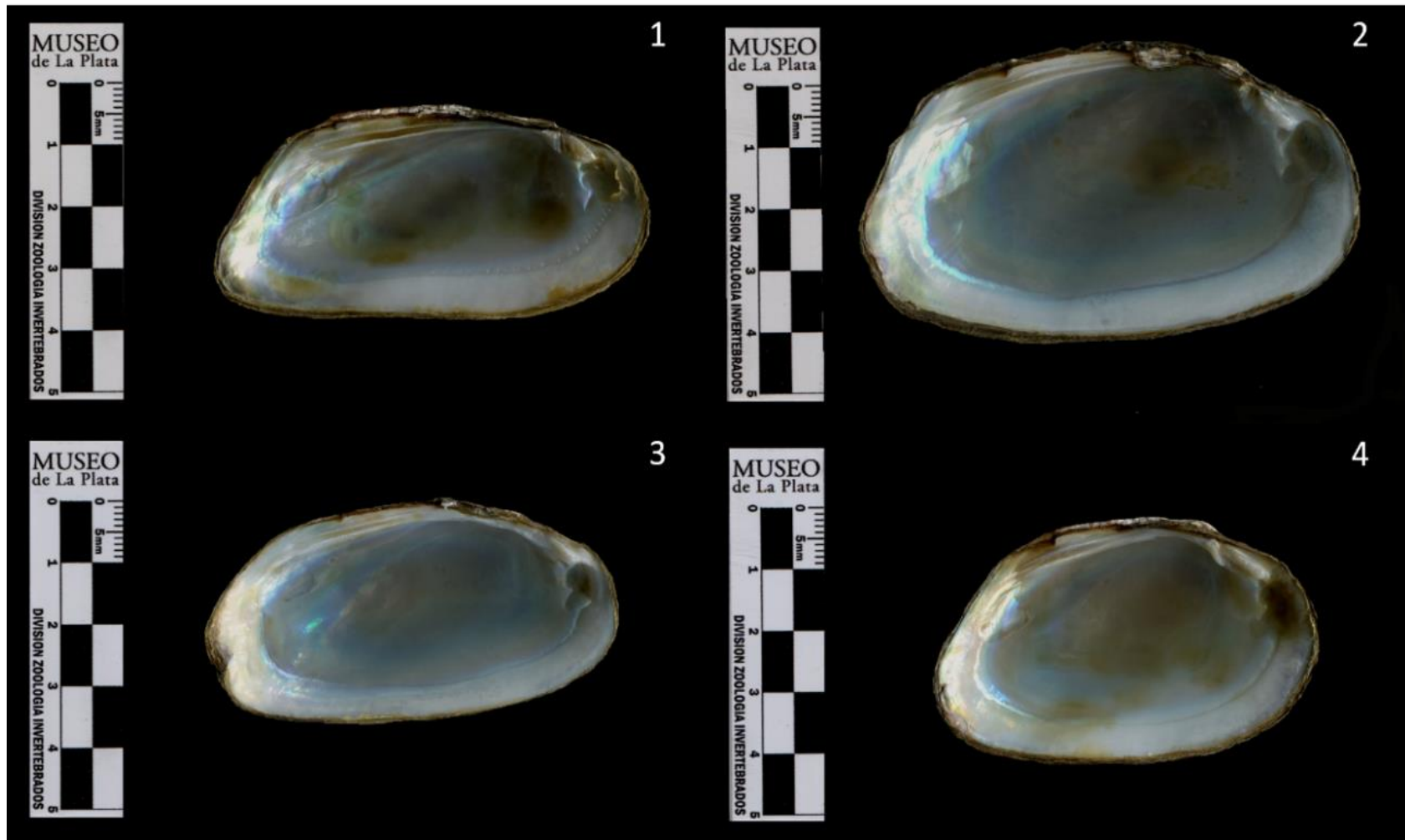
En este trabajo se tomó la precaución de extraer ADN del tejido somático, más específicamente del extremo del pie, con el fin de evitar la extracción de tejido germinal y así evitar incluir genes mitocondriales de la línea paterna. Santos-Neto et al. (2016) descartaron la presencia de estos genes previamente al análisis, con lo cual la secuencia de *Diplodon suavidicus* utilizada en este trabajo de tesis es la más confiable en este sentido. Debido a todo lo explicado precedentemente, es improbable que los genomas mitocondriales paternos se hayan mezclado en el análisis, con lo cual las agrupaciones y diferencias entre las ramas no estarían relacionadas con el fenómeno de DUI (sección 2.2).

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

Con respecto a los individuos 5 y 17, cabe esperar que su posición problemática en el árbol y la gran distancia de sus secuencias con respecto a las demás se deban a la menor cantidad de pares de bases obtenidas en la secuenciación. En el análisis morfométrico ninguno de estos individuos generó un conflicto en los agrupamientos, con lo cual es probable que haya ocurrido algún artefacto durante el procesamiento de las muestras para el análisis molecular o que el ADN estuviera degradado. Esto coincidió con la presencia de una banda menos definida en la electroforesis de estos ejemplares con respecto a las bandas obtenidas para los demás organismos. En relación al individuo 7, no presentó conflicto en el estudio morfométrico, ya que resultó agrupado con el morfotipo 2, al cual había sido asignado *a priori*. No obstante, se mostró genéticamente más cercano a los miembros del morfotipo 4, con lo cual se concluyó lo mismo que para los ejemplares 5 y 17, es decir, un error en el proceso de obtención de la secuencia.

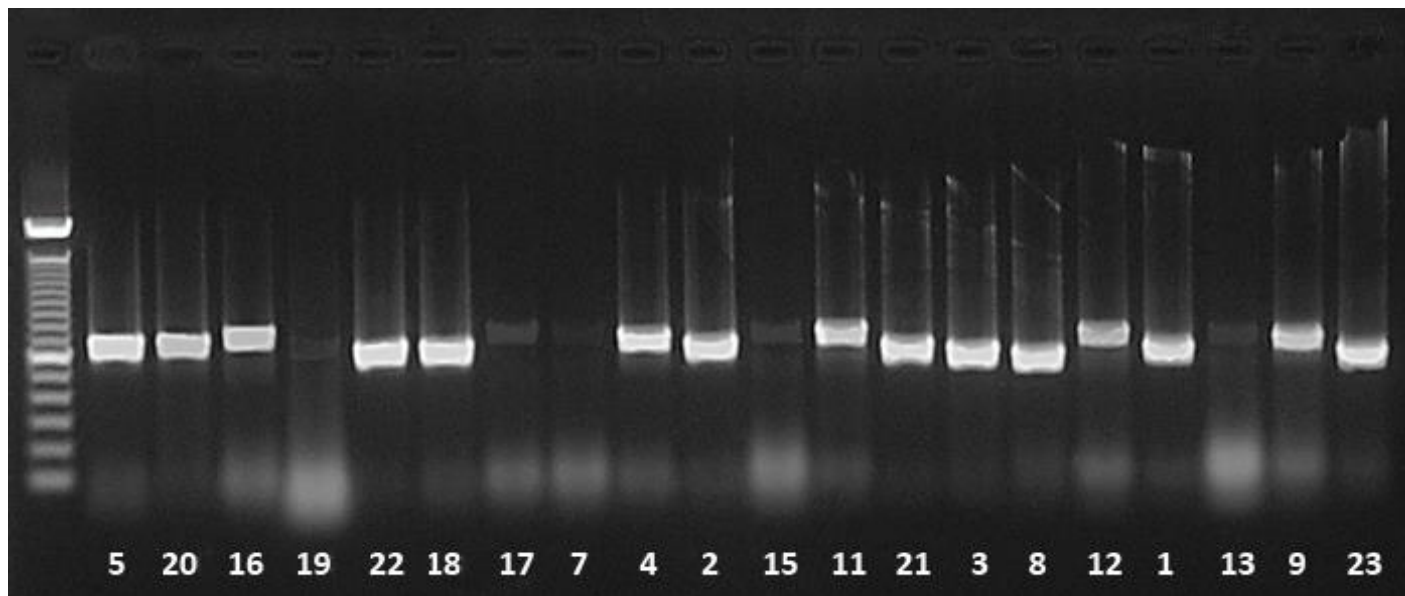
Bonetto & Di Persia (1975) reconocieron la presencia de *Diplodon rhuacoicus* y *D. parallelopipedon* en el arroyo Ayuí Grande que, si bien se encuentra más al norte en la provincia de Entre Ríos que el arroyo Yuquerí Grande, la distancia entre ellos es de aproximadamente 11,1 kilómetros y ambos son sistemas similares que corren casi paralelos y que desembocan en el Río Uruguay. Estos autores indicaron también que *D. rhuacoicus* es típico de sistemas lóticos como los arroyos antes mencionados. Mientras que *D. parallelopipedon* sería más común en sistemas lénticos, encontrándose sólo en arroyos luego de un efecto de arrastre provocado por crecidas.

El resultado de los análisis de este trabajo de tesis remarca la importancia de la combinación de estudios morfológicos precisos y comparables con datos moleculares. Esto sería particularmente importante en el caso de los unionoideos, ya que estos no presentan características morfológicas cualitativas destacadas que permitan diferenciar especies.



**FIGURA 4.6.1** Vista interna de la valva izquierda de los morfotipos identificados en el conjunto de ejemplares del género *Diplodon* analizado. 1) *D. aff parallelopipedon*; 2) *D. aff wymanii*; 3) *D. aff rhuacoicus*; 4) *D. aff burroughianus*.

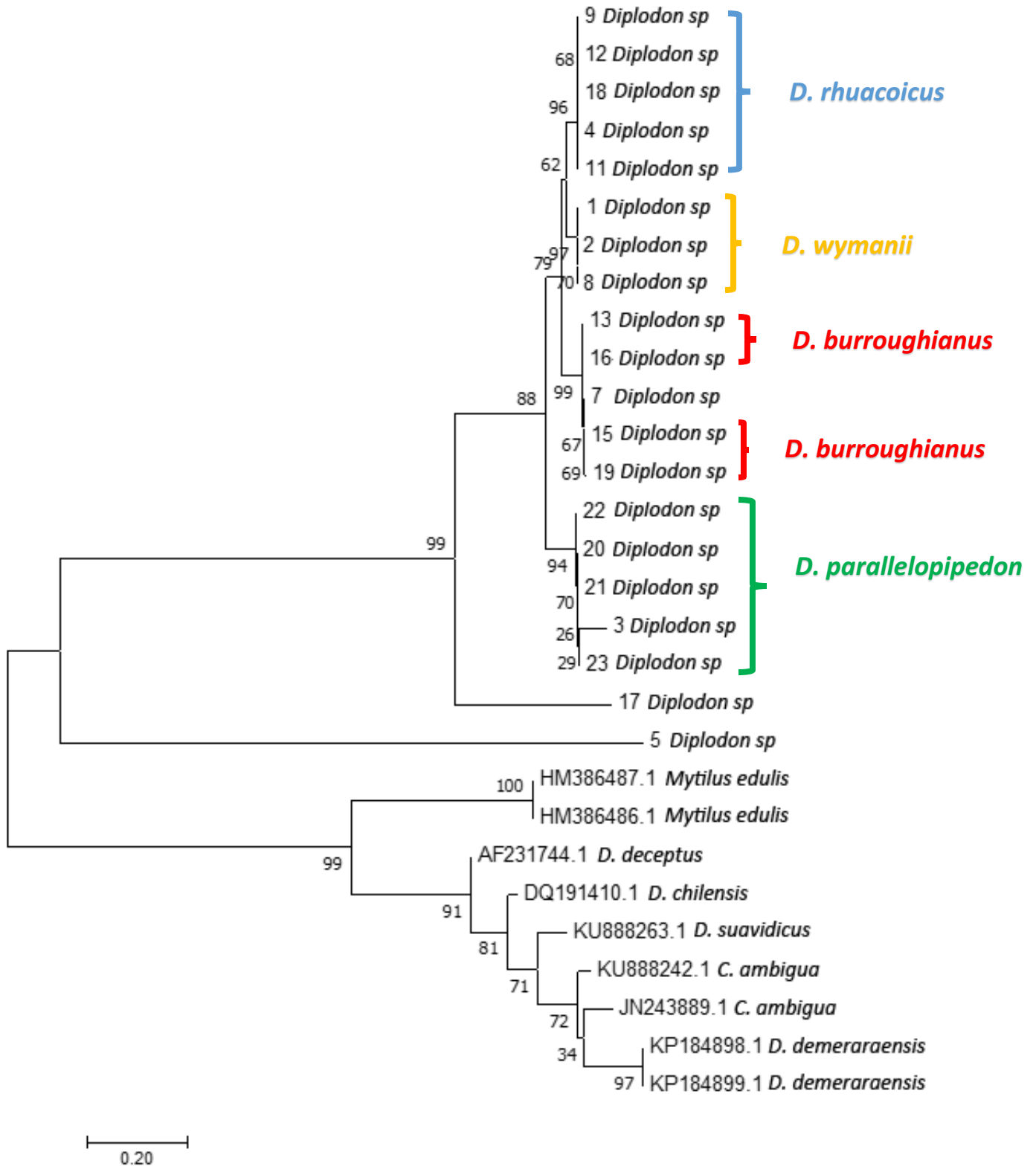
**CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**



**FIGURA 4.6.2** Electroforesis de la PCR para el fragmento COI de los ejemplares de *Diplodon* sp analizados. El número corresponde a cada individuo. Calle 1: *ladder* 1Kb.

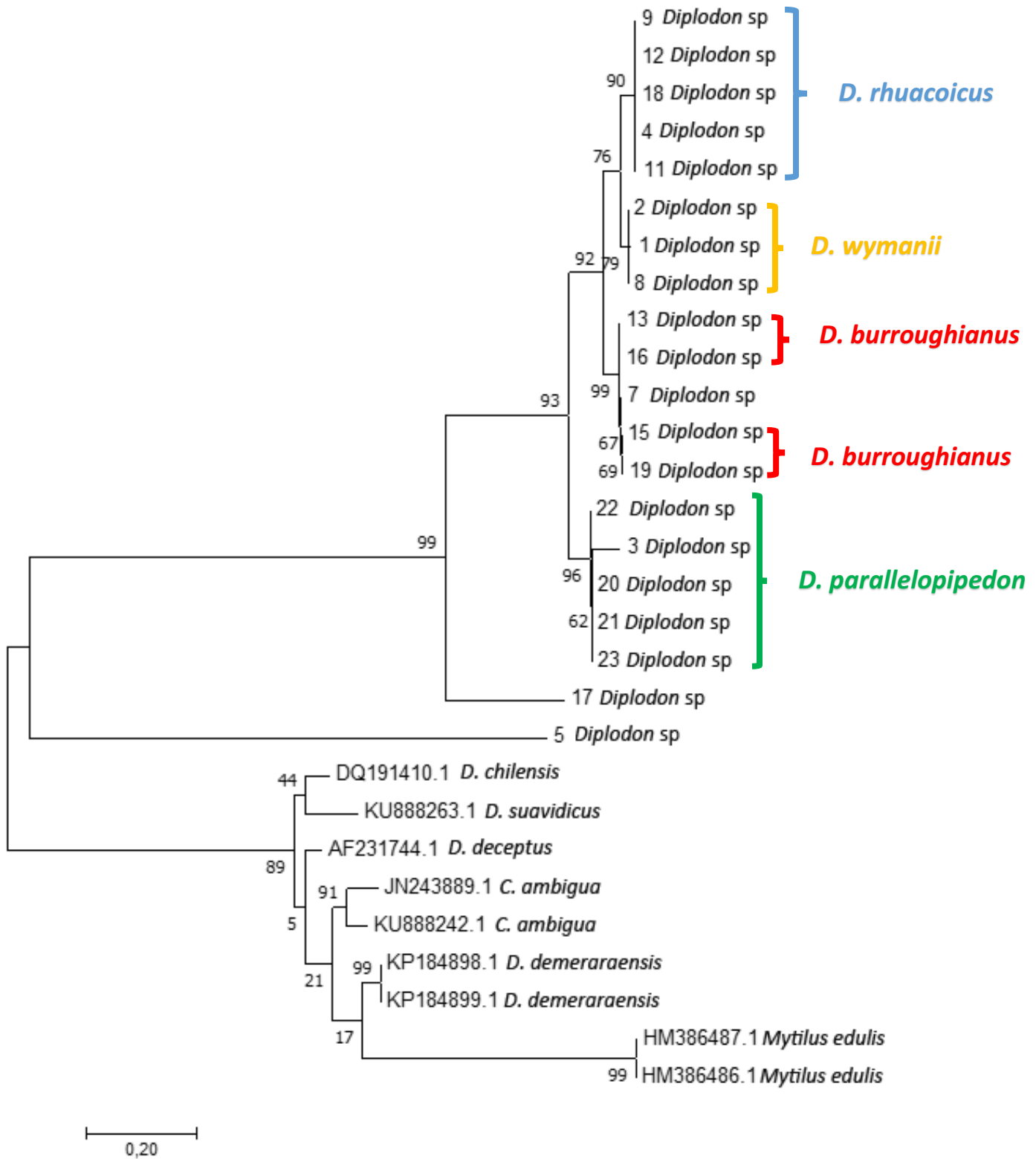


**CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**



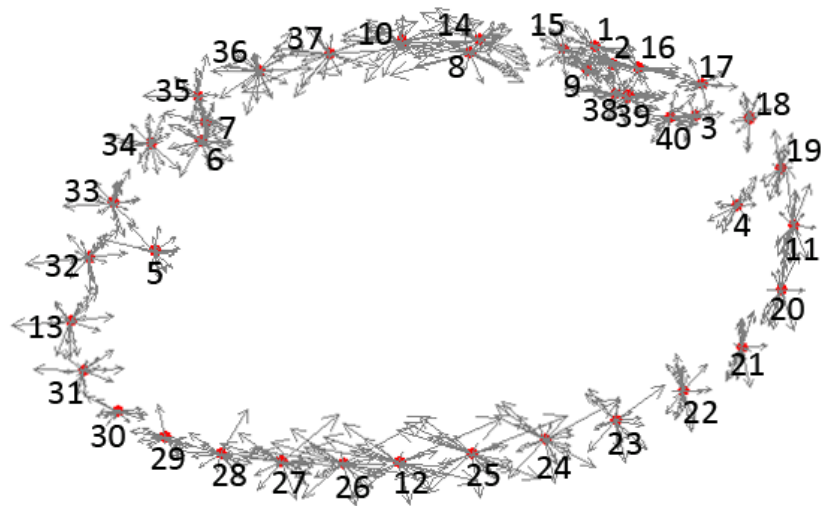
**FIGURA 4.6.3** Árbol consenso óptimo obtenido mediante el método de Neighbour Joining entre los ejemplares del género *Diplodon* estudiados. La escala representa el número de sustituciones por sitio. Los valores del test de *Bootstrap* se brindan junto a cada rama.

**CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

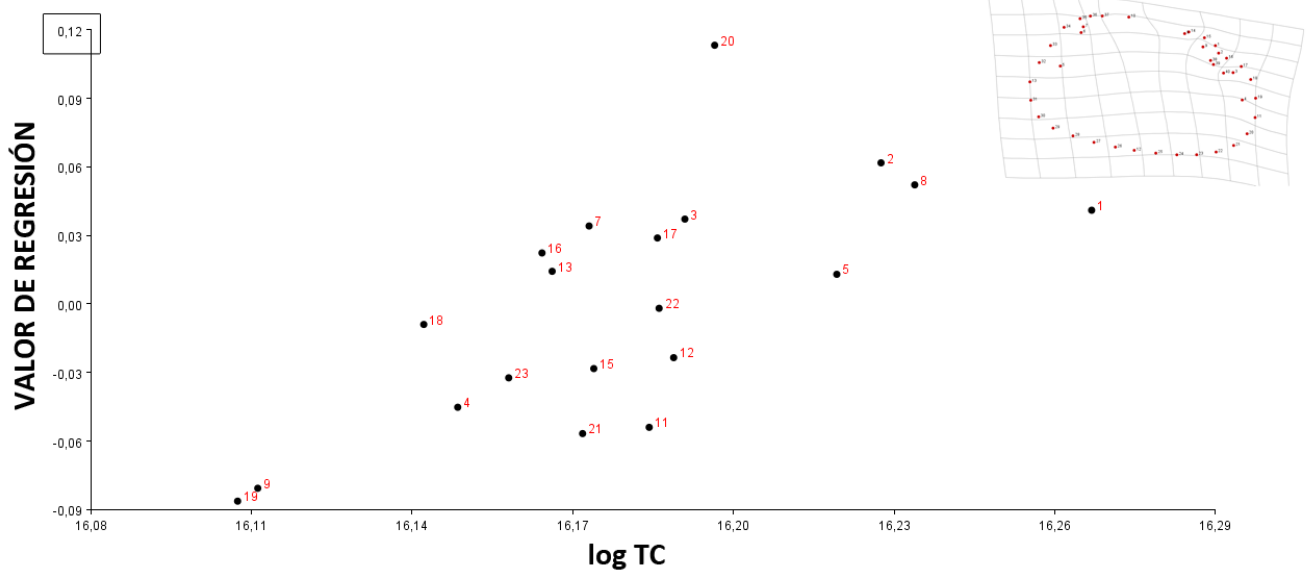


**FIGURA 4.6.4** Árbol consenso óptimo obtenido mediante el método de Maximum Likelihood entre los ejemplares del género *Diplodon* estudiados. La escala representa el número de sustituciones por sitio. Los valores del test de *Bootstrap* se brindan junto a cada rama.

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA

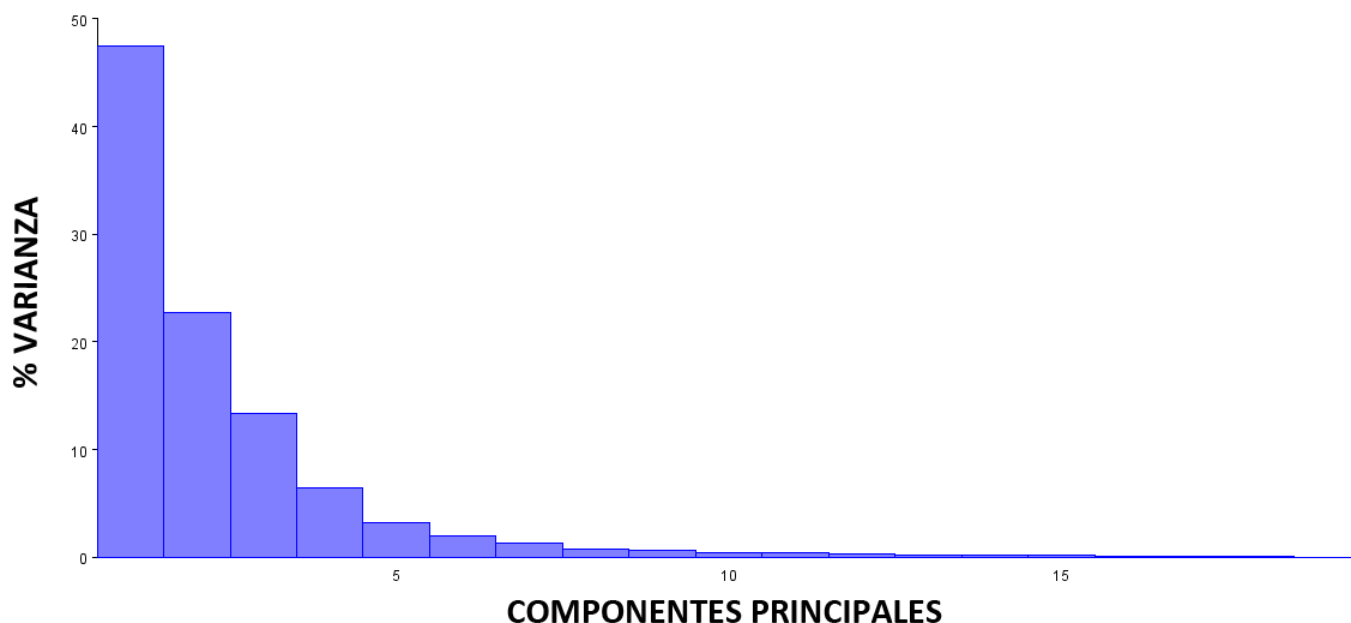


**FIGURA 4.6.5** Configuración consenso para los ejemplares del género *Diplodon* del arroyo Yuquerí Grande. Las flechas representan la desviación de los landmarks en los ejemplares estudiados.

