Inferencias taxonómicas sobre las especies de lapas, *Patella* Linnaeus, 1758, presentes en los archipiélagos macaronésicos

Quintero J.[1], Araújo R.[2], Ferreira S.[2], González-Lorenzo G.[3], González-Henríquez N.[3], Medina C.[3], Manent P.[3], Sarmiento R.[3], Rey-Méndez M.[1] & González J.A.[3]

[1] Laboratorio de Sistemática Molecular, Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular, Universidade de Santiago de Compostela, CIBUS, Campus Vida, 15782-Santiago de Compostela, A Coruña, España.

[2] Museu de História Natural do Funchal/ Estação de Biologia Marinha do Funchal, Rua da Mouraria, 31, 9004-546 Funchal, Madeira, Portugal

[3] Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Biología, Campus de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria, 35017-Las Palmas, España.

INTRODUCCIÓN

El género *Patella* Linnaeus, 1758, incluye especies de moluscos intermareales cuya distribución abarca los archipiélagos oceánicos macaronésicos (Azores, Madeira, Canarias) y el de Cabo Verde. Estos archipiélagos muestran patrones filogeográficos paradigmáticos, constituyendo interesantes modelos para estudios evolutivos y ecológicos. El aislamiento oceánico en esas especies sésiles, con dependencia de los estadios larvarios por el mantenimiento del flujo génico, es en buena parte responsable de las discontinuidades genéticas que deben ser congruentes con la taxonomía de estas especies insulares (Quinteiro *et al.,* 2015).

La revisión del género llevada a cabo por Christiaens (1973) incluye a las especies que aparecen en los archipiélagos del Atlántico central-oriental: *Patella candei* d'Orbigny, 1839; *P. ulyssiponensis aspera* Röding, 1798; *Patella rustica* Linnaeus, 1758; *Patella (Patellastra) piperata* Gould, 1846; y la caboverdiana *Patella lugubris* Gmelin, 1791. Destaca la

"excesiva variabilidad" de *Patella candei* lo que conlleva la descripción de cuatro subespecies (Christiaens 1973): *P. candei candei* d'Orbigny, 1840; *P. candei gomesii* Drouet, 1858*; P. candei crenata* d'Orbigny, 1840; y *P. candei ordinaria* Mabille, 1888.

Una segunda revisión propone variaciones en el grupo *P. candei* (Titselaar 1998). Definiendo estos taxa para esas islas: *Patella gomesii* Drouet,1858; *P. candei* d'Orbigny, 1840; *P. tenuis crenata* d'Orbigny, 1840; *P. tenuis tenuis* Gmelin, 1791*; P. piperata* Gould, 1846; y *P. ulyssiponensis* Gmelin, 1791.

Diversos trabajos se han centrado en verificar, desde el punto de vista genético, la taxonomía propuesta para las especies macaronésicas (Côrte-Real *et al.,* 1996a, b; Weber and Hawkins 2002, 2005; Sá-Pinto *et al.*, 2005, 2008). Aunque ciertos aspectos parecen consensuarse, es necesaria una revisión actualizada con la inclusión de todos los datos genéticos actualmente disponibles.

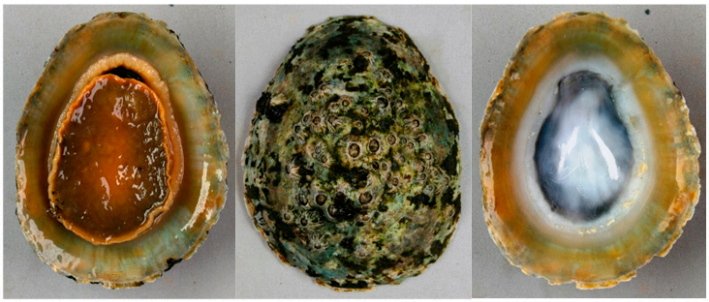
En este trabajo se revisó el etiquetado genético o barcoding mitocondrial de diversas poblaciones de lapas en las islas atlánticas orientales, incorporando nuevo material biológico exhaustivamente caracterizado morfológicamente. Las hipótesis taxonómicas actuales relativas a *P. candei* fueron evaluadas con un marcador nuclear alternativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

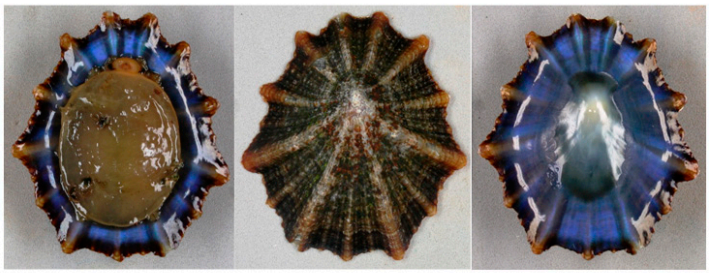
Se analizaron un total de 96 muestras individuales representativas de los archipiélagos considerados y morfotipos detectados (Fig. 1). Esta muestra constituye una submuestra representativa del muestreo completo llevado a cabo, entre otros, en el marco del proyecto BIOVAL, donde, por ejemplo, en el Archipiélago de Madeira fueron caracterizadas un total de 890 individuos (Araújo *et al.,* 2015). El ADN total fue aislado a partir de 30-50 mg de tejido del pie utilizando el kit EZNA Mollusk (Omega-Biotek). Un fragmento localizado en la primera mitad del gen mitocondrial COX1 fue amplificado con PATCOX1F1 diseñados específicamente para el género *Patella*.

Para cada linaje mitocondrial incluido dentro del taxón *Patella candei* fueron obtenidas secuencias correspondientes al ITS1. Para ello se llevó a cabo una amplificación inicial con los cebadores 28z-3' y 18d-5' (Palumbi, 1998) localizados en los genes 28S y 18 S rRNA, respectivamente. A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron los cebadores Pat-18S-1F/2R, Pat-18S-3F/4R específicos para el género *Patella*. Los productos de PCR de cada

localización/linaje fueron combinados, purificados y clonados con el kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega).



Patella candei d'Orbigny, 1840 de Selvagem Grande



Patella tenuis tenuis (Gmelin, 1791) de Madeira

Figura 1.- Ejemplo de los morfotipos considerados y muestreados dentro del género *Patella***,** presentes en los archipiélagos macaronésicos.

Los productos de PCR y de colony-PCR fueron secuenciados con BigDye Kit y resueltos en un secuenciador ABI 3730 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron revisadas, editadas y alineadas con Geneious (Kearse *et al.*, 2012). Los análisis y reconstrucciones filogenéticas preliminares fueron llevadas a cabo con MEGA (Kumar *et al.*, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvo un alineamiento consenso de 859 secuencias mitocondriales del gen COX1 de 499 pb de longitud, incluyendo 96 secuencias propias obtenidas en el presente muestreo y la totalidad de secuencias homólogas disponibles en el GenBank (N=769, fecha de acceso: 04/02/2015). No se detectan nuevos linajes respecto a los definidos por haplotipos previamente caracterizados (Sá-Pinto *et al*., 2005, 2008) (Fig.2).