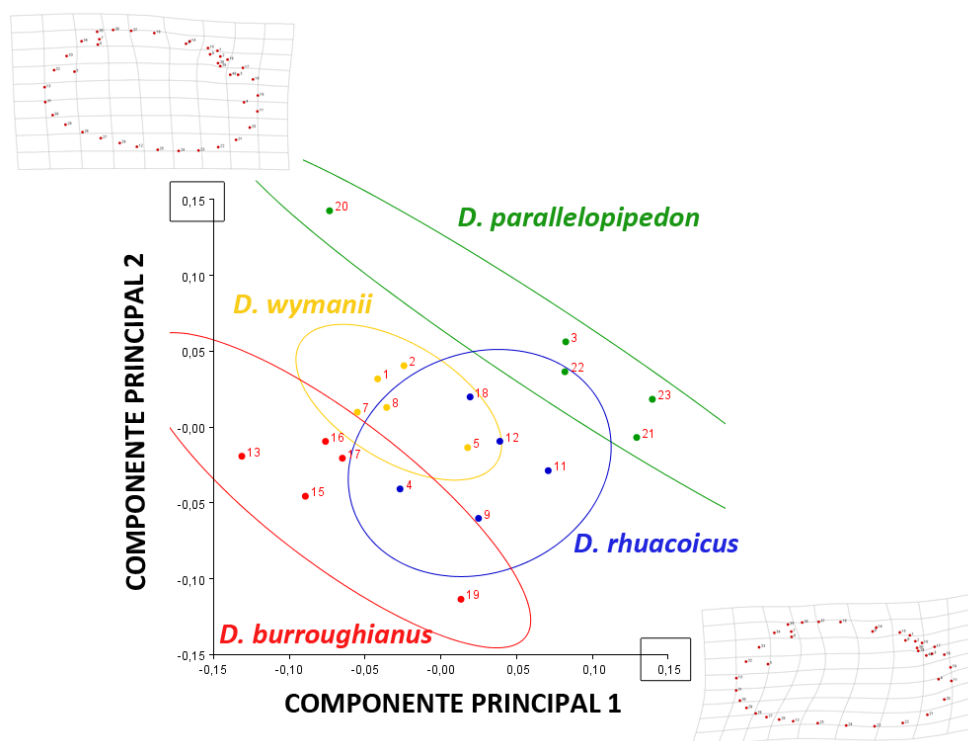


**FIGURA 4.6.6** Análisis de regresión de la variación morfométrica en función del logaritmo en base 10 del tamaño del centroide para los ejemplares de *Diplodon* sp. del arroyo Yuquerí Grande. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación.

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA



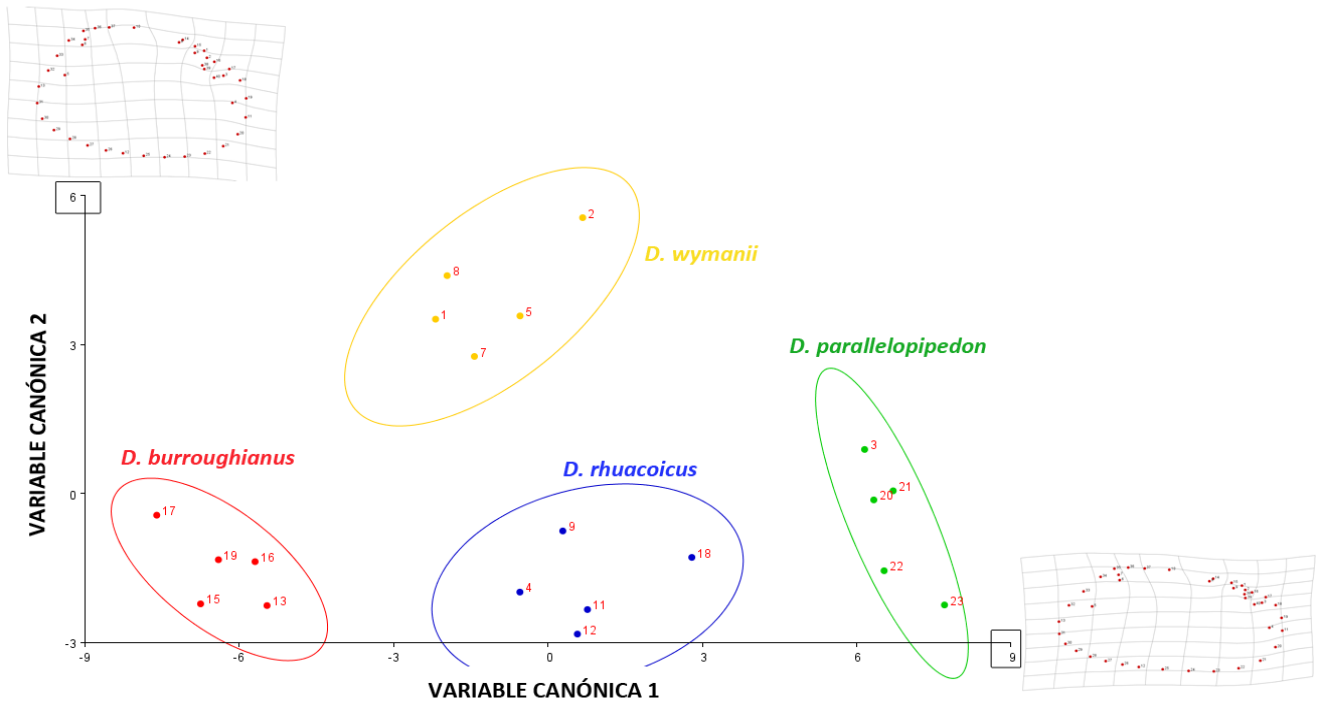
**FIGURA 4.6.7** Porcentajes de Varianza aportados por cada componente principal en el Análisis de Componentes Principales del conjunto de *Diplodon* sp. del arroyo Yuquerí Grande.



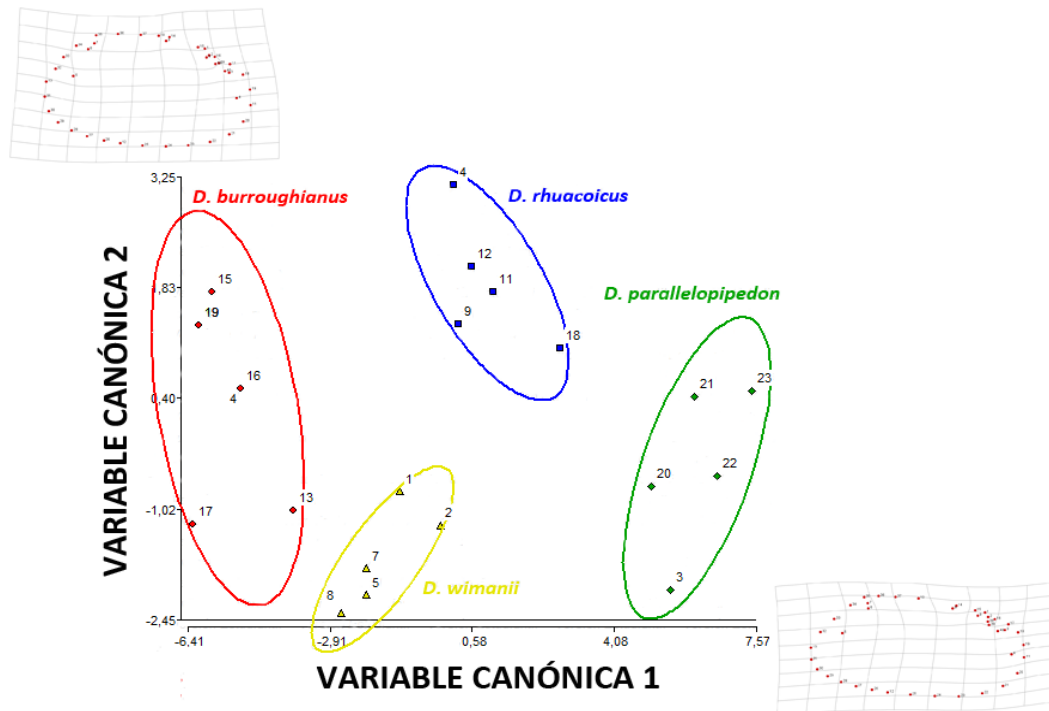
**FIGURA 4.6.8** Resultados del Análisis de Componentes Principales del material de *Diplodon* sp. del arroyo Yuquerí grande, comparando morfotipos. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación.

**CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

**A**

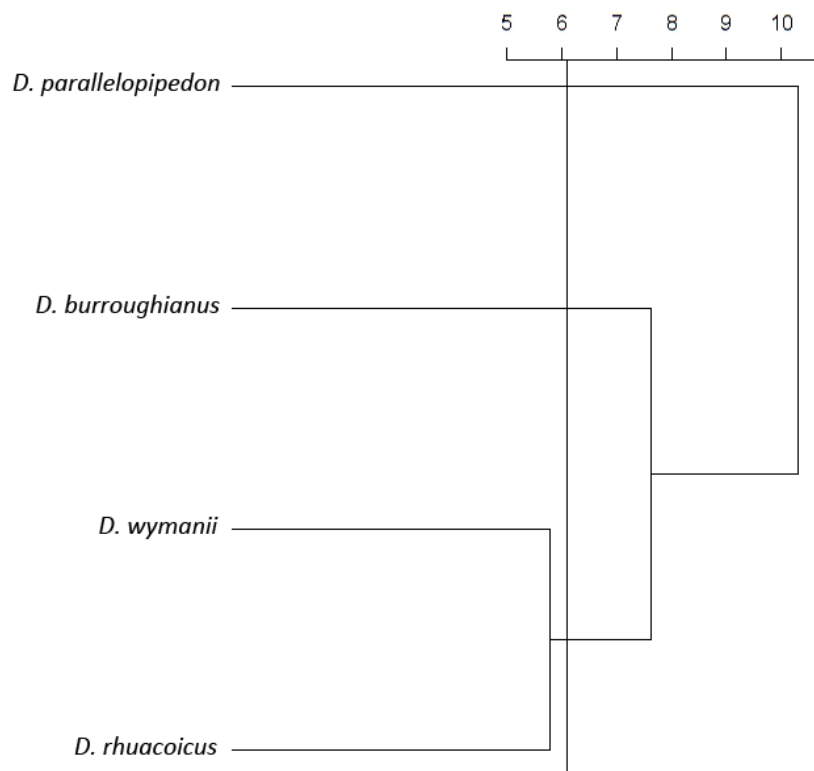


**B**



**FIGURA 4.6.9** Resultados del Análisis Canónico de ejemplares del género *Diplodon* del arroyo Yuquerí Grande comparando morfotipos. Las elipses muestran agrupamientos con probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) utilizando el total de 19 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación; B) utilizando los primeros 5 Componentes Principales. En el eje X se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=7,5. En el eje Y se representa el diagrama de deformación graficado con escala de deformación=3,2.

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA



**FIGURA 4.6.10** Resultados del análisis de conglomerados para los ejemplares del género *Diplodon* del arroyo Yuquerí Grande a partir de distancias de Mahalanobis, representadas por la escala. La línea vertical representa el valor de significación para el conjunto estudiado.

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA

### 4.7. TABLAS

**TABLA 4.7.1** Ejemplares de *Diplodon* sp. utilizados para el análisis molecular y morfométrico. Promedio de los valores de cuantificación de ADN obtenidos en la extracción. Con asterisco (\*) los individuos excluidos *a posteriori*. Los valores faltantes corresponden a medidas incongruentes. MLP-Ma= número de catálogo de ejemplar en la Colección Malacológica de la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata (FCNyM-UNLP), Argentina.

INDIVIDUO	MORFOTIPO	ESTADO DEL TEJIDO	CONCENTRACIÓN ADN (ng/μl)	PUREZA 260/280
1	2	Fresco	100,23	1,92
2	2	En etanol 70%	194,63	1,94
3	1	Fresco	48,16	1,40
4	3	Fresco	86,06	2,09
5	2	En etanol 70%	-	-
6*	2	Fresco	892,05	1,90
7	2	Fresco	294,13	1,93
8	2	Fresco	1149,63	1,92
9	3	Fresco	146,1	2,23
10*	2	Fresco	2463,4	-
11	3	En etanol 70%	64,26	2,15
12	3	Fresco	467,13	1,89
13	4	En etanol 70%	199,83	1,99
14*	1	Fresco	2295,5	1,93
15	4	En etanol 70%	39,33	2,11
16	4	En etanol 70%	79,76	2,15
17	4	En etanol 70%	140,4	2,03
18	3	Fresco	139,73	1,95
19	4	Fresco	91,83	1,95
20	1	En etanol 70%	-	-
21	1	En etanol 70%	520,1	1,89
22	1	Fresco	117,33	1,98
23	1	En etanol 70%	207,23	2,06

**CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA**

**TABLA 4.7.2** Números de catálogo de los ejemplares de *Diplodon* sp. ingresados a la colección malacológica del MLP.



INDIVIDUO	MLP-Ma SECO	MLP-Ma HÚMEDO	MLP-ZI-RG
1	MLP-Ma 15111-1	MLP-Ma 15111-1	423
2	MLP-Ma 15111-2	MLP-Ma 15111-2	424
3	MLP-Ma 15112-1	MLP-Ma 15112-1	428
4	MLP-Ma 15113-1	MLP-Ma 15113-1	433
5	MLP-Ma 15111-3	MLP-Ma 15111-3	425
6*	MLP-Ma 15111-4	MLP-Ma 15111-4	-
7	MLP-Ma 15111-5	MLP-Ma 15111-5	426
8	MLP-Ma 15111-6	MLP-Ma 15111-6	427
9	MLP-Ma 15113-2	MLP-Ma 15113-2	434
10*	MLP-Ma 15111-7	MLP-Ma 15111-7	-
11	MLP-Ma 15113-3	MLP-Ma 15113-3	435
12	MLP-Ma 15113-4	MLP-Ma 15113-4	436
13	MLP-Ma 15114-1	MLP-Ma 15114-1	438
14*	MLP-Ma 15112-2	MLP-Ma 15112-2	-
15	MLP-Ma 15114-2	MLP-Ma 15114-2	439
16	MLP-Ma 15114-3	MLP-Ma 15114-3	440
17	MLP-Ma 15114-4	MLP-Ma 15114-4	441
18	MLP-Ma 15113-5	MLP-Ma 15113-5	437
19	MLP-Ma 15114-5	MLP-Ma 15114-5	442
20	MLP-Ma 15112-3	MLP-Ma 15112-3	429
21	MLP-Ma 15112-4	MLP-Ma 15112-4	430
22	MLP-Ma 15112-5	MLP-Ma 15112-5	431
23	MLP-Ma 15112-6	MLP-Ma 15112-6	432

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA

**TABLA 4.7.3** Composición de bases de las secuencias del género *Diplodon* y de *Castalia ambigua* analizadas en este Trabajo de Tesis Doctoral.

EJEMPLAR	ESPECIE	% TIMINA	% CITOSINA	% ADENINA	% GUANINA	TOTAL
JN243889.1	<i>Castalia ambigua</i>	44,20	14,60	14,70	26,50	618
KU888242.1	<i>Castalia ambigua</i>	44,30	13,00	17,00	25,80	454
1	<i>Diplodon</i> sp.	17,60	26,40	42,10	13,90	632
2	<i>Diplodon</i> sp.	18,00	26,10	42,30	13,60	683
3	<i>Diplodon</i> sp.	19,20	25,00	40,20	15,60	687
4	<i>Diplodon</i> sp.	18,10	26,50	42,40	13,00	686
5	<i>Diplodon</i> sp.	28,60	18,20	29,70	23,50	595
7	<i>Diplodon</i> sp.	18,30	25,30	41,70	14,70	693
8	<i>Diplodon</i> sp.	17,50	26,20	42,80	13,60	692
9	<i>Diplodon</i> sp.	18,00	26,50	42,20	13,20	687
11	<i>Diplodon</i> sp.	17,60	26,40	43,00	13,10	689
12	<i>Diplodon</i> sp.	17,70	26,10	42,90	13,30	693
13	<i>Diplodon</i> sp.	18,60	24,90	42,00	14,60	700
15	<i>Diplodon</i> sp.	17,90	25,50	41,80	14,70	686
16	<i>Diplodon</i> sp.	18,40	25,20	41,40	15,00	640
17	<i>Diplodon</i> sp.	24,30	18,00	42,30	15,40	449
18	<i>Diplodon</i> sp.	17,50	26,70	42,70	13,10	681
19	<i>Diplodon</i> sp.	18,70	25,00	41,30	15,00	700
20	<i>Diplodon</i> sp.	16,60	26,10	42,80	14,50	682
21	<i>Diplodon</i> sp.	17,10	25,70	42,80	14,50	685
22	<i>Diplodon</i> sp.	17,00	25,50	42,70	14,80	689
23	<i>Diplodon</i> sp.	16,90	26,20	42,60	14,30	680
	<b>PROMEDIO</b>	<b>21,00</b>	<b>24,05</b>	<b>39,25</b>	<b>15,71</b>	<b>654,59</b>
DQ191410.1	<i>Diplodon chilensis</i>	39,60	15,80	18,00	26,60	627
AF231744.1	<i>Diplodon deceptus</i>	41,40	14,40	16,70	27,50	630
KP184898.1	<i>Diplodon demeraraensis</i>	42,00	13,80	15,20	29,10	640
KP184899.1	<i>Diplodon demeraraensis</i>	41,20	14,20	15,10	29,50	570
KU888263.1	<i>Diplodon suavidicus</i>	39,40	14,50	16,80	29,30	434
	<b>PROMEDIO GENERAL</b>	<b>23,80</b>	<b>22,70</b>	<b>35,80</b>	<b>17,60</b>	<b>640,80</b>

## CAPÍTULO 4. ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y MOLECULAR DE EJEMPLARES DE *Diplodon* sp. EN SIMPATRÍA

**TABLA 4.7.4** Resultados del análisis de regresión (test de alometría) entre las coordenadas de Procrustes y el tamaño del centroide para los de ejemplares del género *Diplodon* del arroyo Yuquerí Grande. Se brinda el valor de probabilidad para diez mil permutaciones. SC= Suma de Cuadrados.

VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLES DEPENDIENTES	TAMAÑO DE LA MUESTRA		
Tamaño del Centroides	Coordenadas de Procrustes 1-80	20		
SC TOTAL	SC PREDICHO	SC RESIDUAL	% PREDICHO	PROBABILIDAD
0,22284612	0,02377978	0,19906634	10,67%	0,0793

**TABLA 4.7.5** Varianza de las variables canónicas (VC) para los ejemplares del género *Diplodon* del arroyo Yuquerí Grande. A) Análisis con el total de 19 Componentes Principales; B) utilizando los primeros. 5 Componentes Principales.

A	EIGENVALORES			B	EIGENVALORES		
	% VARIANZA	% ACUMULADO	% VARIANZA		% ACUMULADO		
VC1	27,241932	76,498	76,498	VC1	21,98	91,27	91,27
VC2	6,79314951	19,076	95,574	VC2	2,08	8,64	99,91
VC3	1,57623764	4,426	100	VC3	0,02	0,09	100

**TABLA 4.7.6** Distancias de Mahalanobis entre morfotipos para los de ejemplares del género *Diplodon* del arroyo Yuquerí Grande y su valor de probabilidad (p) asociado. En rojo los valores por debajo del 0,05 de valor de probabilidad.

	MORFOTIPO 1	MORFOTIPO 2	MORFOTIPO 3
MORFOTIPO 2	9,108 p=0,0069		
MORFOTIPO 3	6,6462 p=0,0004	6,2592 p=0,0066	
MORFOTIPO 4	13,098 p=0,0077	7,7178 p=0,0053	7,6419 p=0,0079

**TABLA 4.7.7** Resultados de la clasificación cruzada entre morfotipos del género *Diplodon* del arroyo Yuquerí Grande.

	MORFOTIPO 1	MORFOTIPO 2	MORFOTIPO 3	MORFOTIPO 4	Total	Error(%)
MORFOTIPO 1	5	0	0	0	5	0
MORFOTIPO 2	0	5	0	0	5	0
MORFOTIPO 3	0	0	5	0	5	0
MORFOTIPO 4	0	0	0	5	5	0
Total	5	5	5	5	20	0

**CAPÍTULO 5**

**MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE**

***Diplodon delodontus* EN ARGENTINA**

## CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA

### 5.1. RESUMEN

Conocer en profundidad la conformación y distribución de una especie es fundamental para su conservación y recuperación en ambientes naturales. La información taxonómica sobre los unionoideos cobra vital importancia, ya que una delimitación incorrecta de las especies puede llevar a distintas interpretaciones de su estado de conservación. Al ser una especie de amplia distribución y de la que se cuenta con numerosos registros en Argentina y gran cantidad de ejemplares colectados, *Diplodon delodontus* puede ser un buen modelo para realizar estudios poblacionales. Para este capítulo se propuso determinar si existen diferencias morfométricas entre poblaciones de *Diplodon delodontus*, y si dichas diferencias se corresponden con la pertenencia de las poblaciones a diferentes subcuencas hidrográficas, o si se ajustan a las regiones biogeográficas propuestas para moluscos de agua dulce. Para ello se digitalizó la valva izquierda de 63 ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina de colecciones malacológicas nacionales. Las muestras fueron clasificadas según tres criterios (clases) espaciales diferentes: 1) Sistemas de cuencas; 2) Regiones biogeográficas de unionoideos; 3) regiones biogeográficas de gasterópodos de agua dulce. Fueron seleccionados 13 *landmarks* y 27 *semilandmarks*. Se realizaron Análisis de Componentes Principales y Análisis de Variables Canónicas. La Clase 3 representó mejor la distribución del conjunto de *Diplodon delodontus* de Argentina, ya que logró clasificar todos los ejemplares analizados, las diferencias entre todos los grupos fueron significativas y con probabilidad menor que 0,01 y la variabilidad de los ejemplares ajustó de manera robusta en el Análisis Canónico. Los ejemplares del Río Uruguay presentaron las mayores distancias con respecto a los grupos Paraná Medio y Paraná Inferior-Río de la Plata. La comparación realizada en este Trabajo de Tesis Doctoral y enfocada en la variabilidad morfológica de *Diplodon delodontus* corroboró las diferencias entre regiones biogeográficas planteadas para gasterópodos de agua dulce. Se identificaron tres morfotipos de *D. delodontus*: 1) Río Uruguay, 2) Paraná Medio y 3) Paraná Inferior y Río de la Plata. El análisis apoyó la agrupación de los ejemplares del Río Uruguay en una especie distinta, manteniéndose como *D. delodontus* aquellos ejemplares localizados en el Río Paraná y en el Río de la Plata. A su vez, *D. delodontus* incluyó una población ubicada en el Paraná Medio y otra distribuida en el Paraná Inferior y Río de la Plata. Es decir, el análisis de la variabilidad morfométrica de *Diplodon delodontus*, corroboró las diferencias entre regiones biogeográficas planteadas por Núñez et al. (2010) para gasterópodos de agua dulce. Sin embargo, las conclusiones extraídas a partir de los datos obtenidos son limitadas. El método de análisis de la morfometría geométrica utilizado en este Trabajo de Tesis Doctoral puede aportar datos para conocer la procedencia de ejemplares en cuerpos de agua cerrados o alejados de los afluentes principales. La necesidad de un estudio filogeográfico que incluya toda la Cuenca del Plata se hizo evidente, para lo cual sería necesario un análisis molecular exhaustivo y de gran amplitud geográfica. Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis Doctoral aportan información para establecer el estado de conservación de *D. delodontus* en la región.

Conocer en profundidad la conformación y distribución de una especie es fundamental para su conservación y recuperación en ambientes naturales. La información taxonómica precisa sobre los unionoideos cobra vital importancia, ya que una delimitación incorrecta de las especies puede llevar a distintas interpretaciones de su estado de conservación. Miyahira (2017) describió el ejemplo de *Diplodon pfeifferi* (Dunker, 1848). Al considerarse una especie válida endémica del estado de Río de Janeiro, fue incluida en la edición del Libro Rojo de Brasil de 2008. Sin embargo, algunos autores (Simpson, 1914; Haas, 1969; Simone, 2006) consideraron esta especie como un sinónimo de *D. granosus*, la cual se clasificó como una especie de Preocupación Menor (LC) (sección 1.4).

*Diplodon delodontus* (Lamarck, 1819) (Unionoidea: Hyriidae) es una especie de distribución amplia en la Cuenca del Plata. Habita en los ríos Paraná, Uruguay y Río de la Plata. Su distribución abarca parte de Argentina, Uruguay y sur de Brasil (figura 1.2.4). En Argentina, la Cuenca del Plata se desarrolla en la región noreste o litoral y está representada por el Paraguay Inferior, el Medio y Bajo Paraná, gran parte de la subcuenca del Uruguay, y el Río de la Plata. Bonetto (1960) planteó diferencias en la distribución de las especies de unionoideos en esta cuenca. Este autor estableció una región que abarca la cuenca del Paraguay junto con el Paraná Medio e Inferior en el litoral (noreste) argentino, otra región formada por el Paraná Superior, y una tercera constituida por la cuenca del Uruguay (figura 1.2.7B). Núñez et al. (2010) determinaron ocho regiones biogeográficas en Argentina basándose en los datos de distribución de gasterópodos de agua dulce (figura 1.2.8A). Para la Cuenca del Plata identificaron cuatro regiones: Misionera (1), Paraná Medio (2), Río Uruguay (3) y Paraná Inferior- Río de la Plata (4). La existencia de regiones biogeográficas distintas en la porción argentina de la Cuenca del Plata ha sido planteada también por López et al. (2002) y López & Michelarena (2005), sobre la distribución de especies de peces de agua dulce (figura 1.2.8B). Estos autores distinguieron una zona correspondiente a la provincia de Misiones (Región Misionera), otra al Río Uruguay (Región Río Uruguay Inferior) y una tercera que abarcaría el resto de la cuenca (Región Eje Potámico Subtropical).

Según Parodiz (1968) y Haas (1969) *Diplodon delodontus* se divide en dos subespecies: *D. delodontus delodontus* (Lamarck, 1819) y *D. delodontus wymanii* (Lea, 1860). La primera incluye a las poblaciones del sistema de cuencas Paraguay- Paraná. La segunda representa los ejemplares encontrados en el Río Uruguay. Haas (1969) mencionaba además una tercera subespecie: *D. delodontus expansus* distribuida por el Río Paraguay y Alto Paraná. Graf & Cummings (2007), Pereira (2014), Simone (2006) y Simpson (1914) consideraron la separación en dos especies: *D. delodontus* (Lamarck, 1819) y *D. wymanii* (Lea, 1860). En este Trabajo de Tesis Doctoral se considerará válida la especie *D. wymanii*, y no se incluirán los individuos con esta clasificación dentro del estudio de *D. delodontus*.

## ***CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA***

Al ser una especie de amplia distribución y de la que se cuenta con numerosos registros en Argentina y gran cantidad de ejemplares colectados, *Diplodon delodontus* puede ser un buen modelo para estudios poblacionales. Los mismos ya se han realizado en *D. chilensis* aplicando morfometría geométrica (Yusseppone et al., 2017) y análisis moleculares (Fuentealba et al., 2010). Para este capítulo se propuso determinar si existen diferencias morfométricas entre poblaciones de *Diplodon delodontus* (= *Diplodon delodontus delodontus*), y si dichas diferencias se corresponden con la pertenencia de las poblaciones a diferentes subcuencas hidrográficas, o si se ajustan a las regiones biogeográficas propuestas para moluscos de agua dulce.

### 5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### MATERIAL ESTUDIADO

Se utilizaron un total de 63 ejemplares de las colecciones malacológicas nacionales del Museo de La Plata -MLP y del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” -MACN. Estos ejemplares pertenecen a 20 lotes de localidades de Argentina e identificados como *Diplodon delodontus* (= *Diplodon delodontus delodontus*) (figura 5.6.1 y tabla 5.7.1).

El material se clasificó en tres clases siguiendo distintos criterios espaciales, relacionados con la distribución de los puntos estudiados (sección 2.3). La clasificación se puede observar en la tabla 5.7.2. Para obtener la Clase 1 se realizó una clasificación de los puntos por sistemas de cuencas, utilizando como capa de base el mapa de la figura 1.2.7A. Aplicando la misma técnica, para generar la Clase 2 se usó el mapa de regiones basado en la distribución de especies de *Diplodon*, el cual fue propuesto por Bonetto (1960) (figura 1.2.7B). La Clase 3 se obtuvo a partir del mapa de distribución de gasterópodos publicado por Núñez et al. (2010) (figura 1.2.8A). Se decidió agrupar como “Indefinido” a los puntos que no coincidieron con ninguna clasificación, o que coincidieron con más de una clasificación de la misma clase.

#### ANÁLISIS DE LAS CONFIGURACIONES MORFOMÉTRICAS

Fueron seleccionados 13 *landmarks* y 27 *semilandmarks* (sección 2.3). Se calculó la forma consenso entre las muestras y se realizaron Análisis de Componentes Principales y Análisis de Variables Canónicas. Por último, se calcularon las distancias de Mahalanobis entre los grupos y su probabilidad en relación al número de permutaciones (sección 2.3).

## **CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA**

### **5.4. RESULTADOS**

La forma consenso (**figura 5.6.2**) presentó una configuración redondeada, con un borde dorsal convexo formando una punta posterior, un extremo posterior formando una punta y una charnela ancha con dientes subcardinales separados, el diente inferior curvado.

Los resultados del análisis de regresión se exponen en la **figura 5.6.3** y en la **tabla 5.7.3**. Las coordenadas alineadas de Procrustes se relacionaron de manera lineal con los valores de los centroides, observándose un efecto de alometría entre las coordenadas de Procrustes y el Tamaño del Centroide en la muestra estudiada ( $p=0,006$ ). La variación predicha por el efecto de alometría fue de 4,86%.

Según los resultados del Análisis de Componentes Principales, los primeros 13 Componentes Principales abarcaron el 95,62% de la variabilidad del conjunto estudiado (**figura 5.6.4, tabla A7**). Se graficaron los primeros dos componentes principales (45,5% acumulado de la variación total). No se observó una variación de la conformación morfométrica relacionada con las clases establecidas (**figura 5.6.5**). Las configuraciones de los individuos desplazados sobre el eje del Componente Principal 1 (ejemplares 22, 23 y 43), fueron más deprimidos que la forma consenso, mientras que los ubicados en el extremo del Componente Principal 2 (individuo 63) resultaron más comprimidos.

En la comparación por sistemas de cuencas (Clase 1) con el total de la variación (**tabla 5.7.4**) las dos primeras variables canónicas acumularon el 95,45% de la variación total del conjunto estudiado. La primera Variable Canónica representó el 66,5% de la variación, mientras que la segunda Variable Canónica representó el 28,95%. En este análisis se observó una separación significativa entre los grupos ( $p<0,05$  para todas las comparaciones) (**figura 5.6.6A y tabla 5.7.5**). Los ejemplares sin subcuenca definida presentaron mayores distancias que los demás grupos entre sí. Las agrupaciones más relacionadas fueron Río Paraná y Río de la Plata (distancia=7,01;  $p<0,01$ ). Al reducir la variación a los primeros siete Componentes Principales se observó una menor distinción entre grupos (**figura 5.6.6B**). Los resultados de la clasificación cruzada (**tabla 5.7.7**) no apoyaron las agrupaciones con un porcentaje de error de clasificación mayor a 10% en todos los casos excepto para el grupo "Indefinido" (error%=0). El grupo peor clasificado fue Río de la Plata (error%=44,44).

En el análisis de las regiones establecidas por Bonetto, 1960 (Clase 2) con el total de la variación (**tabla 5.7.4**) la Variable Canónica 1 incluyó el 86,05% de la variación, mientras que la Variable Canónica 2 representó el 13,95%. En la **figura 5.6.7A** y en la **tabla 5.7.5** se observó que 24 ejemplares quedaron excluidos de la clasificación y agrupados en el conjunto "Indefinido". El grupo más distante con respecto a los demás conjuntos fue Uruguay Las tres agrupaciones mostraron distancias significativas entre sí ( $p<0,01$ ). Al reducir

## **CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA**

la variación a los primeros cinco Componentes Principales (**figura 5.6.7B**), se observó una menor diferenciación entre grupos. El mejor resultado en la clasificación cruzada (**tabla 5.7.7**) lo obtuvo el grupo “Indefinido” (error%=8,33). El peor resultado se observó en el grupo Paraguay y Paraná (error%=20,59).

En el estudio de las regiones establecidas por Núñez et al., 2010 (Clase 3) (**tabla 5.7.4**) se observó que la primera Variable Canónica contuvo el 93,25% de la variación de los caracteres, mientras que la segunda Variable Canónica representó el 6,75%. Esta clase no presentó ejemplares sin clasificar, las diferencias entre todos los grupos fueron significativas y con probabilidad menor que 0,01 (**tabla 5.7.5**) y sólo 5 individuos quedaron por fuera de la probabilidad de 0,95 de pertenecer al grupo correspondiente (**figura 5.6.8A**). Según este criterio de clasificación, los ejemplares del Río Uruguay presentaron las mayores distancias con respecto a los grupos Paraná Medio y Paraná Inferior-Río de la Plata (distancias de 15,93 y 10,16 unidades respectivamente). Al reducir la variación a los primeros siete Componentes Principales (**figura 5.6.8B**) se redujo la distancia entre las agrupaciones. Los porcentajes de error en la clasificación cruzada (**tabla 5.7.7**) fueron mayores al 10% en todos los casos. El grupo mejor clasificado fue Río Uruguay (error%=14,29) y el peor fue Paraná y Río de la Plata (error%=33,33).

## **CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA**

### **5.5. DISCUSIÓN**

La utilidad de los bivalvos de agua dulce en estudios biogeográficos radica en su escasa movilidad de la fase adulta y su abundante registro paleontológico (Bonetto, 1960).

La Clase 3 representó mejor la distribución del conjunto de *Diplodon delodontus* de Argentina, ya que logró clasificar todos los ejemplares de la muestra, las diferencias entre todos los grupos fueron significativas y con probabilidad menor que 0,01 en el Análisis Canónico. Sin embargo, al reducir la variación estudiada, los resultados perdieron robustez. Se identificaron tres morfotipos de *D. delodontus*: 1) Río Uruguay, 2) Paraná Medio y 3) Paraná Inferior y Río de la Plata. El análisis apoyó la agrupación de los ejemplares del Río Uruguay en una especie distinta, manteniéndose como *D. delodontus* aquellos ejemplares localizados en el Río Paraná y en el Río de la Plata. A su vez, *D. delodontus* incluyó una población ubicada en el Paraná Medio y otra distribuida en el Paraná Inferior y Río de la Plata. Es decir, el análisis de la variabilidad morfométrica de *Diplodon delodontus*, corroboró las diferencias entre regiones biogeográficas planteadas por Núñez et al. (2010) para gasterópodos de agua dulce. Sin embargo, las conclusiones extraídas a partir de los datos obtenidos son limitadas.

Si bien no se presentaron ambigüedades en el análisis, se reconoció un sesgo en la distribución de *Diplodon delodontus*, con sólo 2 de 20 localidades clasificadas para el Río Uruguay, las que incluyeron un máximo de siete individuos representando esta región. Probablemente los ejemplares del Río Uruguay correspondan a *D. wymanii*, la cual está citada para esta cuenca.

El método de análisis de la morfometría geométrica utilizado en este Trabajo de Tesis Doctoral puede aportar datos para conocer la procedencia de ejemplares cuyas localidades de colecta no fueran fácilmente asignadas a un sistema o región, como ocurrió en el caso del grupo sin subcuenca definida de la Clase 1. En este caso, el grupo conformado por los individuos 1, 22 y 47 resultó más relacionado con los organismos del Río Paraná. Al observar la posición de las configuraciones de los mismos ejemplares, pero en el análisis de la Clase 3, éstos resultaron incluidos en la agrupación Paraná Inferior y Río de la Plata. Realizando este procedimiento fue posible plantear una relación de estos ejemplares con el sistema del Río Paraná Inferior.

La necesidad de un estudio filogeográfico que incluya toda la Cuenca del Plata se hizo evidente, para lo cual sería necesario un análisis molecular exhaustivo y de gran amplitud geográfica. Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis Doctoral deberán tenerse en cuenta al establecer el estado de conservación de *Diplodon delodontus* en la región.

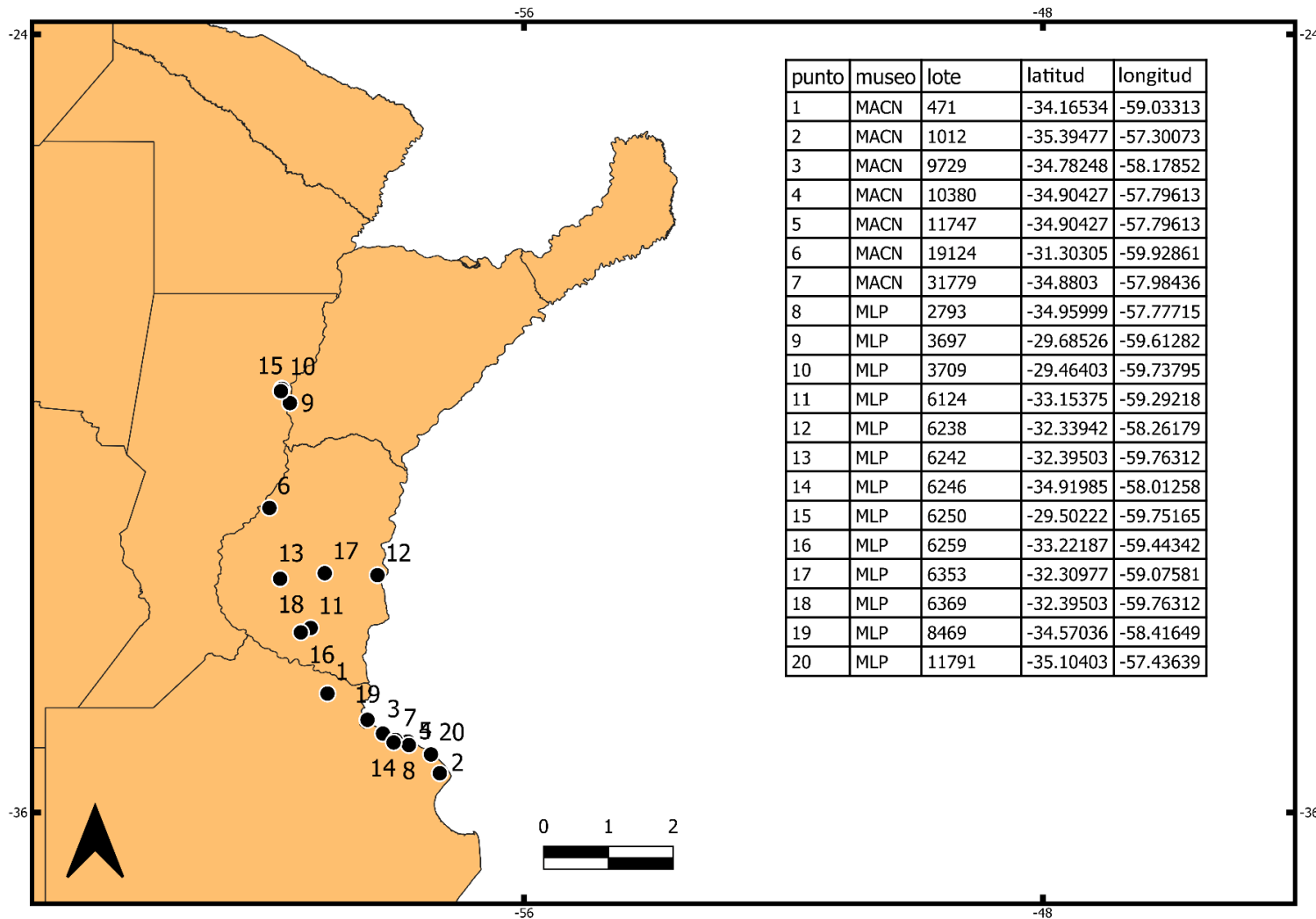
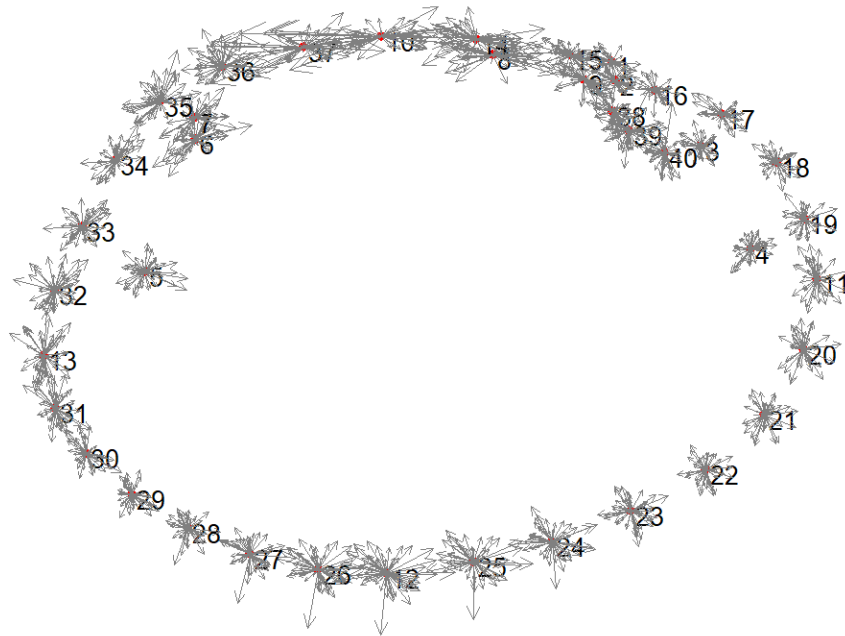
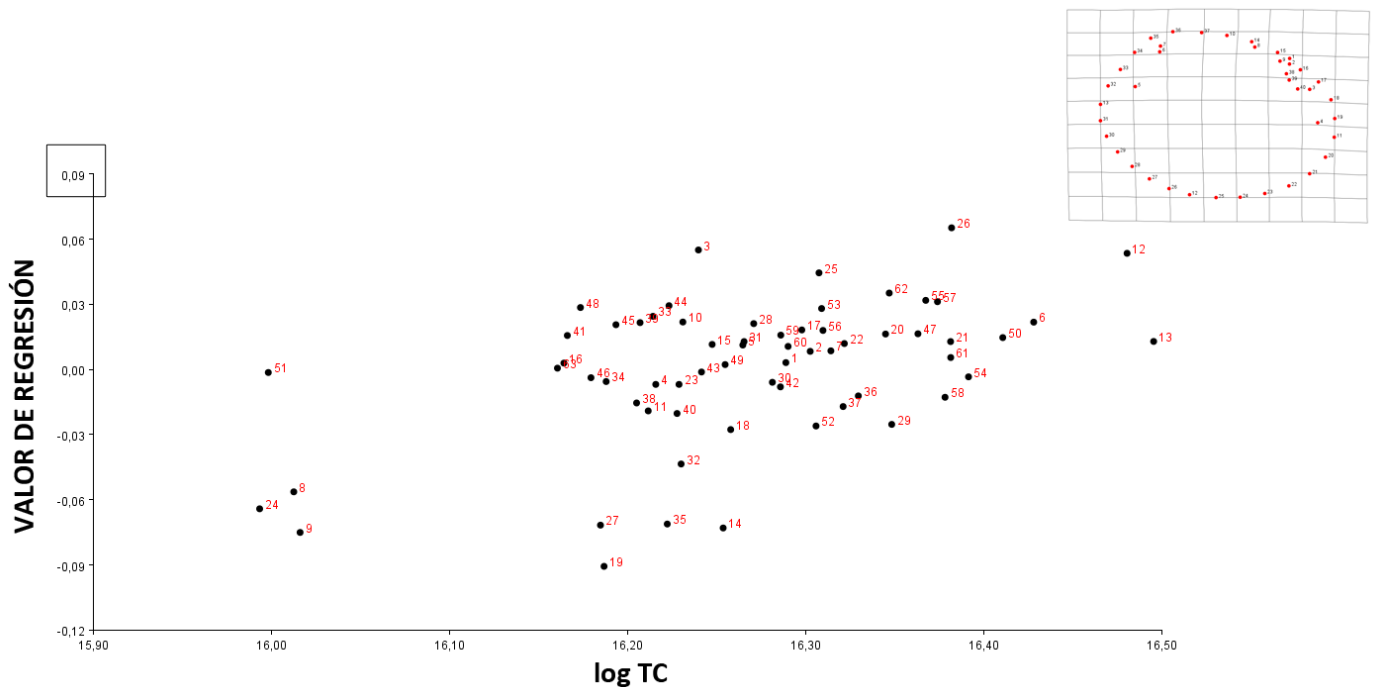


FIGURA 5.6.1 Mapa de procedencia de los lotes de *Diplodon delodontus* analizados. Los puntos corresponden a la ubicación de cada lote en Argentina.

## 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus*

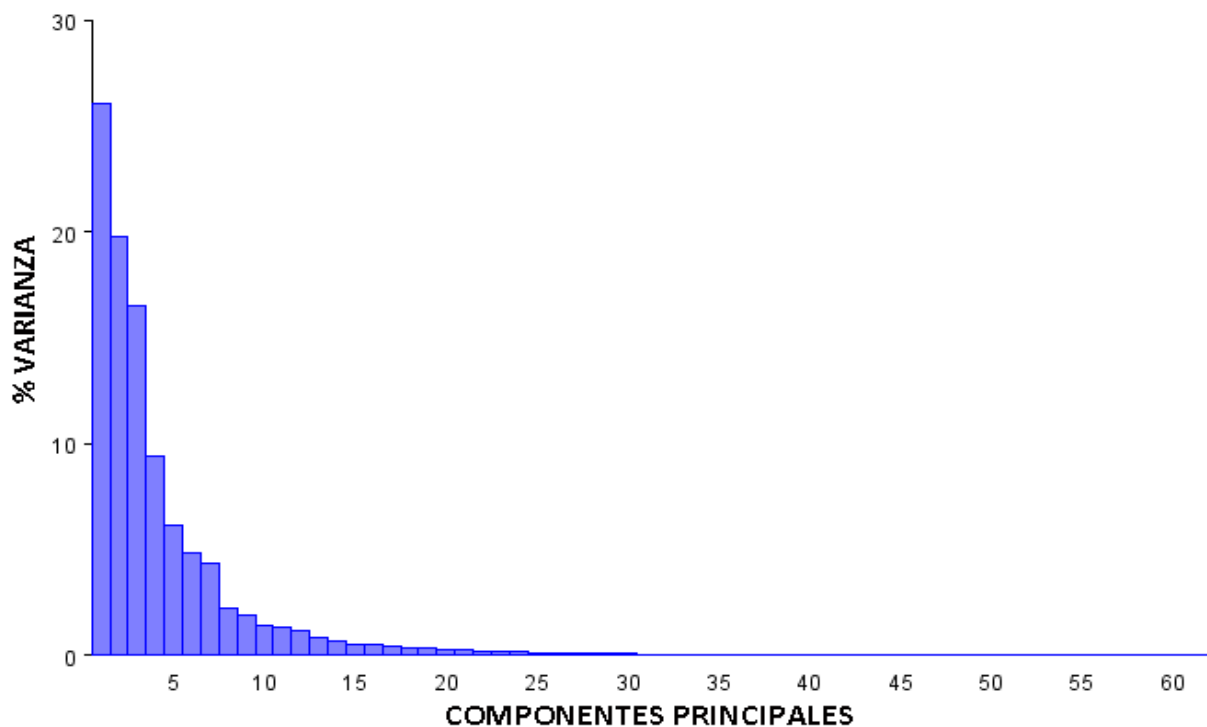


**FIGURA 5.6.2** Configuración consenso para los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina. Las flechas representan la desviación de los *landmarks* en los ejemplares estudiados.