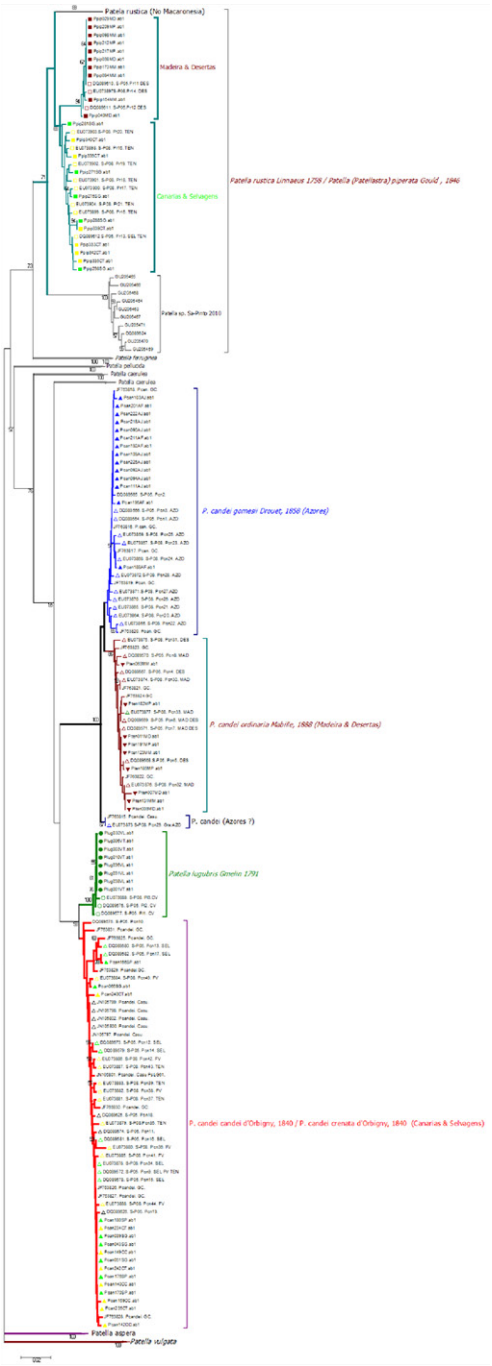


Figura 2.- Árbol filogenético. No se observa una agrupación monofilética de los alelos detectados en *P. candei* (azul) y en *P. lugubris* (verde). Grupo externo, *P. rustica* (morado).

Elaborado con Neighbor-joining a partir de las secuencias ITS1en el programa MEGA. Usadas 2.000 réplicas y el alelo de *P. rustica* como grupo externo. Se indica la pertenencia de cada alelo a individuos del correspondiente clado en la topología mitocondrial.

Se observan incongruencias entre la taxonomía actual y la filogenia mitocondrial estimada, considerando el concepto filogenético de especie (Cracraft, 1983), según el cual las especies constituyen grupos monofiléticos o clados bien definidos y soportados.

La especie *Patella piperata* Gould, 1846, con distribución macaronésica, presenta dos clados divergentes. Uno para el archipiélago de Madeira, incluyendo Madeira, Desertas y Porto Santo, y el segundo para las islas Canarias y Salvajes. Sin embargo ambos clados han sido clasificados previamente como *Patella rustica* (Linnaeus, 1758) con una amplia distribución mediterránea y atlántica, aunque es observable una divergencia entre las muestras continentales y las macaronésicas. Ya Christiaens (1973) indica la asignación a *P. rustica* de ejemplares de *P. piperata* de Madeira en referencias y colecciones museísticas. Ante esta situación se plantea la posibilidad de acotar el uso de *P. rustica* (Linnaeus, 1758) para las poblaciones atlánticas continentales y mediterráneas, y de *P. piperata* para las poblaciones de Canarias y Madeira. Las diferencias morfológicas no se han acompañado de una elevada divergencia alozímica, típicamente inter-específica, por lo que se ha considerado una subespecie de *P. rustica* (Côrte-Real *et al*., 1996a).

La especie *Patella candei* d'Orbigny, 1840, está distribuida por el Atlántico Norte, con la localidad tipo en la Orotava, Tenerife. La nomenclatura *Patella tenuis* Gmelin, 1791, es considerada "*nomen oblitum*" y sinonimia de la anterior, refiriéndose a una forma de *P. candei ordinaria* en Madeira (Christiaens, 1973). Además, para ambos taxa se han descrito diversas subespecies. Sin embargo en el presente trabajo ha sido incluido *P. tenuis* para considerar la presencia de morfotipos muy diferenciados y la hipótesis taxonómica de Titselaar (1998).

A partir de las secuencias mitocondriales se observan 3 clados divergentes dentro del grupo *candei*, en coincidencia con anteriores trabajos. Un clado incluye la población de Azores (Clado Ia), su clado hermano incluye las secuencias de Madeira y Desertas (Clado Ib), y un tercer clado divergente que incluye *P. candei* de Canarias y Salvajes (Clado II).

Las muestras del presente trabajo, originarias del archipiélago de Madeira y clasificadas como *P. tenuis*, portadoras de ese morfotipo, se agruparon en el segundo clado citado de *P. candei*. Estos datos mitocondriales avalan la hipótesis de la actual taxonomía.

La hipótesis de Christiaens (1973) no se ve completamente soportada por los datos mitocondriales. La población azoriana presenta una elevada divergencia mitocondrial congruente

con su separación como la subespecie *P. candei gomessi*. El clado que agrupa a las muestras de Madeira y Desertas coincidiría con la definición de la subespecie *P. candei ordinaria*, que incluiría la forma de *P. tenuis*. Sin embargo, las subespecies *P. candei candei* y *P. candei crenata*, analizadas a partir de muestras de Salvajes y Canarias, respectivamente, se localizan en el mismo clado sin divergencia alguna.