**FIGURA 5.6.3** Análisis de regresión de la variación morfométrica en función del tamaño del centroide transformado a su logaritmo en base 10, para la muestra estudiada (63 ejemplares) de *Diplodon delodontus* de Argentina. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación.

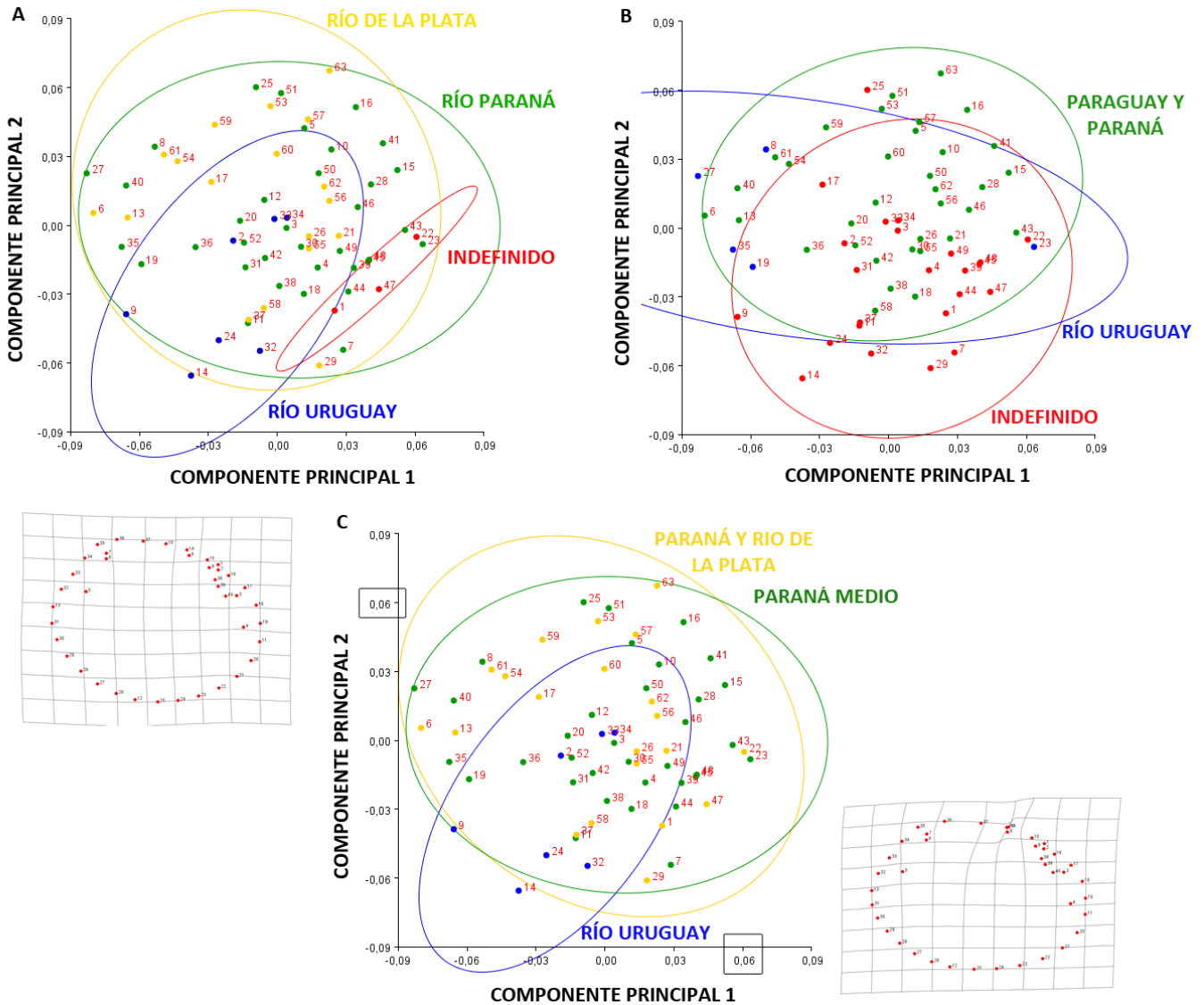
## CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA



**FIGURA 5.6.4** Porcentajes de Varianza aportados por cada componente principal en el Análisis de Componentes Principales de *Diplodon delodontus* de Argentina.

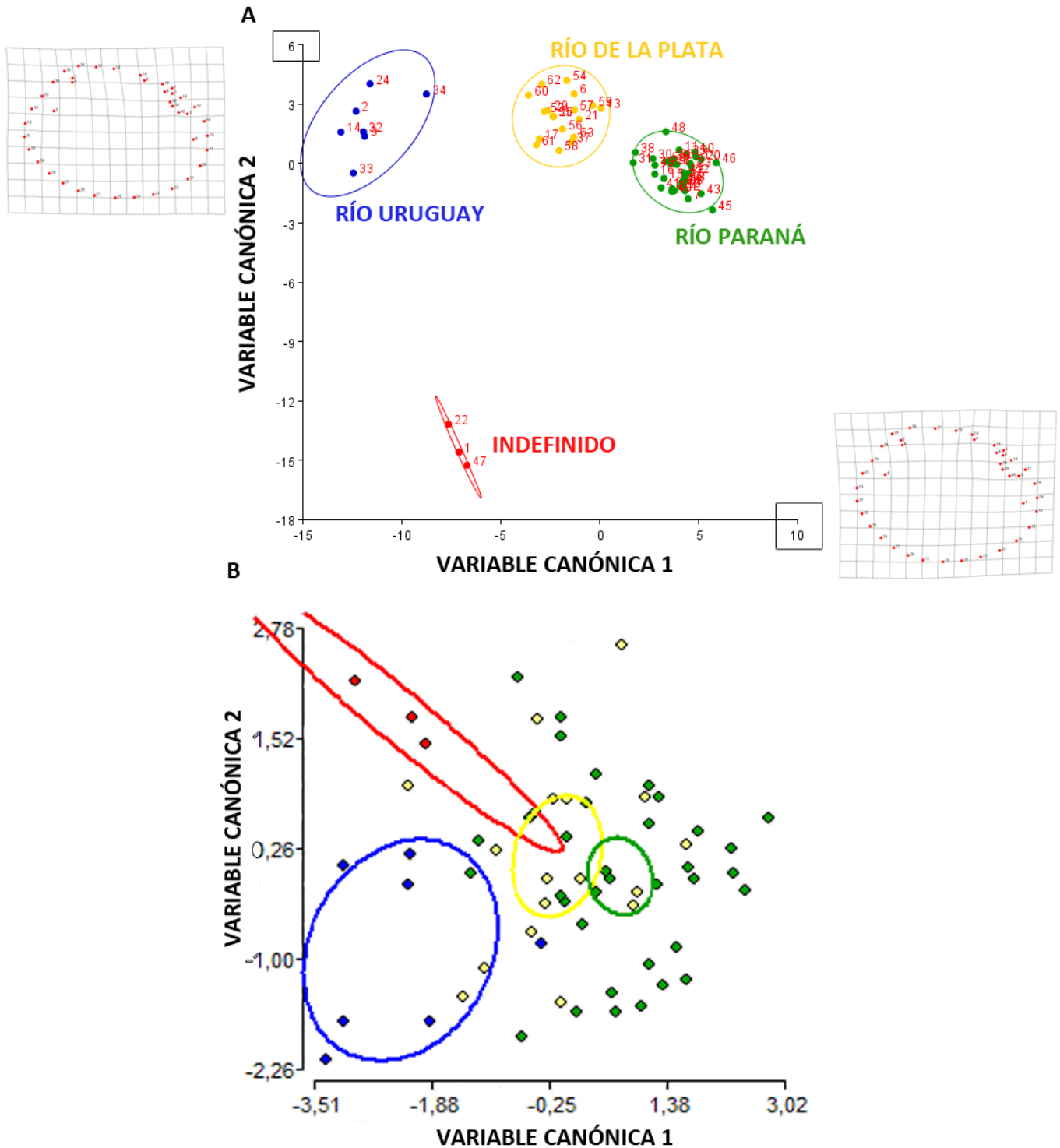


## 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus*



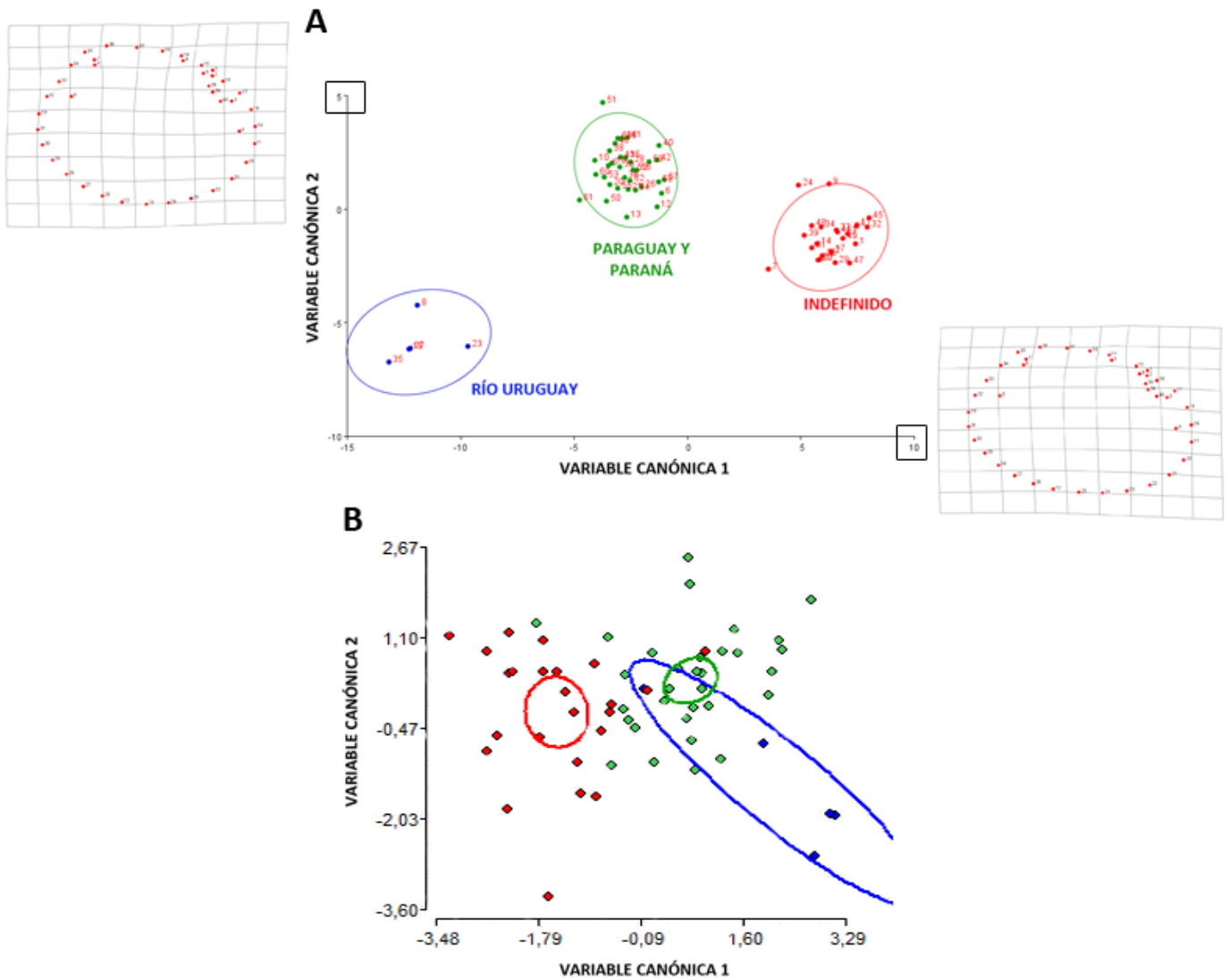
**FIGURA 5.6.5** Resultados del Análisis de Componentes Principales de los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación. A) Clase 1; B) Clase 2; C) Clase 3.

## CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA



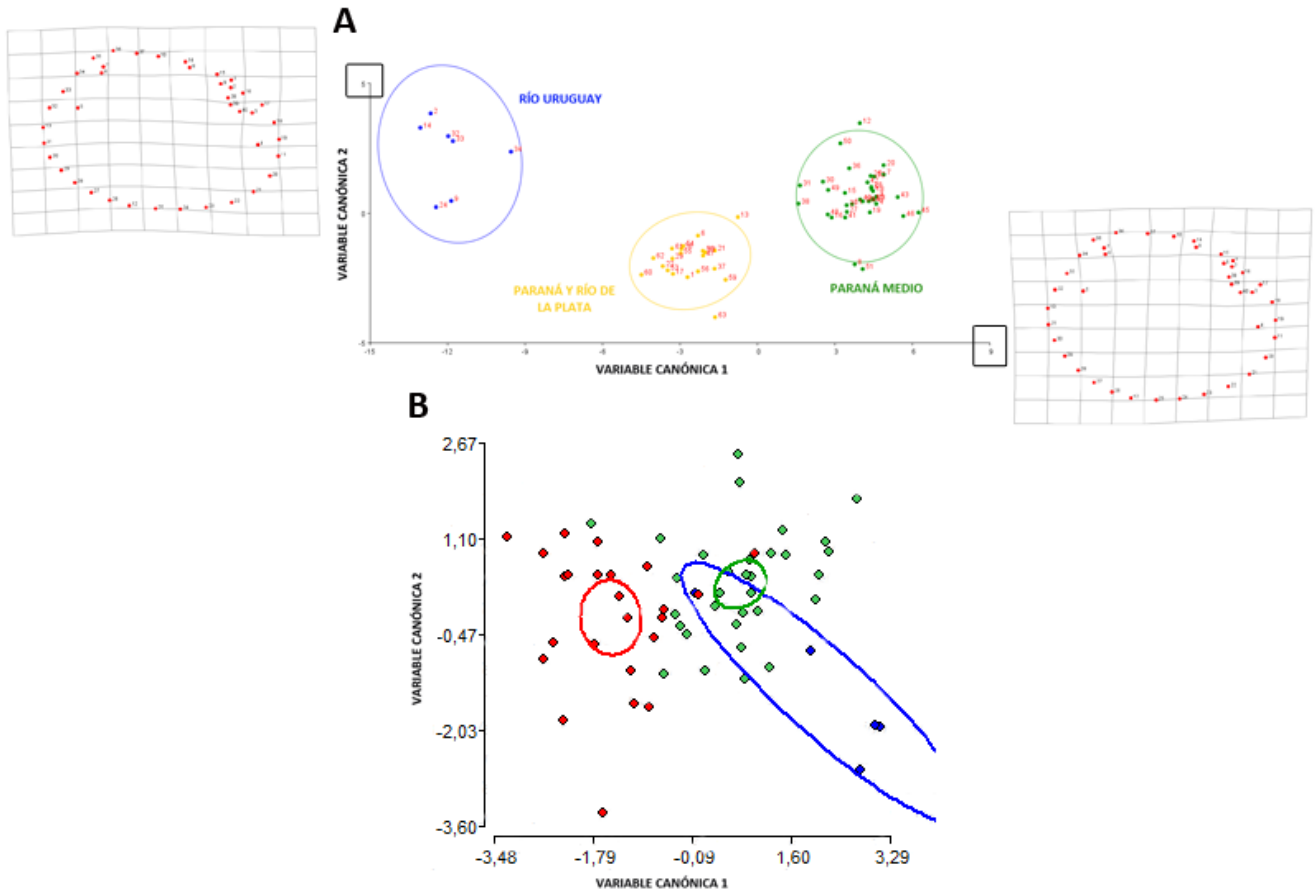
**FIGURA 5.6.6** Resultados del Análisis de variables Canónicas de los ejemplares de *D. delodontus* de Argentina comparando agrupaciones de la Clase 1 (sistemas de cuencas). Las elipses representan agrupaciones con una probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) con 61 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación; B) utilizando los primeros 7 Componentes Principales.

## 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus*



**FIGURA 5.6.7** Resultados del Análisis de Variables Canónicas de los ejemplares de *D. delodontus* de Argentina comparando agrupaciones de la Clase 2 - regiones establecidas por Bonetto (1960). Las elipses representan agrupaciones con una probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) con 61 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación; B) utilizando los primeros 5 Componentes Principales.

## CAPÍTULO 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus* EN ARGENTINA



**FIGURA 5.6.8** Resultados del Análisis de Variables Canónicas de los ejemplares de *D. delodontus* de Argentina comparando agrupaciones de la Clase 3 - regiones establecidas por Núñez et al. (2010). Las elipses representan agrupaciones con una probabilidad igual a 0,95. En cada eje se representan los diagramas de deformación correspondientes. A) con 61 Componentes Principales. Con un recuadro se indica el valor de escala en el que se graficó la grilla de deformación; B) utilizando los primeros 7 Componentes Principales.

## 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *Diplodon delodontus*

### 5.7. TABLAS

**TABALA 5.7.1** Material utilizado en el análisis de *Diplodon delodontus*. MACN= Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"; MLP= Museo de La Plata.

PUNTO	MUSEO	LOTE	EJEMPLARES	PROVINCIA	LOCALIDAD	LATITUD	LONGITUD
1	MACN	471	2	Buenos Aires	Arroyo Pesquerías	-34,16534	-59,03313
2	MACN	1012	3	Buenos Aires	Arroyo Todos los Santos, Estación Verónica del Ferrocarril General Roca	-35,39477	-57,30073
3	MACN	9729	2	Buenos Aires	Arroyo Conchitas, Plátanos	-34,78248	-58,17852
4	MACN	10380	2	Buenos Aires	Arroyo La Corbata, Los Talas	-34,90427	-57,79613
5	MACN	11747	1	Buenos Aires	Los Talas	-34,90427	-57,79613
6	MACN	19124	3	Entre Ríos	Arroyo del Sauce	-31,30305	-59,92861
7	MACN	31779	1	Buenos Aires	Arroyo del Gato, entre Tolosa y La Plata	-34,88030	-57,98436
8	MLP	2793	3	Buenos Aires	La Plata, Arroyo El Pescado, 20 km de La Plata hacia Magdalena	-34,95999	-57,77715
9	MLP	3697	1	Santa Fe	Isla Bieri, 20 Km al sur de Puerto Malabrigo	-29,68526	-59,61282
10	MLP	3709	7	Santa Fe	Romang, Arroyo Malabrigo	-29,46403	-59,73795
11	MLP	6124	5	Entre Ríos	Gualeguay, Río Gualeguay	-33,15375	-59,29218
12	MLP	6238	7	Entre Ríos	Entre Concepción del Uruguay y Colón, Arroyo Urquiza	-32,33942	-58,26179
13	MLP	6242	2	Entre Ríos	Nogoyá, Arroyo Nogoyá	-32,39503	-59,76312
14	MLP	6246	1	Buenos Aires	La Plata	-34,91985	-58,01258
15	MLP	6250	6	Santa Fe	Romang	-29,50222	-59,75165
16	MLP	6259	6	Entre Ríos	Río Gualeguay	-33,22187	-59,44342
17	MLP	6353	1	Entre Ríos	Rosario del Tala, Río Gualeguay	-32,30977	-59,07581
18	MLP	6369	4	Entre Ríos	Nogoyá, Arroyo Nogoyá	-32,39503	-59,76312
19	MLP	8469	3	Buenops Aires	Buenos Aires, Capital Federal, Lago de Palermo	-34,57036	-58,41649
20	MLP	11791	3	Buenos Aires	Magdalena, Arroyo Juan Blanco	-35,10403	-57,43639
<b>TOTAL</b>			<b>63</b>				

## 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE DIPODON DELODONTUS

**TABLA 5.7.2** Clasificación espacial de las localidades de los 20 lotes de *D. delodontus* de Argentina.



PUNTO	CLASE 1 SISTEMAS DE CUENCAS	CLASE 2 (BONETTO, 1960)	CLASE 3 (NÚÑEZ ET AL. 2010)
1	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Inferior y Río de la Plata
2	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Inferior y Río de la Plata
3	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Inferior y Río de la Plata
4	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Inferior y Río de la Plata
5	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Inferior y Río de la Plata
6	Río Paraná	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Medio
7	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Inferior y Río de la Plata
8	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Inferior y Río de la Plata
9	Río Paraná	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Medio
10	Río Paraná	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Medio
11	Río Paraná	Indefinido	Paraná Medio
12	Río Uruguay	Indefinido	Río Uruguay
13	Río Paraná	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Medio
14	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Inferior y Río de la Plata
15	Río Paraná	Paraguay y Paraná Medio e Inferior	Paraná Medio
16	Río Paraná	Indefinido	Paraná Medio
17	Río Paraná	Río Uruguay	Paraná Medio
18	Río Paraná	Río Uruguay	Paraná Medio
19	Indefinido	Indefinido	Paraná Inferior y Río de la Plata
20	Río de la Plata y Provincia de Buenos Aires hasta el Río Colorado	Indefinido	Paraná Inferior y Río de la Plata

# 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE DIPLODON DELODONTUS

**TABLA 5.7.3** Resultados del análisis de regresión (test de alometría) entre las coordenadas de Procrustes y el tamaño del centroide para los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina. SC= Suma de Cuadrados.

VARIABLE INDEPENDIENTE	VARIABLE DEPENDIENTE		TAMAÑO MUESTRA	
Tamaño del Centroide	Coordenadas de Procrustes 1-80		63	
SC TOTAL	SC PREDICHO	% PREDICHO	SC RESIDUAL	PROBABILIDAD
0,3324351	0,01615138	4,86%	0,31628372	0,0056

**TABLA 5.7.4** Varianza de las variables canónicas de cada clase para los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina, en el Análisis Canónico con el total de 61 Componentes Principales.

CLASE 1	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO
VC1	29,3897247	66,504	66,504
VC2	12,7925684	28,947	95,451
VC3	2,01043252	4,549	100
VC4	0	0	100
CLASE 2	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO
VC1	31,8595745	86,049	86,049
VC2	5,16527618	13,951	100
VC3	0	0	100
VC4	0	0	100
CLASE 3	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO
VC1	28,0120164	93,251	93,251
VC2	2,02741514	6,749	100
VC3	0	0	100

**TABLA 5.7.5** Distancias de Mahalanobis y su valor de probabilidad (p) entre las agrupaciones para el Análisis Canónico por clases, para los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina. En rojo se expresaron los valores de probabilidad menores que 0,05.

CLASE 1	INDEFINIDO	RÍO PARANÁ	RÍO URUGUAY
RÍO PARANÁ	17,938 p<0,0001		
RÍO URUGUAY	17,3827 p=0,0027	15,9576 p<0,0001	
RÍO DE LA PLATA y Provincia de Buenos Aires hasta el Río	17,5301 p=0,0001	7,01 p<0,0001	10,6131 p<0,0001
CLASE 2	INDEFINIDO	PARAGUAY Y PARANÁ MEDIO E INFERIOR	
PARAGUAY Y PARANÁ MEDIO E INFERIOR	9,5075 p<0,0001		
RÍO URUGUAY	18,7531 p<0,0001		11,8798 p<0,0001
CLASE 3	PARANÁ MEDIO	PARANÁ INFERIOR Y RÍO DE LA PLATA	
PARANÁ INFERIOR Y RÍO DE LA PLATA	7,0167 p<0,0001		
RÍO URUGUAY	15,9334 p<0,0001		10,1563 p<0,0001

## 5. MORFOMETRÍA Y DISTRIBUCIÓN DE *DIPLODON DELODONTUS*

**TABLA 5.7.6** Varianza de las variables canónicas de cada clase para los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina, en el Análisis Canónico con los primeros 7 Componentes Principales para la Clase 1, los primeros 5 Componentes Principales para la Clase 2 y los primeros 7 Componentes Principales para la Clase 3.

CLASE 1	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO
VC1	1,25	73,1	73,1
VC2	0,27	15,75	88,85
VC3	0,19	11,15	100
CLASE 2	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO
VC1	1,58	86,13	86,13
VC2	0,25	13,87	100
CLASE 3	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO
VC1	0,97	81,01	81,01
VC2	0,23	18,99	100

**TABLA 5.7.7** Resultados de la clasificación cruzada por clases para el conjunto del género *Diplodon* de Argentina.

CLASE 1	INDEFINIDO	RÍO DE LA PLATA	RÍO PARANÁ	RÍO URUGUAY	TOTAL	ERROR %
<i>Indefinido</i>	3	0	0	0	3	0
<i>Río de la Plata</i>	1	10	6	1	18	44,44
<i>Río Paraná</i>	1	6	26	2	35	25,71
<i>Río Uruguay</i>	0	1	0	6	7	14,29
<i>Total</i>	5	17	32	9	63	28,57
CLASE 2	INDEFINIDO	PARAGUAY Y PARANÁ	RÍO URUGUAY	TOTAL	ERROR %	
<i>Indefinido</i>	22	2	0	24	8,33	
<i>Paraguay y Paraná</i>	5	27	2	34	20,59	
<i>Río Uruguay</i>	0	1	4	5	20	
<i>Total</i>	27	30	6	63	15,87	
CLASE 3	PARANÁ MEDIO	PARANÁ Y RÍO DE LA PLATA	RÍO URUGUAY	TOTAL	ERROR %	
<i>Paraná Medio</i>	27	7	1	35	22,86	
<i>Paraná y Río de la Plata</i>	6	14	1	21	33,33	
<i>Río Uruguay</i>	1	0	6	7	14,29	
<i>Total</i>	34	21	8	63	25,4	

## ***CAPÍTULO 6***

# ***CONCLUSIONES DE LA TESIS***

## 6. CONCLUSIONES DE LA TESIS

De este Trabajo de Tesis Doctoral se pudieron extraer las siguientes conclusiones finales sobre la taxonomía del género *Diplodon*:

Si bien los estudios mostraron tendencias en la variación morfométrica dentro del género *Diplodon*, no se observaron diferencias en la morfología de la conchilla que permitan justificar la separación de las especies del género *Diplodon* en grupos distintos.

Los resultados de los análisis de morfometría geométrica deberán ser contrastados con otras evidencias como, por ejemplo, análisis moleculares. Además, se deberá completar el conocimiento sobre los gloquidios de las especies en las que este estadio no es conocido.

No fue posible contrastar la validez del subgénero *Diplodon (Australis)* debido a la escasez de individuos para su inclusión en los análisis.

Se sustentó la sinonimización de *D. piceus* con *D. rhuacoicus* propuesta por Graff & Cummings (2019).

Los resultados del análisis de morfometría geométrica no apoyaron la separación entre *D. chilensis* y *D. patagonicus*. Los ejemplares de ambos conjuntos deberán denominarse como *D. chilensis* (Gray, 1828) de acuerdo al Principio de Prioridad de la Nomenclatura Zoológica.

Los resultados apoyaron la sinonimización de *D. fortis* con *D. chilensis*.

Del trabajo realizado combinando técnicas de morfometría geométrica y moleculares, en ejemplares de *Diplodon* sp. del balneario El Retobado, arroyo Yuquerí, Entre Ríos, se extrajeron las siguientes conclusiones:

Se reconocieron cuatro especies: *Diplodon parallelipedon*, *D. wymanii*, *D. rhuacoicus* y *D. burroughianus*.

La separación entre *D. wymanii* y *D. rhuacoicus* no fue robusta, pudiendo tratarse de subespecies de la misma especie o de especies estrechamente cercanas.

El estudio de la distribución y de la morfometría geométrica de los ejemplares de *D. delodontus* de Argentina, permitió concluir lo siguiente:

Se identificaron tres morfotipos correspondientes a: 1) Río Uruguay, 2) Paraná Medio y 3) Paraná Inferior y Río de la Plata.

*Diplodon delodontus* se localiza en el Río Paraná y en el Río de la Plata. A su vez, *D. delodontus* incluyó una población ubicada en el Paraná Medio y otra distribuída en el Paraná Inferior y Río de la Plata.

Los resultados de este análisis no fueron robustos, por lo que deben ser contrastados con otras evidencias.

## **6. CONCLUSIONES DE LA TESIS**

Teniendo en cuenta las conclusiones enumeradas en esta sección, se realizaron afirmaciones sobre la metodología y se plantearon objetivos a futuro:

Es necesario un estudio filogeográfico que incluya toda la Cuenca del Plata.

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Tesis Doctoral son base para establecer el estado de conservación de *Diplodon delodontus* en la región.

Este Trabajo de Tesis Doctoral remarcó la importancia de la combinación de estudios morfológicos con datos de análisis moleculares para el estudio taxonómico de un grupo.

## *REFERENCIAS*

- Adam B (2010). L'Anodonte chinoise *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) (Mollusca, Bivalvia, Unionidae): une espèce introduite qui colonise le bassin Rhône-Méditerranée. *Journal Electronique de La Malacologie Continentale Française*, 6: 278-287. ISSN 1778-3941. Disponible en <https://www.journal-malaco.fr>.
- Aldrige DC (1999). The morphology, growth and reproduction of Unionidae (Bivalvia) in a fenland waterway. *Journal of Molluscan Studies*, 65: 47-60. <https://doi.org/10.1093/mollus/65.1.47>.
- Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers & DJ Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Alves T, P Lima, GMS Lima, MCC Cunha, S Ferreira, B Domingues & J Machado (2016). Phytoplankton composition of the water and gastrointestinal tract of the mussel *Diplodon enno* (Ortmann, 1921) from São Francisco river (Bahia, Brazil). *Brazilian Journal of Biology*, 76(2): 352-359. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.14514>.
- Amaral ABL, TVS Alves, M Lopes-Lima & J Machado (2007). A short-term comparative study on *Diplodon rhuacoicus* young adults shell growth under enriched São Francisco river water. *Thalassas*, 23(1): 33-38. ISSN 0212-5919.
- Amaro R, C Bouza, B Gómez, J Castro, E San Miguel, A Villalba, S Lois, A Outeiro & P Ondina (2016). Identification of novel gender-associated mitochondrial haplotypes in *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Zoological Journal of the Linnean Society*. <https://doi.org/10.1111/zoj.12472>.
- Archambault JM, WG Cope & TJ Kwak (2013). Burrowing, byssus, and biomarkers: behavioral and physiological indicators of sublethal thermal stress in freshwater mussels (Unionidae). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46(4): 229-250. <http://dx.doi.org/10.1080/10236244.2013.805891>.
- Avelar W & A Cunha (2009). The anatomy and functional morphology of *Diplodon rhombeus fontainianus* (Orbigny, 1835) (Mollusca Bivalvia, Hyriidae). *Brazilian Journal of Biology*, 69(4): 1153-1163. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842009000500021>.

- Baigun CRM (2001) Ecología pesquera de lagos y embalses patagónicos (Argentina). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3376\\_Baigun.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3376_Baigun.pdf).
- Bailey RC & RH Green (1988). Within-basin variation in the shell morphology and growth rate of a freshwater mussel. *Canadian Journal of Zoology*. <https://doi.org/10.1139/z88-246>.
- Baker SM & DJ Hornbach (1997). Acute physiological effects of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) infestation on two unionid mussels, *Actinonaias ligamentina* and *Amblema plicata*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54: 512-519. <https://doi.org/10.1139/cjfas-54-3-512>.
- Baker AM, C Bartlett, SE Bunn, K Goudkamp, F Sheldon & JM Hughes (2003). Cryptic species and morphological plasticity in long-lived bivalves (Unionoida: Hyriidae) from inland Australia. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01941.x>.
- Baker AM, F Sheldon, J Somerville, KF Walker & JM Hughes (2004). Mitochondrial DNA phylogenetic structuring suggests similarity between two morphologically plastic genera of Australian freshwater mussels (Unionoida: Hyriidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.02.017>.
- Balla SA & KF Walker (1991). Shape variation in the Australian freshwater mussel *Alathyria jacksoni* Iredale (Bivalvia, Hyriidae). *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/BF00006541>.
- Barnhart MC (2016). Buckets of muckets: A compact system for rearing juvenile freshwater mussels. *Aquaculture*, 254: 227-233. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.08.028>.
- Beauchamp KC, TW Beyett, MW Scott & DT Zanatta (2020). Detection of hybrid *Pyganodon grandis* and *P. lacustris* (Bivalvia: Unionidae) using F- and M-type mitochondrial DNA sequences and geometric morphometrics. *Journal of Molluscan Studies*, 86(3): 233-239. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyaa013>.
- Beyett, TW, K McNichols-O'Rourke, TJ Morris & DT Zanatta (2020). Use of morphometric analyses and DNA barcoding to distinguish *Truncilla donaciformis* and *Truncilla truncata* (Bivalvia: Unionidae). *Freshwater Mollusk Biology and Conservation*, 23(2): 99-108. <https://doi.org/10.31931/fmbc.v23i2.2020.99-108>.
- Bieler R, JG Carter & EV Coan (2010). Classification of Bivalve Families. Pp: 113-133. En: Bouchet P & JP Rocroi (2010). Nomenclator of Bivalve Families. *Malacologia*, 52(2): 1-184. ISSN: 0076-2997.
- Bogan AE (1993). Freshwater Bivalve Extinctions (Mollusca: Unionoida): A Search for Causes. *American Zoologist*, 33: 599-609. <https://doi.org/10.1093/icb/33.6.599>.

## REFERENCIAS

- Bogan AE (2008). Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9011-7>.
- Bogan AE & WR Hoeh (2000). On becoming cemented: evolutionary relationships among the genera in the freshwater bivalve family Etheriidae (Bivalvia: Unionoida). *Geological Society, London, Special Publications*. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2000.177.01.09>.
- Bogan AE & KJ Roe (2008). Freshwater bivalve (Unioniformes) diversity, systematics, and evolution: status and future directions. *Journal of the North American Benthological Society*. <https://doi.org/10.1899/07-069.1>.
- Bonetto AA (1954). Náyades del río Paraná - el género *Diplodon* en el biotopo isleño del Paraná medio e inferior. Secretaría de Agricultura, Ganadería e Industrias - Publicación Técnica, Santa Fé.
- Bonetto AA (1960). Acerca de la distribución geográfica de las náyades en la República Argentina. *Physis*, 22(63): 259-268.
- Bonetto AA (1961). Investigaciones acerca de las formas larvales en el género *Diplodon* y su aplicación a los estudios sistemáticos. *Dirección de Recursos Naturales. Santa Fe, Argentina*.
- Bonetto AA (1965). Las especies del género *Diplodon* en el sistema hidrográfico del Río de la Plata. *Anais do Segundo Congresso Latino-Americano de Zoologia* (2): 37-54.
- Bonetto AA & DH Di Persia (1975). Las poblaciones de pelecípodos del arroyo Ayuí Grande (prov. Entre Ríos) y los factores que regulan su distribución y estructura. *ECOSUR*, 2(3): 123-151.
- Bonetto AA & I Ezcurra (1963). Estudio comparado de las formas larvales de Mutelidae Ortmann y su significación sistemática y zoogeográfica (Mollusca, Pelecypoda). *Anais do Segundo Congresso Latino-Americano de Zoologia* (2): 55-71.
- Bonetto AA, MP Tassara & A Rumi (1986). *Australis n. subgen. de Diplodon* Spix (Bivalvia, Unionacea) y posibles relaciones con Hyriidae australianos. En *Boletín de la Sociedad Biológica Concepción, Chile*, 57.
- Bookstein F (1991). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, Cambridge (UK); New York. <https://doi.org/10.1002/bimj.4710350416>.
- Breton S, DT Stewart, S Shephardson, RJ Trdan, AE Bogan, EG Chapman, AJ Ruminas, H Piontkivska & WR Hoeh (2011). Novel protein genes in animal mtDNA: A new sex determination system in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida)? *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq345>.
- Buddensiek V (1995). The culture of juvenile freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. in cages: a contribution to conservation programmes and the knowledge of habitat requirements. *Biological Conservation*, 74: 33-40. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00012-S](https://doi.org/10.1016/0006-3207(95)00012-S).
- Buhay JE, JM Serb, CR Dean, Q Parham & C Lydeard (2002). Conservation genetics of two endangered unionid bivalve species, *Epioblasma florentina walkeri* and *E. capsaeformis* (Unionidae: Lampsilini). *Journal of Molluscan Studies*, 68(1): 385-391. <https://doi.org/10.1093/mollus/68.4.385>.
- Burdick RC & MM White (2007). Phylogeography of the Wabash pigtoe, *Fusconaia flava* (Rafinesque, 1820) (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Molluscan Studies*. <https://doi.org/10.1093/mollus/eym033>.
- Burzyński A, M Soroka, M Mioduchowska, A Kaczmarczyk & J Sell (2017). The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of *Unio crassus*: Mitochondrial molecular clock and the overconfidence of molecular dating. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.007>.
- Busse K (1970). Nuevo método para medir flujos de agua producidos por organismos filtradores. Medición experimental en *Diplodon chilensis* (Gray, 1854) (Mollusca, Lamellibranchiata). *Noticiario Mensual del Museo de Historia Natural, Santiago, Chile*, 14(172). Disponible en: [http://publicaciones.mnhn.gob.cl/668/articles-66144\\_archivo\\_01.pdf](http://publicaciones.mnhn.gob.cl/668/articles-66144_archivo_01.pdf).
- Byllaardt JV & JD Ackerman (2014). Hydrodynamic habitat influences suspension feeding by unionid mussels in freshwater ecosystems *Freshwater Biology*, 59, 1187-1196. <https://doi:10.1111/fwb.12339>.

C

- Campbell DC, JM Serb, JE Buhay, KJ Roe, RL Minton & C Lydeard (2005). Phylogeny of North American amblemines (Bivalvia, Unionoida): Prodigious polyphyly proves pervasive across genera. *Invertebrate Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2005.00015.x>.
- Cano-Otalvaro LJ, OE Murrillo-García, JR Cantera-Kintz & DL Gil-Agudelo (2012). Diferenciación morfológica de las especies de piangua *Anadara tuberculosa* y *Anadara similis* (arcidae) en diferentes bosques de manglar a lo largo de la costa pacífica colombiana mediante morfometría geométrica. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 41(1): 47-60. ISSN 0122-9761.
- Carella F, G Villari, N Maio & G De Vico (2016). Disease and Disorders of Freshwater Unionid Mussels: A Brief Overview of Recent Studies. *Frontiers in Physiology*, 7: 489. <https://doi:10.3389/fphys.2016.00489>.

## REFERENCIAS

- Castellanos ZA (1960). Almejas nacaríferas de la República Argentina del género *Diplodon* (Moll. Mutélidos). Secretaria Estado Agrícola y Ganadería de la Nación. Publicación miscelánea, 421: 1-40.
- Cavalcanti M, L Monteiro & P Lopes (1999). Landmark-based morphometric analysis in selected species of serranid fishes (Perciformes: Teleostei). *Zoological Studies*, 38: 287-294. Disponible en: <http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/38.3/287.pdf>.
- Chong JP, JC Brim Box, JK Howard, D Wolf, TL Myers & KE Mock (2008). Three deeply divided lineages of the freshwater mussel genus *Anodonta* in western North America. *Conservation Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9485-x>.
- Combosch DJ, TM Collins, EA Glover, DL Graf, EM Harper, JM Healy *et al.* (2016). A family-level Tree of Life for bivalves based on a Sanger-sequencing approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.11.003>.
- Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata (2019). Disponible en: <http://cicplata.org>. Visitada en enero de 2020.
- CONAE Programa 2Mp (2020). Cuencas Hidrográficas de la Subsecretaría de Recursos Hídricos. Disponible en: <https://2mp.conae.gov.ar/index.php/materiales-educativos/material-educativo/coberturas-vectoriales/417-cuencas-hidrograficas-subsecretaria-de-recursos-hidricos>.
- Conrad TA (1836). Monography of the Family Unionidae, or naiades of Lamarck (fresh water bivalve shells) of North America. Philadelphia: J. Dobson. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.11200>.
- Cooke B & CE Terhune (2015). Form, Function, and Geometric Morphometrics. *The Anatomical Record*, 298: 5-28. <https://doi.org/10.1002/ar.23065>.
- Cummings KS & DL Graf DL (2015). Class Bivalvia. En: Damborenea C *et al.* (Editores) Thorp & Covich's Freshwater Invertebrates (Fourth Edition). ISBN: 9780128042250.
- Curole JP (2004). Universal primers for the specific amplification of the male mitotype of the Unionoidea (Bivalvia). *Conservation Genetics*, 5(1989): 733-735. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-1852-2>.
- Cyr H, KJ Collier, JS Clearwater, BJ Hicks & SD Stewart (2017). Feeding and nutrient excretion of the New Zealand freshwater mussel *Echyridella menziesii* (Hyriidae, Unionida): implications for nearshore nutrient budgets in lakes and reservoirs. *Aquatic Sciences*, 79: 557-571. <https://doi.org/10.1007/s00027-016-0517-9>.

## D

- Darrigran GA, SM Martin, B Gullo & L Armendariz (1998). Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. *Hydrobiologia*, 367: 223-230.
- Di Rienzo JA, F Casanoves, MG Balzarini, L Gonzalez, M Tablada & CW Robledo (2019). InfoStat versión 2019. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>.
- Doering PH & CA Oviatt (1986). Application of filtration rate models to field populations of bivalves: an assessment using experimental mesocosms. *Marine Ecology-progress series*, 31: 265-275. Disponible en: <https://www.int-res.com/articles/meps/31/m031p265.pdf>.
- D'Orbigny AD (1835). Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, in suo per American meridionalem itinere, ab A. D'Orbigny, collectorum. *Magasin de Zoologie*, 6: 61-62. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/2633132>.
- Doucet-Beaupré H, S Breton, EG Chapman, PU Blier, AE Bogan, DT Stewart & WR Hoeh (2010). Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): Searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-50>.
- Doucet-Beaupré H, PU Blier, EG Chapman, H Piontkivska, F Dufresne, Sietman BE *et al.* (2012). *Pyganodon* (Bivalvia: Unionida: Unionidae) phylogenetics: A male- and female-transmitted mitochondrial DNA perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.01.017>.

## E

- Echem RT, DP Piñero & A-AO Joaquina (2016). Characterization of freshwater mussel species, *Margaritifera margaritifera* Linnaeus 1758 using outline-based geometric morphometric analysis. *International Journal of Information Research and Review*, 3(10): 2916-2925.
- Encyclopedia of Life. Disponible en: <http://eol.org>. Visitada en marzo de 2020.
- Eversole AG, KR Stuart & DE Brune (2008). Effect of temperature and phytoplankton concentration of Partitioned Aquaculture System water on freshwater mussel filtration. *Aquaculture Research*, 39: 1691-1696. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02043.x>.

- Falfushynska HI, LL Gnatyshyna, OY Osadchuk, A Farkas, A Vehovszky, DO. Carpenter *et al.* (2014). Diversity of the molecular responses to separate wastewater effluents in freshwater mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology, C* (164): 51-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.04.007>.
- Fassatoui C, Jenhani ABR & Romdhane MS (2015). Geographic pattern of shell morphology in the endemic freshwater mussel *Unio ravoisieri* (Bivalvia: Unionidae) from northern Tunisia. *Journal of Molluscan Studies*. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyu069>.
- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Folmer O, M Black, W Hoeh, R Lutz & R Vrijenhoek (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299. PMID 7881515.
- Fonseca MM, M Lopes-Lima, MS Eackles, TL King & E Froufe (2016) The female and male mitochondrial genomes of *Unio delphinus* and the phylogeny of freshwater mussels (Bivalvia: Unionida), *Mitochondrial DNA*, B1(1): 954-957. <https://doi.org/10.1080/23802359.2016.1241677>.
- Freshwater Animal Diversity Assessment (FADA) (2020). Disponible en: <http://fada.biodiversity.be/>. Visitada en marzo de 2020.
- Froufe E, C Sobral, A Teixeira, R Sousa, S Varandas, DC Aldridge & M Lopes-Lima (2014). Genetic diversity of the pan-European freshwater mussel *Anodonta anatina* (Bivalvia: Unionoida) based on CO1: New phylogenetic insights and implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. <https://doi.org/10.1002/aqc.2456>.
- Froufe E, HM Gan, YP Lee, J Carneiro, S Varandas, A Teixeira A, *et al.* (2016). The male and female complete mitochondrial genome sequences of the Endangered freshwater mussel *Potomida littoralis* (Cuvier, 1798) (Bivalvia: Unionidae). *Mitochondrial DNA*. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1074223>.
- Fuentealba C, R Figueroa, F González & M Palma (2010). Variabilidad genética local del bivalvo dulceacuícola *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) proveniente de tres lagos Nahuelbutanos. *Gayana*, 74(2): 113-124. ISSN 0037- 8607.

- Ganser AM, TJ Newton & RJ Haro (2015). Effects of elevated water temperature on physiological responses in adult freshwater mussels. *Freshwater Biology*, 60: 1705-1716. <https://doi.org/10.1111/fwb.12603>.
- Giribet G & WC Wheeler (2002). On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and ADN sequence data. *American Microscopical Society, Inc.*, 121(4): 271-324. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2002.tb00132.x>.
- Glasel J (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260/280 absorbance ratios. *BioTechniques*, 18(1): 62-63. PMID 7702855.
- Graf DL (2002). Molecular phylogenetic analysis of two problematic freshwater mussel genera (*Unio* and *Gonidea*) and a re-evaluation of the classification of Nearctic Unionidae (Bivalvia: Palaeoheterodonta: Unionoida). *Journal of Molluscan Studies*, 68: 65-71. <https://doi.org/10.1093/mollus/68.1.65>.
- Graf DL (2013). Patterns of Freshwater Bivalve Global Diversity and the State of Phylogenetic Studies on the Unionoida, Sphaeriidae, and Cyrenidae. *American Malacological Bulletin*. <https://doi.org/10.4003/006.031.0106>.
- Graf DL & KS Cummings (2006). Palaeoheterodont diversity (Mollusca: Trigonioidea + Unionoida): What we know and what we wish we knew about freshwater mussel evolution. *Zoological Journal of the Linnean Society*. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2006.00259.x>.
- Graf DL & KS Cummings (2007). Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida). *Journal of Molluscan Studies*, 73(4): 291-314. <https://doi.org/10.1093/mollus/eym029>.
- Graf DL & KS Cummings (2019). The Freshwater Mussels (Unionoida) of the World (and other less consequential bivalves). MUSSEL Project Web Site, <http://www.mussel-project.net/>. Visitada en marzo de 2020.
- Graf DL & O'Foighil (2000). Molecular phylogenetic analysis of 28S rDNA supports a gondwanan origin for Australasian Hyriidae. *Vie et Milieu*, 50(4): 245-254.
- Graf DL, H Jones, AJ Geneva, JM Pfeiffer & MW Klunzinger (2015). Molecular phylogenetic analysis supports a Gondwanan origin of the Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionida) and the paraphyly of Australasian taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.01.012>.