Destaca la incongruencia de la posición de clado de la caboverdiana *P. lugubris* como clado hermano del clado del linaje de Canarias *P. candei.* Ello invalidaría su clasificación como especie situándose como una población aislada de *P. candei*, localizada en el archipiélago de Cabo Verde.

Las hipótesis mitocondriales fueron valoradas mediante la secuenciación del ITS1 en muestras de *P. candei* (14 alelos A-N), usando además como grupo externo una muestra de *P. rustica/piperata* (1 alelo, RA). No se detectaron los patrones de divergencia, agrupamientos y tipologías obtenidas a partir del marcador mitocondrial COX1. Así, se han detectado alelos comunes en diferentes localizaciones geográficas/clados. Por ejemplo, el alelo CA, está presente en individuos de todas las áreas/clados muestreadas (Fig. 3).

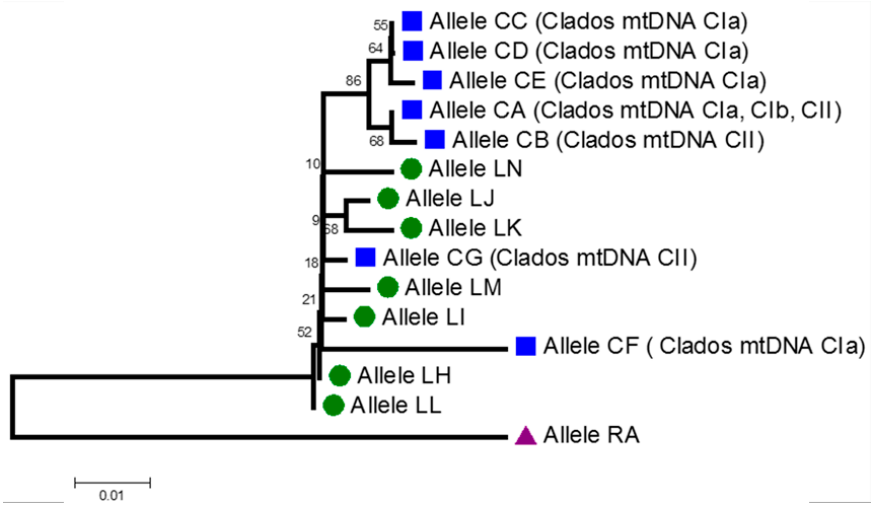


Figura 3.- Árbol filogenético. No se observa una agrupación monofilética de los alelos detectados en *P. candei* (azul) y en *P. lugubris* (verde). Grupo externo, *P. rustica* (morado). Elaborado con Neighbor-joining a partir de las secuencias ITS1en el programa MEGA. Usadas 2000 réplicas y el alelo de *P. rustica* como grupo externo.Se indica la pertenencia de cada alelo a individuos del correspondiente clado en la topología mitocondrial.

Los datos obtenidos no indican una partición taxonómica de *P. candei* que incluiría poblaciones/subespecies con un alto grado de aislamiento, previamente descritas. Sin embargo, las subespecies con morfotipos muy dispares *P. candei candei* y *P. candei crenata,* no muestran, con los datos obtenidos, los valores esperables de divergencia genética.

Tanto los datos mitocondriales (COX1) como nucleares (locus ITS1) indicarían la incongruencia de la actual taxonomía, ya que *P. candei* es un taxón parafilético. Debería incluir a *P. lugubris* como una población de *P. candei*.

La obtención de un mayor número de alelos ITS, marcadores nucleares alternativos, y/o la aplicación de secuenciación masiva a estos problemáticos taxa, permitirá confirmar estas inferencias iniciales.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto PCT-MAC BIOVAL (Programa MAC 2007-2013).

REFERENCIAS

Araújo R., Ferreira S., Quinteiro J., González N., Medina C., Manent P., Sarmiento R., González J.A., 2015. Genetic diversity of the species of genus Patella in Madeira archipelago: preliminary results of the PCT-MAC project BIOVAL Estuaries and Coastal Seas in a rapidly changing World (ECSA55), London, U.K.