## REFERENCIAS

Grandon M, JA Barros & RR González (2012). Caracterización metabólica de *Diplodon chilensis* (Gray, 1828) (Bivalvia: Hyriidae) expuesto a anoxia experimental. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 43(3): 531-537. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572008000300012>.

H

Haas F (1930). Versuch einer kritischen Sichtung der sudamerikanischen Najaden, hauptsächlich an Hand der Sammlung des Senckenberg-Museums I. *Senckenbergiana*, 12: 175-195.

Haas F (1969). Superfamilia Unionacea. En: Martens R, W Hennig & H Wermuth (Eds). *Das Tierreich, Lieferung - vol 88*. Walter de Gruyter and Co., Berlin.

Hartmann JT, S Beggel, K Auerswald, BC. Stoeckle & J Geist (2016). Establishing mussel behavior as a biomarker in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 170: 279-288. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.06.014>

Hickey CW, DS Roper & SJ Buckland (1995). Metal concentrations of resident and transplanted freshwater mussels *Hyridella menziesi* (Unionacea: Hyriidae) and sediments in the Waikato River, New Zealand. *The Science of the Total Environment*, 175: 163-177. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(95\)04722-0](https://doi.org/10.1016/0048-9697(95)04722-0).

Hoeh WR, DT Stewart, BW Sutherland & E Zouros (1996). Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). *Evolution*, 50(6): 2276-2286. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb03616.x>.

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). <https://doi.org/10.1554/0014-3820>.

Hua D, RJ Neves & Y Jiao (2013). Effects of algal density, water flow and substrate type on culturing juveniles of the rainbow mussel (*Villosa iris*) (Bivalvia: Unionidae) in a laboratory recirculating system. *Aquaculture*, 416-417: 367-373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.09.002>.

Huang XC, J Rong, Y Liu, MH Zhang, Y Wan, S Ouyang *et al.* (2013). The complete maternally and paternally inherited mitochondrial genomes of the endangered freshwater mussel *Solenia carinatus* (Bivalvia: Unionidae) and implications for unionidae taxonomy. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084352>.

Huff SW, D Campbell, DL Gustafson, C Lydeard, CR Altaba & G Giribet (2004). Investigations into the phylogenetic relationships of freshwater pearl mussels (Bivalvia: Margaritiferidae) based on molecular data: implications for their taxonomy and biogeography. *Journal of Molluscan Studies*, 70(4): 379-388. <https://doi.org/10.1093/mollus/70.4.379>.

Hughes J, AM Baker, C Bartlett, S Bunn, K Goudkamp & J Somerville (2004). Past and present patterns of connectivity among populations of four cryptic species of freshwater mussels *Velesunio* spp. (Hyriidae) in central Australia. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02305.x>.

I

Inoue K., AL McQueen, JL Harris & DJ Berg (2014). Molecular phylogenetics and morphological variation reveal recent speciation in freshwater mussels of the genera *Arcidens* and *Arkansia* (Bivalvia: Unionidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 112(3): 535-545. <https://doi.org/10.1111/bj.12282>.

Integrated Taxonomic Information System (ITIS) on-line database (2020). Disponible en: <http://www.itis.gov>. Visitada en marzo de 2020.

IUCN (2020). International Union for Conservation of Nature's Red List of Threatened Species. Version 2019-3. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org>. Visitada en mayo 2020.

J

Jaramillo NO (2011). Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo. En Chávez *et al.* (Editores): *Fronteras de investigación en enfermedades infecciosas. Modelo enfermedad de Chagas*. Universidad de Antioquia, 69-87. ISBN 0000099780002.

Jeratthitikul E, S Phuangphong, C Sutcharit, P Prasankok, B Kongim & S Panha (2019). Integrative taxonomy reveals phenotypic plasticity in the freshwater mussel *Conradens conradens* (Bivalvia: Unionidae) in Thailand, with a description of a new species. *Systematics and Biodiversity*, 17(2): 134-147. <https://doi.org/10.1080/14772000.2018.1554607>.

- Keogh SM & AM Simons (2019). Molecules and morphology reveal 'new' widespread North American freshwater mussel species (Bivalvia: Unionidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 138: 182-192. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.05.029>.
- Kim BH, JH Lee & SJ Hwang (2011). Inter- and intra-specific differences in filtering activities between two unionids, *Anodonta woodiana* and *Unio douglasiae*, in ambient eutrophic lake waters. *Ecological Engineering*, 37: 1957-1967. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.08.008>.
- King TL, MS Eackles, B Gjetvaj & WR Hoeh (1999). Intraspecific phylogeography of *Lasmigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. *Molecular Ecology*, 8: S65-S78. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1999.00784.x>.
- Klingenberg CP (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357. Disponible en: [https://morphometrics.uk/MorphoJ\\_page.html](https://morphometrics.uk/MorphoJ_page.html).
- Klingenberg CP (2016). Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution*, 226: 113-137. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0539-2>.
- Konopleva ES, IN Bolotov, IV Vikhrev, MY Gofarov & AV Kondakov (2016). An integrative approach underscores the taxonomic status of *Lamellidens exolecens*, a freshwater mussel from the Oriental tropics (Bivalvia: Unionidae). *Systematics and Biodiversity*: 1-14. <http://dx.doi.org/10.1080/14772000.2016.1249530>.
- Kováts N, NA Abdel-Hameid, K. Kovács & G. Paulovits (2010). Sensitivity of three unionid glochidia to elevated levels of copper, zinc and lead. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 399(4). <https://doi.org/10.1051/kmae/2010028>.
- Kovitvadhí S, U Kovitvadhí, P Sawangwong & J Machado (2008). A laboratory-scale recirculating aquaculture system for juveniles of freshwater pearl mussel *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856). *Aquaculture* 275:169-177. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.029>.
- Krebs RA, Allen BD, Evans NM & Zanatta DT (2015). Mitochondrial DNA Structure of *Pyganodon grandis* (Bivalvia: Unionidae) from the Lake Erie Watershed and Selected Locations in its Northern Distribution. *American Malacological Bulletin*. <https://doi.org/10.4003/006.033.0105>.
- Kryger J & HU Riisgard (1988). Filtration rate capacities in 6 species of European freshwater bivalves. *Oecologia*, 77: 34-38. <https://doi.org/10.1007/BF00380921>.
- Kumar S, G Stecher & K Tamura (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

- Lamarck JBM (1819). Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. Tome sixième, 1re partie. Paris: published by the Author, VI: 343 pp. Disponible en: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/47441>.
- Lara G, A Contreras & F Encina (2002a). La almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae) potencial biofiltro para disminuir los niveles de coliformes en pozos. Experimento de laboratorio. *Gayana*, 66(2): 113-118. ISSN 0717-652X.
- Lara G, E Parada & S Peredo (2002b). Alimentación y conducta alimentaria de la almeja de agua dulce *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae). *Gayana*, 66(2): 107-112. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382002000200004>.
- Lea I (1834). Observations on the naiades; and descriptions of new species of that, and other families. *Transactions of the American Philosophical Society* (NS), 5: 23-119. Disponible en: <http://biodiversitylibrary.org/page/35957690>
- Lea I (1860). Descriptions of exotic Unionidæ [Exotic Unionidæ]. *Journal of the Academy of Natural Sciences* 4 [O. 7]: 235-273, pls. 33-45 (Obs. 7, part 2: 53-91). Disponible en: <http://biodiversitylibrary.org/page/12671441>.
- Loayza-Muro R & R Elias-Letts (2007). Responses of the mussel *Anodontites trapesialis* (Unionidae) to environmental stressors: Effect of pH, temperature and metals on filtration rate. *Environmental Pollution*, 149: 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.003>.
- López HL, CC Morgan & MJ Montenegro (2002). Ichthyological Ecoregions of Argentina. ProBiota, Serie Documentos n° 1. ISSN 1666-7328. Disponible en: [www.vidasilvestre.org.ar](http://www.vidasilvestre.org.ar).
- Lopez HL & AM Michelarena (2005). Biogeografía de los peces continentales de la Argentina. En: JL Bousquets & JJ Morrone (Editores). Primeras Jornadas Biogeográficas de la Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática (RIBES XIII-CYTED). Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.: 509-550. Disponible en <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/50703>.
- López Van Oosterom MV, CS Ocón, F Brancolini, ME Maroñas, ED Sendra & A Rodrigues Capítulo (2013). Trophic relationships between macroinvertebrates and fish in a pampean lowland stream (Argentina). *Iheringia*, 103(1): 57-65. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212013000100009>.

## REFERENCIAS

Lurman GJ, J Walter & HH Hoppeler (2014). The effect of seasonal temperature variation on behavior and metabolism in the freshwater mussel (*Unio tumidus*). *Journal of Thermal Biology*, 43: 13-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2014.04.005>.

M

Machordom A, R Araujo, C Toledo, E Zouros & ED Ladoukakis (2015). Female-dependent transmission of paternal mtDNA is a shared feature of bivalve species with doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. <https://doi.org/10.1111/jzs.12096>.

Mansur, MCD (1996). *Diplodon pfeifferi*. The IUCN Red List of Threatened Species 1996: e.T6634A12791749. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T6634A12791749.en>.

Mansur MCD (1999). Gloquídio de *Diplodon martensi* (Ihering, 1893) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) e seu ciclo parasitário. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(2): 185-194. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751999000600019>.

Marshall WB (1917). New and little-known species of South American fresh-water mussels of the genus *Diplodon*. *Proceedings of the United States National Museum*, 53(2209): 381-388. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.53-2209.381>.

Marshall BA, MC Fenwick & PA Ritchie (2014). New Zealand Recent Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionida). *Molluscan Research*. <https://doi.org/10.1080/13235818.2014.889591>.

Mcelwain A & SA Bullard (2014). Histological Atlas of Freshwater Mussels (Bivalvia, Unionidae): *Villosa nebulosa* (Ambleminae: Lampsilini), *Fusconaia cerina* (Ambleminae: Pleurobemini) and *Strophitus connasaugaensis* (Unioninae: Anodontini). *Malacologia*, 57(1): 99-239. <https://doi.org/10.4002/040.057.0104>.

Milani L, F Ghiselli, M Iannello & M Passamonti (2014). Evidence for somatic transcription of male-transmitted mitochondrial genome in the DUI species *Ruditapes philippinarum* (Bivalvia: Veneridae). *Current Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0420-7>.

Mitteroecker P, P Gunz, S Windhager & K Schaefer (2013). A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1): 59-66. <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-6369>.

Miyahira IC (2017). Freshwater mussels from South America: state of the art of Unionida, specially Rhipidodontini. *Biota Neotropica*, 17(4): e20170341. <http://dx.doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0341>.

Miyahira IC, CMD Mansur & S Barbosa dos Santos (2013). Revision of the type specimens of *Diplodon ellipticus* and *Diplodon expansus* (Bivalvia, Unionida, Hyriidae). *Spixiana*, 36(2): 173-182. ISSN 0341-8391.

Miyahira IC, CMD Mansur & S Barbosa dos Santos (2019). Redescription of *Diplodon ellipticus* Spix in Wagner, 1827, *Diplodon multistriatus* (Lea, 1831), and *Rhipidodonta garbei* (Ihering, 1910) (Bivalvia: Hyriidae) from coastal rivers of eastern and northeastern Brazil. *Archiv für Molluskenkunde*, 148(1): 9-34. <https://doi.org/10.1127/arch.moll/148/009-034>.

Mock KE, JC Brim Box, JP Chong, JK Howard, DA Nez, D Wolf & RS Gardner (2010). Genetic structuring in the freshwater mussel *Anodonta* corresponds with major hydrologic basins in the western United States. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04468.x>.

Modesto V, M Ilarri, AT Souza, M Lopes-Lima, K Douda, M Clavero & R Sousa (2018). Fish and mussels: Importance of fish for freshwater mussel conservation. *Fish and Fisheries*, 19: 244-259. <https://doi.org/10.1111/faf.12252>.

MolluscaBase eds. (2020). MolluscaBase. Disponible en: <http://www.molluscabase.org>. Visitado en octubre de 2020.

Morais P, Rufino MM, Reis J, Dias E & Sousa R (2014). Assessing the morphological variability of *Unio delphinus* Spengler, 1783 (Bivalvia: Unionidae) using geometric morphometry. *Journal of Molluscan Studies*. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyt037>.

Morris TJ & LD Corkum (1999). Unionid growth patterns in rivers of differing riparian vegetation. *Freshwater Biology*, 42: 59-68. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1999.00468.x>.

N

National Center for Biotechnology Information Search database (2020). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Visitada en febrero de 2020.

National Human Genome Research Institute (2020). Disponible en: <https://www.genome.gov>. Visitado en marzo de 2020.

Nobles T & Y Zhang (2015). Survival, Growth and Condition of Freshwater Mussels: Effects of Municipal Wastewater Effluent. *PLoS ONE*, 10(6): e0128488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128488>.

Núñez V, DE Gutiérrez Gregoric & A Rumi (2010). Freshwater gastropod provinces from Argentina. *MALACOLOGIA*, 53(1): 47-60. <https://doi.org/10.4002/040.053.0103>.

## REFERENCIAS

O

Ortmann AE (1921). South American naiades, a contribution to the knowledge of the fresh-water mussels of South America. *Memories of the Carnegie Museum*, 8(3): 451-670. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/52447489>.

P

Palacios R, M Flores & K Palacios-Flores (2013). DNA Amplification In Vivo. En: Maloy S & K Hughes (Eds.). *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*: 341-343. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00057-7>.

Parada E & Peredo S (2002). Estado actual de la taxonomía de bivalvos dulceacuicolas chilenos: progresos y conflictos. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75: 691-701. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2002000400005>.

Parada E & Peredo S (2008). *Diplodon patagonicus* (Bivalvia: Hyriidae): ser o no ser. *Gayana*, 72(2): 266-267. ISSN 0717-652X.

Parker BC, MA Patterson & RJ Neves (1998). Feeding interactions between native freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the Ohio River. *American Malacological Bulletin*, 14(2): 173-179. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/45941208>.

Paródiz JJ (1968). Annotated catalogue of the genus *Diplodon*. *Sterkiana*, 30: 1-22.

Paródiz JJ (1973). The species complex *Diplodon delodontus* (Lamarck) (Unionacea - Hiriidae). *Malacologia*, 41: 247-270.

Parodiz JJ & AA Bonetto (1963). Taxonomy and Zoogeographic relationships of the south american naiades (Pelecypoda: Unionacea and Mutelacea). *Malacologia*, 1(2): 179-213. Disponible en <https://www.biodiversitylibrary.org/page/13128610#page/201/mode/1up>.

Passamonti M & F Ghiselli (2009). Doubly Uniparental Inheritance: Two Mitochondrial Genomes, One Precious Model for Organelle DNA Inheritance and Evolution. *DNA and Cell Biology*, 28(2): 79-89. <https://doi.org/10.1089/dna.2008.0807>.

Peredo S, E Parada, I Valdebenito & M Peredo (2006). Effect of aerial exposure on physiological condition and survival of *Diplodon chilensis* (Bivalvia: Hyriidae) during translocation. *MALACOLOGIA*, 49(1): 217-221. <https://doi.org/10.4002/1543-8120-49.1.217>.

Pereira D, MCD Mansur, LDS Duarte, AS de Oliveira, DM Pimpão, C Callil et al. (2014). Bivalve distribution in hydrographic regions in South America: Historical overview and conservation. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1639-x>.

Perez SI, V Bernal & PN Gonzalez (2006). Differences between sliding semi-landmark methods in geometric morphometrics, with an application to human craniofacial and dental variation. *Journal of Anatomy*, 208: 769-784. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00576.x>.

Pfeiffer JM & DL Graf (2015). Evolution of bilaterally asymmetrical larvae in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida: Unionidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. <https://doi.org/10.1111/zoi.12282>.

Philippi RA (1869). Bemerkungen über die chilenischen Unionen. *Malakozoologische Blätter*, 16: 43-49. Disponible en: [https://www.zobodat.at/pdf/Malakozoologische-Blätter\\_16\\_0043-0049.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Malakozoologische-Blätter_16_0043-0049.pdf).

Pimpão DM, MCD Mansur, PEA Bergonci & CR Beasley (2012). Comparative Morphometry and Morphology of Glochidial Shells of Amazonian Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionida). *American Malacological Bulletin*. <https://doi.org/10.4003/006.030.0106>.

Playford TJ & KF Walker (2008). Status of the endangered Glenelg River Mussel *Hyridella glenelgensis* (Unionoida: Hyriidae) in Australia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. <https://doi.org/10.1002/aqc.877>.

Q

QGIS Development Team (2019). QGIS 3.8 Zanzibar. Disponible en: <https://qgis.org/es/site>.

Quintana Cardona J, A Tarruella & C Beguiristain de-Vos (2013). Catálogo actualizado de los bivalvos continentales conservados en el Ateneo Científico, Literario y Artístico de Mahón (Menorca, Islas Baleares). *Spira*, 5(1-2): 5-13.

R

Reis J, A Machordom & R Araujo (2013). Morphological and molecular diversity of Unionidae (Mollusca, Bivalvia) from Portugal. *Graellsia*, 69(1): 7-16. <https://doi.org/10.3989/graelisia.2013.v69.071>.

## REFERENCIAS

- Riisgard HU (2001). On measurement of filtration rates in bivalves – the stony road to reliable data: review and interpretation. *Marine Ecology Progress Series*, 211: 275–291. <https://doi.org/10.3354/meps211275>.
- Rohlf FJ (2017a). tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.31. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. Disponible en: <https://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>.
- Rohlf FJ (2017b). tpsRelw, relative warps analysis, version 1.69. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. Disponible en: <https://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>.
- Rocchetta I, BJ Lomovasky, MS Yusseppone, SE Sabatini, F Bieczynski, MC Ríos de Molina & CM Luquet (2014). Growth, abundance, morphometric and metabolic parameters of three populations of *Diplodon chilensis* subject to different levels of natural and anthropogenic organic matter input in a glacial lake of North Patagonia. *Limnologia*, 44: 72–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.limno.2013.06.004>.
- Rodrigues VGS, A Fujikawa, DMS Abessa, MA Hortellani, JES Sarkis & JB Sígolo (2012). Uso do bivalve límnico *Anodontites tenebricosus* (Lea, 1834) no biomonitoramento de metais do Rio Ribeira de Iguape. *Química Nova*, 35(3): 454–459. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000300003>.
- Roper DS & CW Hickey (1994). Population structure, shell morphology, age and condition of the freshwater mussel *Hyridella menziesi* (Unionacea: Hyriidae) from seven lake and river sites in the Waikato River system. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/BF00006690>.
- Rumi A, DE Gutiérrez Gregoric, V Núñez & GA. Darrigran (2008). Malacología Latinoamericana. Moluscos de agua dulce de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 56(1): 77–111. ISSN-0034-7744.

S

- Sabatini SE, I Rocchetta, DE Nahabedian, CM Luquet, MR Eppis, L Bianchi & MC Ríos de Molina (2011a). Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the freshwater bivalve *Diplodon chilensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, C(154): 391–398. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.07.009>.
- Sabatini SE, I Rocchetta, CM Luquet, MI Guido & MC Ríos de Molina (2011b). Effects of sewage pollution and bacterial load on growth and oxidative balance in the freshwater mussel *Diplodon chilensis*. *Limnologia*, 41: 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2011.04.004>.
- Sabatini SE, BM Brena, CM Luquet, M San Julián, M Pirez & MC Ríos de Molina (2011c). Microcystin accumulation and antioxidant responses in the freshwater clam *Diplodon chilensis patagonicus* upon subchronic exposure to toxic *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.012>.
- Saitou N & M Nei (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Santos-Neto GC, CR Beasley, H Schneider, DM Pimpão, WR Hoeh, LRL Simone & CH Tagliaro (2016). Genetic relationships among freshwater mussel species from fifteen Amazonian rivers and inferences on the evolution of the Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.04.013>.
- Santos-Neto GC, ISS Nunes, CR Beasley, ARB Silva, CP Gomes & CH Tagliaro (2018). Evolution in action: allopatry, variable diversity and a stepping-stone model of migration among populations of the freshwater bivalve *Triplodon corrugatus* from the north-eastern Amazon. *Hydrobiologia*. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3323-z>.
- Scott MW, MT Begley, RA Krebs & DT Zanatta (2014). Mitochondrial DNA Variation in the Eastern Pondmussel, *Ligumia nasuta* (Bivalvia: Unionoidea), in the Great Lakes Region. *Walkerana*, 17(2): 60–67. Disponible en [https://engagedscholarship.csuohio.edu/scibges\\_facpub/47](https://engagedscholarship.csuohio.edu/scibges_facpub/47).
- Serb JM (2006). Discovery of genetically distinct sympatric lineages in the freshwater mussel *Cyprogenia aberti* (Bivalvia: Unionidae). *Journal of Molluscan Studies*. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyl021>.
- Sheldon F & KF Walker (1989). Effects of Hypoxia on Oxygen Consumption by Two Species of Freshwater Mussel (Unionacea: Hyriidae) from the River Murray. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 40: 491–499.
- Sidlauskas BL, JH Mol & RP Vari (2011). Dealing with allometry in linear and geometric morphometrics: a taxonomic case study in the *Leporinus cylindriformis* group (Characiformes: Anostomidae) with description of a new species from Suriname. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 162: 103–130. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2010.00677.x>.
- Silva J, C Fuentealba, E Bay-Schmith & A Larrain (2007). Estandarización del bioensayo de toxicidad aguda con *Diplodon chilensis* usando un toxico de referencia. *Gayana*, 71(2): 135–141. ISSN 0717-652X.
- Simone LRL (2006). Land and freshwater molluscs of Brazil. 390 pp., São Paulo (EGB, Fapesp). ISBN 85-906670-0-6.
- Simpson CT (1900). Synopsis of the Naiades: or pearly fresh-water mussels. *Proceedings of the Natural Museum*, 22 (1205): 501–1044. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/32021592#page/553/mode/1up>.

## REFERENCIAS

- Simpson CT (1914). A descriptive catalogue of the Naiades, or pearly freshwater mussels. Privately published by Bryant Walker, Michigan. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.10910>.
- Soldati AL, DE Jacob, BR Schöne, MM Bianchi & A Hajduk (2009). Seasonal periodicity of growth and composition in valves of *Diplodon chilensis patagonicus* (d'Orbigny, 1835). *Journal of Molluscan Studies*, 75: 75-85. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyn044>.
- Soroka M (2010). Characteristics of mitochondrial DNA of unionid bivalves (Mollusca: Bivalvia: Unionidae). I. Detection and characteristics of doubly uniparental inheritance (DUI) of unionid mitochondrial DNA. *Folia Malacologica*. <https://doi.org/10.2478/v10125-010-0015-y>.
- Soroka M & A Burzynski (2013). Complete female mitochondrial genome of *Anodonta anatina* (Mollusca: Unionidae): confirmation of a novel protein-coding gene (F ORF). *Mitochondrial DNA*. <https://doi.org/10.3109/19401736.2013.823176>.
- Soroka M & A Burzynski (2014). Complete male mitochondrial genome of *Anodonta anatina* (Mollusca: Unionidae). *Mitochondrial DNA*. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.958725>.
- Sousa da Mata L, CH Tagliaro, D Simeone & CR Beasley (2019). Shell shape variation in Amazonian freshwater mussels (Unionida: Hyriidae: Hyriini). *Journal of Molluscan Studies*, 85(2), 212-223.
- Strayer DL, JA Downing, WR Haag, TL King, JB Layzer, TJ Newton & SJ Nichols (2004). Changing perspectives on pearly mussels, North America's most imperiled animals. *Bioscience*, 54(5): 429-439. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0429:CPOPMM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0429:CPOPMM]2.0.CO;2).
- Stuart KR, AG Eversole & DE Brune (2001). Filtration of Green Algae and Cyanobacteria by Freshwater Mussels in the Partitioned Aquaculture System. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32(1): 105-111. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2001.tb00928.x>.
- Subcomité de Estándares y Peticiones de la UICN (2017). Directrices de uso de las Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN. Versión 13. Preparado por el Subcomité de Estándares y Peticiones. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/documents/RedListGuidelines.pdf>.

T

- Tamura K, M Nei & S Kumar (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101(30): 11030-11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
- Technelysium Pty Ltd. Chromas 2.6.6 (2018). Disponible en: <https://technelysium.com.au/wp/chromas>.
- Theologidis I, S Fodelianakis, MB Gaspar & E Zouros (2008). Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution: An International Journal of Organic Evolution*, 62: 959-970. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00329.x>.
- Thomas GR, J Taylor & C Garcia de Leaniz (2010). Captive breeding of the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Endangered Species Research*, 12: 1-9. <https://doi.org/10.3354/esr00286>.
- Thompson JD, DG Higgins & TJ Gibson (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673-4680.
- Tomazelli AC, LA Martinelli, WEP Avelar, PB de Camargo, A-H Fostier, ESB Ferraz et al (2003). Biomonitoring of Pb and Cd in Two Impacted Watersheds in Southeast Brazil, Using the Freshwater Mussel *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) (Bivalvia: Mycetopodidae) as a Biological Monitor. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(4): 673-684. ISSN 1516-8913.
- Torres S, GA Darrigran & MC Damborenea (2013). Distribución del género *Diplodon* (Mollusca: Bivalvia: Hyriidae) en la Cuenca del Plata (Argentina) mediante el uso de Colecciones Biológicas. *AUGMDOMUS* 5 (1): 90-99. ISSN:1852-2181.
- Torres S, L Cao, DE Gutiérrez Gregoric, M de Lucía, F Brea & GA Darrigran (2018). Distribution of the Unionida (Bivalvia, Paleoheterodonta) from Argentina and its conservation in the southern neotropical region. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203616>.
- Troncon E & W Avelar (2011). A new occurrence of *Anodontites tenebricosus* (Bivalvia: Mycetopodidae) in the Sapucaí river basin, São Paulo, Brazil: environmental and conchological aspects. *Brazilian Journal of Biology*. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000400007>.
- Turick CE, AJ Sextone & GK Bissonnette (1988). Freshwater mussels as monitors of bacteriological water quality. *Water, Air, and Soil Pollution*, 40: 449-460. <https://doi.org/10.1007/BF00163748>.

## REFERENCIAS

V

- Valdovinos C & P Pedreros (2007). Geographic variations in shell growth rates of the mussel *Diplodon chilensis* from temperate lakes of Chile: Implications for biodiversity conservation. *Limnologia*, 37: 63-75. <https://doi.org/10.1016/j.limno.2006.08.007>.
- Viscosi V & A Cardini (2011). Leaf Morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A Simplified Protocol for Beginners. *PLoS ONE*, 6(10): e25630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025630>.

W

- Wächtler C, MCD Mansur & T Ritcher (2001). Larval Types and Early Postlarval Biology in Naiads (Unionoida). En: Bauer G & K Wächtler (Editores) *Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida*. *Ecological Studies*, 145. ISBN 978-3-642-56869-5.
- Wagner JA (1827). Testacea Fluvialia Quae in Itinere per Brasiliam Annis MDCCCXVII - MDCCCXX. 36 pp., 29 pls. Disponible en: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/39465053#page/7/mode/1up>.
- Walker JM, JP Curole, DE Wade, EG Chapman, AE Bogan, GT Watters & WR Hoeh (2006). Taxonomic distribution and phylogenetic utility of gender-associated mitochondrial genomes in the Unionoida (Bivalvia). *Malacologia*, 48: 265-282.
- Walker JM, AE Bogan, EA Bonfiglio, DC Campbell, AD Christian, JP Curole *et al.* (2007). Primers for amplifying the hypervariable, male-transmitted COII-COI junction region in ambemine freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea: Ambleminae). *Molecular Ecology Notes*, 7: 489-491. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01630.x>.
- Waterhouse AM, JB Procter, DMA Martin, M Clamp & GJ Barton (2009) Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
- Whelan NV, AJ Geneva & DL Graf (2011). Molecular phylogenetic analysis of tropical freshwater mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) resolves the position of *Coelatura* and supports a monophyletic Unionidae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.07.016>.

Y

- Yusseppone MS, F Márquez, CM Luquet, T Brey, MC Ríos de Molina & I Rocchetta (2017). Does shell shape variation play a role in conservation of the long-lived freshwater bivalve *Diplodon chilensis* (Bivalvia, Hyriidae)? *Ecohydrology*. <https://doi.org/10.1002/eco.1931>.

Z

- Zanatta DT & RW Murphy (2007). Range-wide population genetic analysis of the endangered northern riffleshell mussel, *Epioblasma torulosa rangiana* (Bivalvia: Unionoida). *Conservation Genetics*, 8: 1393-1404. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9290-6>.
- Zieritz A & DC Aldridge (2009). Identification of ecophenotypic trends within three European freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida) using traditional and modern morphometric techniques. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98: 814-825. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01329.x>.
- Zieritz A & DC Aldridge (2011). Sexual, Habitat-Constrained and Parasite-Induced Dimorphism in the Shell of a Freshwater Mussel (*Anodonta anatina*, Unionidae). *Journal of Morphology*, 272: 1365-1375. <https://doi.org/10.1002/jmor.10990>.
- Zieritz A, JI Hoffman, W Amos & DC Aldridge (2010). Phenotypic plasticity and genetic isolation-by-distance in the freshwater mussel *Unio pictorum* (Mollusca: Unionoida). *Evolutionary Ecology*, 24: 923-938. <https://doi.org/10.1007/s10682-009-9350-0>.
- Zouros E (2013). Biparental Inheritance Through Uniparental Transmission: The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of Mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology*, 40: 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11692-012-9195-2>.
- Zouros E, AO Ball, C Saavedra & KR Freeman (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 7463-7467. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7463>

***ANEXO***

**TABLA A1** Especies de unionoideos presentes en las regiones de América del Sur establecidas por Graf & Cummings (2019). El asterisco (\*) corresponde a especies endémicas de cada región mencionada.



<b>Subregión Magdalena-Pacífica (SA1)</b>		
1. <i>Acostaea rivoli</i> Deshayes, 1827*	6. <i>Anodontites tortilis</i> (Lea, 1852)	11. <i>Diplodontites olssoni</i> Pilsbry, 1933*
2. <i>Anodontites carinata</i> (Dunker, 1858)	7. <i>Anodontites trapesialis</i> (Lamarck, 1819)	12. <i>Diplodontites pilsbryana</i> Olsson & Wurtz, 1951*
3. <i>Anodontites colombiensis</i> Marshall, 1922*	8. <i>Anodontites trigona</i> (Spix & Wagner, 1827)	13. <i>Mycetopoda siliquosa</i> (Spix, 1827)
4. <i>Anodontites crispata</i> Bruguière, 1792	9. <i>Castalia ecarinata</i> Mousson, 1869*	
5. <i>Anodontites elongata</i> (Swainson, 1823)	10. <i>Diplodontites cookei</i> Marshall, 1922	
<b>Subregión Orinoco-Guayana (SA2)</b>		
1. <i>Anodontites aroana</i> Baker, 1930*	12. <i>Castalia ambigua</i> Lamarck, 1819	23. <i>Diplodon voltzi</i> Vernhout, 1914*
2. <i>Anodontites carinata</i> (Dunker, 1858)	13. <i>Castalia cordata</i> Swainson, 1840*	24. <i>Lamproscapha ensiformis</i> (Spix, 1827)
3. <i>Anodontites crispata</i> Bruguière, 1792	14. <i>Castalia orinocensis</i> Morrison, 1943*	25. <i>Lamproscapha falsa</i> (Simpson, 1900)*
4. <i>Anodontites guanarensis</i> Marshall, 1922*	15. <i>Castalia stevensi</i> (Baker, 1930)*	26. <i>Mycetopoda pittieri</i> Marshall, 1927*
5. <i>Anodontites infossa</i> Baker, 1930*	16. <i>Castaliella quadrata</i> (Sowerby II, 1869)*	27. <i>Mycetopoda siliquosa</i> (Spix, 1827)
6. <i>Anodontites leotaudi</i> (Guppy, 1866)*	17. <i>Castaliella schomburgiana</i> (Sowerby II, 1869)*	28. <i>Mycetopoda soleniformis</i> d'Orbigny, 1835
7. <i>Anodontites pittieri</i> Marshall, 1922*	18. <i>Castaliella sulcata</i> (Krauss, 1848)*	29. <i>Mycetopodella falcata</i> (Higgins, 1868)
8. <i>Anodontites schomburgiana</i> (Sowerby II, 1870)*	19. <i>Diplodon granosus</i> (Bruguière, 1792)*	30. <i>Prisodon obliquus</i> Schumacher, 1817
9. <i>Anodontites tortilis</i> (Lea, 1852)	20. <i>Diplodon losadae</i> Haas, 1966*	31. <i>Prisodon syrmatophorus</i> (Meuschen, 1781)
10. <i>Anodontites trapesialis</i> (Lamarck, 1819)	21. <i>Diplodon obsolescens</i> Baker, 1913	32. <i>Tamsiella tamsiana</i> (Dunker, 1858)*
11. <i>Anodontites trigona</i> (Spix & Wagner, 1827)	22. <i>Diplodon suavidicus</i> (Lea, 1856)	33. <i>Triplodon corrugatus</i> (Lamarck, 1819)
<b>Subregión Amazónica (SA3)</b>		
1. <i>Anodontites crispata</i> Bruguière, 1792	14. <i>Diplodon guaranianus</i> (d'Orbigny, 1835)	27. <i>Monocondylaea guarayana</i> (d'Orbigny, 1835)*
2. <i>Anodontites elongata</i> (Swainson, 1823)	15. <i>Diplodon hylaeus</i> (d'Orbigny, 1835)	28. <i>Monocondylaea jaspidea</i> (Hupé, 1857)*
3. <i>Anodontites obtusa</i> (Spix, 1827)	16. <i>Diplodon obsolescens</i> Baker, 1913	29. <i>Mycetopoda siliquosa</i> (Spix, 1827)
4. <i>Anodontites tenebricosa</i> (Lea, 1834)	17. <i>Diplodon rhombeus</i> (Spix, 1827)	30. <i>Mycetopoda soleniformis</i> d'Orbigny, 1835
5. <i>Anodontites trapesialis</i> (Lamarck, 1819)	18. <i>Diplodon suavidicus</i> (Lea, 1856)	31. <i>Mycetopodella falcata</i> (Higgins, 1868)
6. <i>Anodontites trapezea</i> (Spix, 1827)	19. <i>Diplodontites cookei</i> Marshall, 1922	32. <i>Prisodon obliquus</i> Schumacher, 1817
7. <i>Anodontites trigona</i> (Spix & Wagner, 1827)	20. <i>Fossula fossiculifera</i> (d'Orbigny, 1835)	33. <i>Prisodon syrmatophorus</i> (Meuschen, 1781)
8. <i>Bartlettia stefanensis</i> (Moricand, 1856)	21. <i>Iheringella semisulcata</i> (Adams, 1870)*	34. <i>Tamsiella amazonica</i> Bonetto, 1972*
9. <i>Callonaia duprei</i> * (Récluz, 1842)	22. <i>Lamproscapha ensiformis</i> (Spix, 1827)	35. <i>Tamsiella schroeteriana</i> (Lea, 1852)*
10. <i>Castalia ambigua</i> Lamarck, 1819	23. <i>Leila blainvilliana</i> (Lea, 1834)	36. <i>Triplodon chodo</i> Mansur & Pimpão, 2008*
11. <i>Castalia crosseana</i> Hidalgo, 1865*	24. <i>Leila esula</i> (d'Orbigny, 1835)*	37. <i>Triplodon corrugatus</i> (Lamarck, 1819)
12. <i>Castalia orbigny</i> (Deville & Hupé, 1850)*	25. <i>Monocondylaea corrientensis</i> (d'Orbigny, 1835)	
13. <i>Diplodon guaporensis</i> Bonetto & Tassara, 1987*	26. <i>Monocondylaea costulata</i> (Moricand, 1858)*	

Continuación Tabla A1.

**Subregión São Francisco-Atlántica (SA4)**

1. <i>Anodontites moricandii</i> (Lea, 1860)*	7. <i>Diplodon fontainianus</i> (d'Orbigny, 1835)	13. <i>Diplodon suavidicus</i> (Lea, 1856)
2. <i>Anodontites obtusa</i> (Spix, 1827)	8. <i>Diplodon garbei</i> Ihering, 1910*	14. <i>Fossula fossiculifera</i> (d'Orbigny, 1835)
3. <i>Anodontites solenidea</i> (Sowerby, 1867)	9. <i>Diplodon multistriatus</i> (Lea, 1831)	15. <i>Monocondylaea corrientesensis</i> (d'Orbigny, 1835)
4. <i>Anodontites trapesialis</i> (Lamarck, 1819)	10. <i>Diplodon pfeifferi</i> (Dunker, 1848)*	16. <i>Monocondylaea franciscana</i> (Moricand, 1836)*
5. <i>Anodontites trapezea</i> (Spix, 1827)	11. <i>Diplodon rhombeus</i> (Spix, 1827)	17. <i>Mycetopoda siliquosa</i> (Spix, 1827)
6. <i>Diplodon ellipticus</i> Spix, 1827	12. <i>Diplodon rotundus</i> (Spix, 1827)	

**Subregión Paraná-Paraguay (SA5)**

1. <i>Anodontites elongata</i> (Swainson, 1823)	19. <i>Castalia undosa</i> von Martens, 1885*	37. <i>Diplodon martensi</i> (Ihering, 1893)*
2. <i>Anodontites ferrarisii</i> (d'Orbigny, 1835)*	20. <i>Diplodon aethiops</i> (Lea, 1860)*	38. <i>Diplodon multistriatus</i> (Lea, 1831)
3. <i>Anodontites iheringi</i> (Clessin, 1882)*	21. <i>Diplodon berthae</i> Ortmann, 1921*	39. <i>Diplodon parallelopipedon</i> (Lea, 1834)*
4. <i>Anodontites lucida</i> (d'Orbigny, 1835)*	22. <i>Diplodon burroughianus</i> (Lea, 1834)*	40. <i>Diplodon paranensis</i> (Lea, 1834)*
5. <i>Anodontites obtusa</i> (Spix, 1827)	23. <i>Diplodon caipira</i> (Ihering, 1893)*	41. <i>Diplodon parodizi</i> Bonetto, 1962*
6. <i>Anodontites patagonica</i> (Lamarck, 1819)*	24. <i>Diplodon charruanus</i> (d'Orbigny, 1835)*	42. <i>Diplodon paulista</i> (Ihering, 1893)*
7. <i>Anodontites solenidea</i> (Sowerby, 1867)	25. <i>Diplodon delodontus</i> (Lamarck, 1819)*	43. <i>Diplodon peraeformis</i> (Lea, 1860)*
8. <i>Anodontites tenebricosa</i> (Lea, 1834)	26. <i>Diplodon ellipticus</i> Spix, 1827	44. <i>Diplodon piceus</i> (Lea, 1860)*
9. <i>Anodontites trapesialis</i> (Lamarck, 1819)	27. <i>Diplodon fontainianus</i> (d'Orbigny, 1835)	45. <i>Diplodon rhuacoicus</i> (d'Orbigny, 1835)*
10. <i>Anodontites trapezea</i> (Spix, 1827)	28. <i>Diplodon funebris</i> (Lea, 1860)*	46. <i>Diplodon rotundus</i> (Spix, 1827)
11. <i>Anodontites trigona</i> (Spix & Wagner, 1827)	29. <i>Diplodon gratus</i> (Lea, 1860)*	47. <i>Diplodon solisianus</i> (d'Orbigny, 1835)*
12. <i>Bartlettia stefanensis</i> (Moricand, 1856)	30. <i>Diplodon greeffeanus</i> (Ihering, 1893)*	48. <i>Diplodon uruguayensis</i> (Lea, 1860)*
13. <i>Castalia ambigua</i> Lamarck, 1819	31. <i>Diplodon guaranianus</i> (d'Orbigny, 1835)	49. <i>Diplodon variabilis</i> (Maton, 1811)*
14. <i>Castalia inflata</i> d'Orbigny, 1835*	32. <i>Diplodon hildae</i> *	50. <i>Diplodon vicarius</i> Ortmann, 1921*
15. <i>Castalia martensi</i> (Ihering, 1891)*	33. <i>Diplodon hylaeus</i> (d'Orbigny, 1835)	51. <i>Diplodon wymanii</i> (Lea, 1860)*
16. <i>Castalia multisulcata</i> Hupé, 1857*	34. <i>Diplodon iheringi</i> Simpson, 1914*	52. <i>Mycetopoda legumen</i> (von Martens, 1888)*
17. <i>Castalia nehringi</i> (Ihering, 1891)*	35. <i>Diplodon imitator</i> Ortmann, 1921*	53. <i>Mycetopoda siliquosa</i> (Spix, 1827)
18. <i>Castalia psammoica</i> (d'Orbigny, 1835)*	36. <i>Diplodon koseritzi</i> (Clessin, 1888)*	54. <i>Mycetopoda soleniformis</i> d'Orbigny, 1835

**Subregión Patagonia (SA6)**

1. <i>Anodontites trigona</i> (Spix & Wagner, 1827)	2. <i>Diplodon chilensis</i> (Gray, 1828)*	3. <i>Diplodon solidulus</i> (Philippi, 1869)*
---	--	--



FIGURA A1 Valvas izquierdas en vista interna de los ejemplares tipo de las especies del género *Diplodon*.





FIGURA A2 Etiquetas de los lotes de los ejemplares tipo de las especies del género *Diplodon*.



**TABLA A2** Ejemplares del género *Diplodon* de Argentina analizados. MLP= Museo de La Plata, MACN= Museo Nacional de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia".

ESPECIE	MUSEO	LOTE	EJEMPLARES	PROVINCIA	LOCALIDAD
<i>D. burroughianus</i> 35 ejemplares	MLP	273	2	Santa Fe	Helvecia
	MLP	3704	2	Santa Fe	Sur de Alto Verde
	MACN	9501	2	Entre Ríos	Río Paraná
	MACN	36126	2	Santa Fe	Isla Arcadi, La Capital
	MLP	1763	3	Buenos Aires	San Fernando, Delta del Río de La Plata
	MLP	3701	3	Santa Fe	Alto Verde, Laguna Toratay
	MACN	11878	3	Buenos Aires	Arroyo Miguelete, Punta Lara
	MACN	17605	3	Corrientes	Arroyo Riachuelo
	MLP	8464	7	Santa Fe	Rosario
	MLP	8465	8	Santa Fe	Rosario
<i>D. charruanus</i> 50 ejemplares	MLP	6156	1	Corrientes	Paso de los Libres
	MLP	6997-5	1	Entre Ríos	Guauguaychú, Parque Ñandubaysal
	MLP	3703	2	Corrientes	Isla Las Correntadas
	MLP	3715	2	Santa Fe	Isla Bieri, Pozo Puesto, a 20 km al sur de puerto Malabrigo
	MLP	6427	2	Corrientes	Arroyo Colla y Colonia Pando
	MLP	3698	3	Santa Fe	Isla Malmajue, 25 km al Norte de la Ciudad de Santa Fe
	MLP	6563	4	Entre Ríos	Concepción del Uruguay, Arroyo de la China
	MACN	11958	4	Entre Ríos	Guauguaychú
	MLP	3702	5	Santa Fe	Romang, Arroyo Malabrigo
	MLP	6167	5	Buenos Aires	Isla Martín García, Río de la Plata
	MLP	6327	5	Entre Ríos	Colón, Arroyo La Leche (a 1 Km al sur de Colón)
	MLP	6141	7	Formosa	
	MLP	6256	9	Corrientes	Arroyo Aguapey
	<i>D. chilensis</i> 15 ejemplares	MLP	1802	1	Neuquén
MLP		3821	1	Río Negro	Lago Puelo, cerca de El Bolsón
MACN		9346	1	Río Negro	Parque Nacional Nahuel Huapi, puerto Blest
MACN		12087	1	Río Negro	Lago Pelegrini
MLP		1794	2	Río Negro	San Carlos de Bariloche, Lago Nahuel Huapi, Isla Victoria, Laguna Redonda
MACN		37985	2	Río Negro	Parque Nacional Nahuel Huapi, puerto Blest
MLP		3822	3	Chubut	Futalaufquen, Lago El Terraplén
MLP		2794	4	Río Negro	San Carlos de Bariloche, Lago Nahuel Huapi y Río Limay
<i>D. delodontus</i> 64 ejemplares	MLP	3697	1	Santa Fe	Isla Bieri, 20 Km al sur de Puerto Malabrigo
	MLP	6246	1	Buenos Aires	La Plata
	MLP	6353	1	Entre Ríos	Rosario del Tala, Río Gualeguay
	MACN	11747	1	Buenos Aires	Los Talas
	MACN	31779	1	Buenos Aires	Arroyo del Gato, entre Tolosa y La Plata
	MACN	471	2	Buenos Aires	Arroyo Pesquerías
	MLP	6154	2	Santa Fe	Río Paraná, Isla del Cerrito
	MLP	6242	2	Entre Ríos	Nogoyá, Arroyo Nogoyá
	MACN	9729	2	Buenos Aires	Arroyo Conchitas, Plátanos
	MACN	10380	2	Buenos Aires	Arroyo La Corbata, Los Talas
	MACN	11955	2	Entre Ríos	Guauguaychú
	MACN	25710	2	Buenos Aires	Arroyo Los Cuervos
	MACN	1012	3	Buenos Aires	Arroyo Todos los Santos, Estación Verónica del Ferrocarril General Roca
	MLP	2793	3	Buenos Aires	La Plata, Arroyo El Pescado, 20 km de La Plata hacia Magdalena
	MLP	6250	3	Santa Fe	Romang
	MLP	8469	3	Buenos Aires	Buenos Aires, Capital Federal, Lago de Palermo
	MLP	11791	3	Buenos Aires	Magdalena, Arroyo Juan Blanco
	MACN	19124	3	Entre Ríos	Arroyo del Sauce
	MLP	6124	4	Entre Ríos	Guauguay, Río Gualeguay
	MLP	6369	4	Entre Ríos	Nogoyá, Arroyo Nogoyá
	MLP	3709	6	Santa Fe	Romang, Arroyo Malabrigo
MLP	6259	6	Entre Ríos	Río Gualeguay	
MLP	6238	7	Entre Ríos	Entre Concepción del Uruguay y Colón, Arroyo Urquiza	

Continuación Tabla 2.

## ANEXO

ESPECIE	MUSEO	LOTE	EJEMPLARES	PROVINCIA	LOCALIDAD
<i>D. fortis</i>	MLP	8471	3	Corrientes	Solari, Arroyo Ibabiyú
<i>D. hylaeus</i> 24 ejemplares	MLP	6293	1	Chaco	San Fernando, Río Salado
	MLP	6324	1	Santa Fe	Romang, Isla Bieri
	MLP	6383	1	Corrientes	Paso de la Patria
	MLP	6421	2	Santa Fe	Río Colastiné, zona atracadero balsa
	MLP	6310	3	Santa Fe	Romang, Isla Bieri
	MLP	6326	3	Corrientes	Corrientes, Arroyo Yacaré
	MLP	6355	5	Santa Fe	Isla Bieri, Río Paraná, Puerto Malabrigo
	MLP	6267	8	Santa Fe	Santa Fe, Parque General Belgrano, Lago del Sur
<i>D. parallelipedon</i> 66 ejemplares	MLP	1747	1	Misiones	Iguazú, Playa del Hotel Iguazú
	MLP	1749	1	Santa Fe	Laguna Guadalupe
	MLP	1750	1	Entre Ríos	Guauguaychú, Ibicuycito
	MLP	6066	1	Entre Ríos	Diamante, Isla Los Chepes
	MACN	7786	1	Santa Fe	Laguna Alto Verde
	MACN	14716	1	Corrientes	Río Santa Lucía, Estación Julio F.C.N.E.A.
	MLP	2015	2	Buenos Aires	Ensenada, Río Santiago
	MLP	3691	2	Santa Fe	Rosario
	MLP	6036	2	Misiones	Arroyo Garupá, cerca del puente
	MLP	6378	2	Buenos Aires	Ensenada, Arroyo Doña Flora
	MLP	3700	3	Santa Fe	Isla Bieri, 20 Km al sur de Puerto Malabrigo
	MLP	6151	3	Santa Fe	Santa Fe, Parque General Belgrano, Lago del Sur
	MACN	6322	3	Corrientes	Río Alto Paraná, Itatí
	MACN	6331	3	Entre Ríos	Río Paraná, Santa Elena
	MLP	10950	3	Corrientes	Paso de los Libres
	MLP	6062	4	Formosa	Río Paraguay, Laguna Pirai
	MLP	6034	5	Santa Fe	Ciudad de Santa Fe, Alto Verde
	MLP	6035	6	Santa Fe	Madrejón Don Pancho, Río Santa Fe
	MLP	6132	6	Corrientes	Arroyo Aguapey
	MLP	6300	6	Santa Fe	Madrejón Flores
MLP	6147	7	Santa Fe	Rosario, Isla de los Espinillos	
<i>D. paranensis</i> 5 ejemplares	MACN	9502	1	Buenos Aires	San Isidro
	MACN	914	2	Entre Ríos	Río Uruguay, Puerto Basilio
	MACN	25979	2	Corrientes	Yapeyú
<i>D. parodizi</i> 57 ejemplares	MLP	3714	1	Santa Fe	Rosario, Isla El Paraguayo, frente a Arroyo Seco
	MLP	6236	1	Santa Fe	General Obligado, Río Paraná, Isla La Verde
	MLP	6454	1	Chaco	Río Salado
	MLP	3710	2	Santa Fe	Isla El Paraguayo, frente a Arroyo Seco
	MLP	6240	2	Entre Ríos	Diamante, Los Chepes, Laguna Los Gansos
	MLP	6258	2	Formosa	Pirané, Estero Bellaco
	MLP	6615	2	Formosa	Río Paraguay, Laguna Pirai
	MLP	6224	3	Formosa	Pirané
	MLP	6225	3	Buenos Aires	Río Santiago
	MLP	6244	3	Santa Fe	Santa Fe, Parque General Belgrano, Lago del Sur
	MLP	6255	3	Entre Ríos	La Paz, Río Paraná
	MLP	6375	3	Santa Fe	Isla Bieri
	MLP	6564	4	Santa Fe	Madrejón Don Pancho, a 7 km al norte de la ciudad de Santa Fe
	MLP	6112	5	Formosa	Río Paraguay,
	MLP	6247	5	Formosa	Río Paraguay, Laguna Los Indios
	MLP	6260	7	Santa Fe	Río Paraná, Madrejón Don Felipe,
	MLP	6243	10	Formosa	Río Paraguay, Laguna Martín García
	MACN	25900	1	Neuquén	Lago Lácar
	MACN	31780	1	Buenos Aires	Río Samborombón
<i>D. patagonicus</i> 10 ejemplares	MACN	20958	2	Río Negro	Parque Nacional Nahuel Huapi, arroyo del Medio, cerca del límite entre Río Negro y Neuquén
	MACN	20241	3	Buenos Aires	Río Negro, Carmen de Patagones
	MACN	25894	3	Chubut	Parque Nacional Los Alerces, lago Futalaufquen
<i>D. peraeformis</i>	MACN	11933	2	Corrientes	Río Uruguay, Paso de los Libres

## ANEXO

Continuación Tabla A2.

ESPECIE	MUSEO	LOTE	EJEMPLARES	PROVINCIA	LOCALIDAD
<i>D. piceus</i>	MLP	6354	5	Entre Ríos	Concordia, Arroyo Yerúa
<i>D. rhuacoicus</i> 23 ejemplares	MLP	6328	1	Entre Ríos	Gualeguaychú
	MLP	6387	4	Entre Ríos	Arroyo Tigua, afluente del río Uruguay, cerca de Concordia
	MLP	6295	8	Entre Ríos	Chajarí, Arroyo Tigua
	MLP	6261	9	Entre Ríos	Concordia, Tributarios del río Uruguay
<i>D. trifidus</i> 6 ejemplares	MACN	5134	1	Corrientes	Río Santa Lucía
	MACN	5135	1	Entre Ríos	Paraná
	MLP	6351	2	Santa Fe	Romang, Río Paraná, Isla Bieri
	MACN	25884	2	Buenos Aires	Los Talas
<i>D. variabilis</i> 79 ejemplares	MLP	6249	2	Santa Fe/Entre Ríos	Puerto Alvear - Río Colastiné
	MLP	6252	2	Santa Fe	Río Paraná, Isla Espinillo
	MLP	6321	2	Buenos Aires	Buenos Aires, Puerto Nuevo
	MLP	6352	2	Santa Fe	Santa Fe, Alto Verde, Isla Arteaga
	MACN	9489	2	Santa Fe	Isla La Paraguaya, río Santa Fe, Villa Constitución
	MACN	10260	2	Buenos Aires	Río Santiago
	MLP	1767	3	Buenos Aires	Isla Martín García
	MLP	6045	3	Buenos Aires	Ensenada, Río Santiago
	MLP	6142	3	Buenos Aires	Tigre, Boca del Arroyo Pajarito
	MLP	6299	3	Buenos Aires	Ensenada, Arroyo Doña Flora
	MLP	6308	3	Entre Ríos	Gualeguay, Río Gualeguay
	MLP	6371	3	Santa Fe	Santa Fe, Isla Arteaga, frente a Santa Fe
	MLP	6241	4	Corrientes	Corrientes, Arroyo Yacaré
	MLP	6210	5	Buenos Aires	San Fernando, Arroyo Luján
	MLP	6235	5	Buenos Aires	Ensenada, Arroyo Cambaceres
	MLP	6234	6	Buenos Aires	Sarandí, Arroyo Sarandí
	MLP	6404	6	Santa Fe	Río Paraná, Islas frente a Román
MLP	6134	7	Santa Fe	Santa Fe, Madrejón Don Felipe	
MLP	6135	7	Santa Fe	Santa Fe, Parque General Belgrano, Lago del Sur	
MLP	6358	9	Santa Fe	Ciudad de Santa Fe, Isla de Alto Verde	

**TABLA A3** Aporte de cada Componente Principal (CP) a la variabilidad total del material tipo de las especies del género *Diplodon*.

CP	EIGENVALOR	% VARIANZA	% ACUMULADO
1	0,00515802	45,159	45,159
2	0,0025387	22,226	67,385
3	0,00091349	7,998	75,382
4	0,00071248	6,238	81,62
5	0,0004416	3,866	85,486
6	0,00040168	3,517	89,003
7	0,00029759	2,605	91,609
8	0,0001823	1,596	93,205
9	0,00013344	1,168	94,373
10	0,00011799	1,033	95,406
11	0,0000863	0,756	96,161
12	0,00007984	0,699	96,86
13	0,00006409	0,561	97,422
14	0,00006036	0,528	97,95
15	0,00004715	0,413	98,363
16	0,00003755	0,329	98,692
17	0,00002851	0,25	98,941
18	0,00002177	0,191	99,132
19	0,0000175	0,153	99,285
20	0,00001622	0,142	99,427
21	0,00001081	0,095	99,522
22	0,00001029	0,09	99,612
23	0,00000832	0,073	99,684
24	0,00000712	0,062	99,747
25	0,00000533	0,047	99,794
26	0,00000426	0,037	99,831
27	0,00000369	0,032	99,863
28	0,00000323	0,028	99,891
29	0,00000282	0,025	99,916
30	0,00000258	0,023	99,939
31	0,00000149	0,013	99,952
32	0,00000128	0,011	99,963
33	0,00000098	0,009	99,972
34	0,0000007	0,006	99,978
35	0,00000068	0,006	99,984
36	0,00000051	0,005	99,988
37	0,00000045	0,004	99,992
38	0,00000038	0,003	99,995
39	0,00000033	0,003	99,998
40	0,00000019	0,002	100
VARIANZA TOTAL	<b>0,01142202</b>		

## ANEXO

**TABLA A4** Aporte (eigenvalor) de cada Componente Principal (CP) a la variabilidad total de ejemplares de *Diplodon* de Argentina.

CP	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO	CP	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO
1	0,00677723	49,314	49,314	40	0,00000166	0,012	99,912
2	0,00265624	19,328	68,642	41	0,00000157	0,011	99,924
3	0,00176051	12,81	81,452	42	0,00000141	0,01	99,934
4	0,00067892	4,94	86,392	43	0,00000127	0,009	99,943
5	0,00037757	2,747	89,139	44	0,00000103	0,007	99,951
6	0,00031446	2,288	91,427	45	0,00000094	0,007	99,958
7	0,0002406	1,751	93,178	46	0,00000083	0,006	99,964
8	0,00019296	1,404	94,582	47	0,00000073	0,005	99,969
9	0,00012146	0,884	95,466	48	0,00000063	0,005	99,974
10	0,00009564	0,696	96,162	49	0,00000053	0,004	99,977
11	0,00009059	0,659	96,821	50	0,00000052	0,004	99,981
12	0,00005958	0,434	97,254	51	0,00000045	0,003	99,985
13	0,00005406	0,393	97,648	52	0,00000036	0,003	99,987
14	0,0000458	0,333	97,981	53	0,00000029	0,002	99,989
15	0,00004327	0,315	98,296	54	0,00000028	0,002	99,991
16	0,0000324	0,236	98,532	55	0,00000024	0,002	99,993
17	0,00002911	0,212	98,743	56	0,0000002	0,001	99,995
18	0,0000204	0,148	98,892	57	0,00000013	0,001	99,996
19	0,00001874	0,136	99,028	58	0,00000012	0,001	99,996
20	0,00001403	0,102	99,13	59	0,00000007	0,001	99,997
21	0,00001325	0,096	99,227	60	0,00000007	0	99,997
22	0,00001187	0,086	99,313	61	0,00000006	0	99,998
23	0,00000949	0,069	99,382	62	0,00000005	0	99,998
24	0,0000088	0,064	99,446	63	0,00000004	0	99,999
25	0,00000801	0,058	99,505	64	0,00000004	0	99,999
26	0,00000762	0,055	99,56	65	0,00000004	0	99,999
27	0,00000678	0,049	99,609	66	0,00000003	0	99,999
28	0,00000622	0,045	99,655	67	0,00000002	0	99,999
29	0,00000513	0,037	99,692	68	0,00000002	0	100
30	0,00000414	0,03	99,722	69	0,00000002	0	100
31	0,00000392	0,029	99,751	70	0,00000001	0	100
32	0,00000348	0,025	99,776	71	0,00000001	0	100
33	0,00000293	0,021	99,797	72	0	0	100
34	0,00000283	0,021	99,818	73	0	0	100
35	0,00000271	0,02	99,838	74	0	0	100
36	0,00000234	0,017	99,855	75	0	0	100
37	0,00000223	0,016	99,871	76	0	0	100
38	0,00000218	0,016	99,887				
39	0,0000019	0,014	99,9				
				VARIANZA TOTAL	<b>0,01374309</b>		



# ANEXO

KU888263.1 D. suavidicus	G C T T T T C C C C G T T T A A A T A A T T T T A A G A T T T T T G - - - - - G T T A T T G G T T C C T - - - - G C G T T G T T T T T G T T G T T A - - A G
KU888242.1 C. ambigua	G C T T T T C C A C G T T T G A A T A A T T T A A G G T T T T G - - - - - G T T G C T T G T T C C T - - - - G C T T T A T T T T T G T T G T T A - - A G
KP184899.1 D. demeraraensis	G C T T T T C C T C G T T T A A A T A A T T T A A G G T T T T G - - - - - G T T G C T T G T G C C T - - - - G C T T T G T T T T T G T T G T T A - - G G
KP184898.1 D. demeraraensis	G C T T T T C C T C G T T T A A A T A A T T T A A G G T T T T G - - - - - G T T G C T T G T G C C T - - - - G C T T T G T T T T T G T T G T T A - - G G
JN243889.1 C. ambigua	G C T T T T C C T C G T T T G A A T A A C T T A A G G T T T T G - - - - - G T T G C T T G T C C C T - - - - G C T T T G T T T T T G C T G C T A - - A G
DQ191410.1 D. chilensis	G C C T T T C C T C G T C T A A A T A A T T T G A G A T T T T G - - - - - G T T A C T T G T T C C G - - - - G C A T T G T T T T T G T T A T N A - - A G
AF231744.1 D. deceptus	G C T T T T C C T C G T T T G A A T A A T T T A A G G T T T T G - - - - - A T T G C T T G T T C C G - - - - G C G T T G T T T T T G T T A T T A - - A G
9 Diplodon sp	C G T A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T C G C C C - - - - - C C A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
8 Diplodon sp	C G T A T A T T C C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A G - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C T A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
7 Diplodon sp	C G C A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T T G C C C - - - - - C A A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
5 Diplodon sp	G C G C T T T T G T G A A C A A G A A A A A G A T G T C T T G C T T T A A G G T T G T T A A T T C G G A A - G C A T G A T G T G G G C C G C A C G G G
4 Diplodon sp	C G T A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C C A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
3 Diplodon sp	C G C A T A T T C C C A A A C A G G T T C C G A A A A A A T T A A A A A G - G T K A A G T A G T C C G C C A A A G T C A A T A G T A A G A G C C C C A G
23 Diplodon sp	C G C A T A T T C C C A A - C A G - - - T C G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C A A G A A T A G A A G A G G C C C C A G
22 Diplodon sp	C G C A T A T T C C C A A - C A G - - - T C G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C A A G A A T A G A A G A G G C C C C A G
21 Diplodon sp	C G C A T A T T C C C A A - C A G - - - T C G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C A A G A A T A G A A G A G G C C C C A G
20 Diplodon sp	C G C A T A T T C C C A A - C A G - - - T C G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C A A G A A T A G A A G A G G C C C C A G
20 Diplodon sp	C G C A T A T T C C C A A - C A G - - - T C G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C A A G A A T A G A A G A G G C C C C A G
2 Diplodon sp	C G T A T A T T C C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A G - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C T A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
19 Diplodon sp	C G C A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T T G C C C - - - - - C A A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
18 Diplodon sp	C G T A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T C G C C C - - - - - C C A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
17 Diplodon sp	C G C A T G T T A A A T A - C T G - - - T A G T A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T T G C T C - - - - - C A G C T A A A G A A G A T A C A C - A G
16-13 Diplodon sp	C G C A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T T G C C C - - - - - C A A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
15 Diplodon sp	C G C A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T T G C C C - - - - - C A A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
13-16 Diplodon sp	C G C A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T T G C C C - - - - - C A A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
12 Diplodon sp	C G T A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T C G C C C - - - - - C C A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
11 Diplodon sp	C G T A T A T T T C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A A - - - - T T A A T C G C C C - - - - - C C A G A A T T G A A G A A G C C C C A G
1 Diplodon sp	C G T A T A T T C C C C A - C A G - - - T T G A A A - - - - T A A A G - - - - T T A A T A G C C C - - - - - C T A G A A T T G A A G A A G C C C C A G

KU888263.1 D. suavidicus	T T T C T T G G T G A T G C C T A T A A T A A T T G G G G G G T T T G G G A A T T G G T T A A T T C C T T T A A T G C - - T C G G G G C T C C G G A T A T G
KU888242.1 C. ambigua	C T T T T T G G T G A T A C C T A T G A T A A T T G G T G G T T T T G G G A A T T G G T T G A T T C C T T T A A T G T - - T G G G G G C C C T G A T A T G
KP184899.1 D. demeraraensis	C T T T T T G G T A A T A C C A A T G A T G A T T G G G G G T T T T G G G A A T T G G T T A A T T C C T T T G A T G C - - T T G G G G T G C C T G A T A T G
KP184898.1 D. demeraraensis	C T T T T T G G T A A T A C C A A T G A T G A T T G G G G G T T T T G G G A A T T G G T T A A T T C C T T T G A T G C - - T T G G G G T G C C T G A T A T G
JN243889.1 C. ambigua	C T T T T T G G T G A T G C C A T A A A T G A T C G G G G G T T T T G G T A A T T G G T T A A T T C C T T T G A T G T - - T G G G G G C T C C T G A T A T A
DQ191410.1 D. chilensis	T T T C T T G G T T A N G C C A A T A A A T T G G G G G G T T T G G G A A C T G G T T G A N T C N N T T G A T G C - - T T G G G G C T C C N G A T A T G
AF231744.1 D. deceptus	C T T T T T G G T T A T A C C A A T G A T G A T T G G G G G G T T T G G G A A T T G G T T G A T T C C T T T A A T G C - - T T G G G G C T C C G G A T A T G
9 Diplodon sp	- A C C - - A A C A A T A C A - G C T G T A C T A C A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C C A A C C C A A C C G C A
8 Diplodon sp	- A C T - - A A C A A T A C A - G C T G T A C A G C A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C C A A C C C A A C C G C A
7 Diplodon sp	- A C G - - A G C A A T A C A - G C A G T C A C A G T A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C T A A C C C A A C C G C A
5 Diplodon sp	A A A G C A A G A C C A A T C A T T C C A G A C C A A A G C A A A C A T A C A A A T A A A G G T T C C A A T A T C T T A G A A A A T T T G T G G G A
4 Diplodon sp	- A C C - - A A C A A T A C A - G C T G T T A C T A C A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C C A A C C C A A C C G C A
3 Diplodon sp	- A C T - - A - A C A A C A C A - G C T G T G A C A G T A A C A G C C C A A A A C G A A C A A A G G A A T A C G T T C A G - C A A C C A A T C C A A C A G C A
23 Diplodon sp	- A C T - - A - A C A A C A C A - G C T G T G A C A G T A A C A G C C C A A A - C G A A C A A A G G A A T A C G T T C A G - C A A C C A A T C C A A C A G C A
22 Diplodon sp	- A C T - - A - A C A A C A C A - G C T G T A C A G T A A C A G C C C A A A - C G A A C A A A G G A A T A C G T T C A G - C A A C C A A T C C A A C A G C A
21 Diplodon sp	- A C T - - A G A C A A C A C A - G C T G T G A C A G T A A C A G C C C A A A - C G A A C A A A G G A A T A C G T T C A G - C A A C C A A T C C A A C A G C A
20 Diplodon sp	- A C T - - A - A C A A C A C A - G C T G T G A C A G T A A C A G C C C A A A - C G A A C A A A G G A A T A C G T T C A G - C A A C C A A T C C A A C A G C A
2 Diplodon sp	- A C T - - A A C A A T A C A - G C T G T A C A G C A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C C A A C C C A A C C G C A
19 Diplodon sp	- A C G - - A G C A A T A C A - G C A G T C A C A G T A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C T A A C C C A A C C G C A
18 Diplodon sp	- A C C - - A A C A A W A C A - G C T G T T A C T A C A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C C A A C C C A A C C G C A
17 Diplodon sp	- A A T - - A A T A A A A - A T G C T G T A A T T A A A C C G A T C A C A - C A A A T A A T G G T A A A C G A T G C A - T A T A C A T A C T G G - A G T A
16-13 Diplodon sp	A A C G G A A G C A A T A C A A G C A G T A C A G T A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C T A A C C C A A C C G C A
15 Diplodon sp	- A C G - - A G C A A T A C A - G C A G T C A C A G T A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C T A A C C C A A C C G C A
13-16 Diplodon sp	- A C G - - A G C A A T A C A - G C A G T C A C A G T A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C T A A C C C A A C C G C A
12 Diplodon sp	- A C C - - A A C A A T A C A - G C T G T T A C T A C A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C C A A C C C A A C C G C A
11 Diplodon sp	- A C C - - A A C A A T A C A - G C T G T A C C A C A A C A G C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C C A A C C C A A C C G C A
1 Diplodon sp	- A C T - - A A C A A T A C A - G C T G T A C T G T A A C A C C C A A A - T A A A C A A A G G A A T A C G C T C A G - C A A C C A A C C C A A C C G C A









**TABLA A6** Porcentajes de varianza aportados por cada Componente Principal (CP) en el Análisis de Componentes Principales de los ejemplares de *Diplodon* sp. del arroyo Yuquerí Grande.

CP	EIGENVALORES	% VARIANZA	% ACUMULADO
1	0,00578564	48,950	48,950
2	0,00244116	20,654	69,604
3	0,00162213	13,724	83,328
4	0,00071584	6,056	89,385
5	0,00040469	3,424	92,809
6	0,00023108	1,955	94,764
7	0,00015540	1,315	96,079
8	0,00008410	0,712	96,790
9	0,00008123	0,687	97,477
10	0,00006453	0,546	98,023
11	0,00005961	0,504	98,528
12	0,00004848	0,410	98,938
13	0,00002753	0,233	99,171
14	0,00002410	0,204	99,375
15	0,00002065	0,175	99,549
16	0,00001472	0,125	99,674
17	0,00001026	0,087	99,761
18	0,00000809	0,068	99,829
19	0,00000792	0,067	99,896
20	0,00000502	0,042	99,939
21	0,00000438	0,037	99,976
22	0,00000287	0,024	100,000
VARIANZA TOTAL	0,01181943		

## ANEXO

**TABLA A7** Eigenvalores y porcentajes de varianza aportados por cada Componente Principal (CP) en el Análisis de Componentes Principales de los ejemplares de *Diplodon delodontus* de Argentina.

CP	EIGENVALOR	% VARIANZA	% ACUMULADO	CP	EIGENVALOR	% VARIANZA	% ACUMULADO
1	0,00139759	26,065	26,065	32	0,00000196	0,037	99,781
2	0,00105925	19,755	45,821	33	0,00000169	0,031	99,813
3	0,0008832	16,472	62,293	34	0,00000149	0,028	99,841
4	0,00050147	9,353	71,645	35	0,00000137	0,026	99,866
5	0,0003279	6,115	77,761	36	0,00000113	0,021	99,887
6	0,00026017	4,852	82,613	37	0,00000097	0,018	99,905
7	0,00023322	4,35	86,962	38	0,00000081	0,015	99,92
8	0,00011732	2,188	89,151	39	0,00000071	0,013	99,934
9	0,00010102	1,884	91,035	40	0,00000059	0,011	99,945
10	0,00007418	1,383	92,418	41	0,00000045	0,008	99,953
11	0,00007048	1,314	93,732	42	0,00000041	0,008	99,961
12	0,00006019	1,123	94,855	43	0,00000038	0,007	99,968
13	0,00004251	0,793	95,648	44	0,00000031	0,006	99,974
14	0,00003525	0,657	96,305	45	0,0000003	0,006	99,979
15	0,00002803	0,523	96,828	46	0,00000024	0,005	99,984
16	0,0000263	0,491	97,319	47	0,0000002	0,004	99,987
17	0,00002212	0,413	97,731	48	0,00000015	0,003	99,99
18	0,00001827	0,341	98,072	49	0,00000013	0,002	99,993
19	0,0000166	0,31	98,382	50	0,00000011	0,002	99,995
20	0,00001236	0,231	98,612	51	0,00000008	0,002	99,996
21	0,00001122	0,209	98,821	52	0,00000006	0,001	99,997
22	0,00000895	0,167	98,988	53	0,00000005	0,001	99,998
23	0,00000753	0,141	99,129	54	0,00000004	0,001	99,999
24	0,00000672	0,125	99,254	55	0,00000002	0	99,999
25	0,00000599	0,112	99,366	56	0,00000001	0	99,999
26	0,00000503	0,094	99,46	57	0,00000001	0	100
27	0,00000419	0,078	99,538	58	0,00000001	0	100
28	0,00000354	0,066	99,604	59	0	0	100
29	0,00000291	0,054	99,658	60	0	0	100
30	0,00000251	0,047	99,705	61	0	0	100
31	0,00000215	0,04	99,745	62	0	0	100
				VARIANZA TOTAL	<b>0,00536186</b>		