Côrte-Real HBSM, Hawkins S.J., Thorpe J.P., 1996a. An Interpretation of the Taxonomic Relationship Between the Limpets Patella Rustica and P. Piperata. J Mar Biol Assoc UK 76: 717-732 doi doi:10.1017/S0025315400031416

Côrte-Real HBSM, Hawkins S.J., Thorpe J.P., 1996b. Population differentiation and taxonomic status of the exploited limpet Patella candei in the Macaronesian islands (Azores, Madeira, Canaries). Mar Biol 125: 141-152 doi 10.1007/BF00350768

Cracraft J., 1983. Species concepts and speciation analysis. In: Johnston RF (ed) Curr Ornithol. Plenum Press, New York, pp 159-187

Christiaens J., 1973. Révision du genre Patella (Mollusca, Gastropoda). Bulletin du Museum National d´Histoire Naturelle 3: 1305-1392

Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Mentjies P., Drummond A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics (Oxf) 28: 1647

Kumar S., Nei M., Dudley J., Tamura K., 2008. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinform 9: 299-306 doi 10.1093/bib/bbn017

Palumbi S.R., 1998. Nucleic acid II: the polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) Molecular systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Quinteiro J., Manent P., Pérez-Diéguez L., González J.A., Almeida C., Lopes E., Araújo R., Carreira G.P., Rey-Méndez M., González-Henríquez N., 2015. Phylogeography of a marine insular endemic in the Atlantic Macaronesia: The Azorean barnacle, Megabalanus azoricus (Pilsbry, 1916). PLoS ONE. 2015, 10(4), e0124707. doi:10.1371/journal.pone.0124707., pp 205-247

Sá-Pinto A., Branco M., Harris D.J., Alexandrino P.,2005. Phylogeny and phylogeography of the genus Patella based on mitochondrial DNA sequence data. J Exp Mar Biol Ecol 325: 95-110

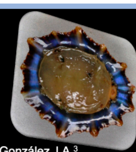
Sá-Pinto A., Branco M., Sayanda D., Alexandrino P., 2008. Patterns of colonization, evolution and gene flow in species of the genus Patella in the Macaronesian Islands. Mol Ecol 17: 519-532 doi 10.1111/j.1365-294X.2007.03563.x

Titselaar F., 1998. A revision of the recent European Patellidae (Mollusca: Gastropoda): 1. The Patellidae of the Azores, Madeira, the Selvagens and the Canary Islands. Vita Mar 45: 21-62

Weber L.I., Hawkins S.J., 2002. Evolution of the limpet Patella candei d'Orbigny (Mollusca, Patellidae) in Atlantic archipelagos: human intervention and natural processes. Biol J Linn Soc 77: 341-353 doi 10.1046/j.1095-8312.2002.00102.x

Weber L.I., Hawkins S.J., 2005. Patella aspera and P. ulyssiponensis: genetic evidence of speciation in the North-east Atlantic. Mar Biol 147: 153-162

Inferencias taxonómicas sobre las especies de lapas, *Patella* Linnaeus, 1758, presentes en los archipiélagos macaronésicos



Quintero J.[1], Araújo R.[2], Ferreira S.[2], González-Lorenzo G.[3], González-Henríquez N.[3], Medina C.[3], Manent P.[3], Sarmiento R.[3], Rey-Méndez M.[1] & González J.A.[3]

[1] Laboratorio de Sistemática Molecular, Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular, Universidade de Santiago de Compostela, CIBUS, Campus Vida, 15782-Santiago de Compostela, A Coruña, Spain.
[2] Museu de História Natural do Funchal/ Estação de Biologia Marinha do Funchal, Rua da Mouraria, 31, 9004-546 Funchal, Madeira, Portugal
[3] Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Biología, Campus de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria, 35017-Las Palmas, Spain

Introducción

El género *Patella* Linnaeus, 1758, incluye especies de moluscos intermareales cuya distribución abarca los archipiélagos oceánicos macaronésicos (Azores, Madeira, Canarias) y de Cabo Verde. Estos archipiélagos muestran patrones filogeográficos paradigmáticos, constituyendo interesantes modelos para estudios evolutivos y ecológicos. El aislamiento oceánico en esas especies sésiles, con dependencia de los estadios larvarios por el mantenimiento del flujo génico, es en buena parte responsable de las discontinuidades genéticas que deben ser congruentes con la taxonomía de estas especies insulares (Quinteiro et al. 2015).

La revisión del género llevada a cabo por Christiaens (1973) incluye a las especies que aparecen en los archipiélagos del Atlántico central-nordeste: *Patella candei* d'Orbigny, 1839; *P. ulyssiponensis aspera* Röding, 1798; *Patella rustica* Linnaeus, 1758; *Patella (Patellastra) piperata* Gould, 1846; y la caboverdiana *Patella lugubris* Gmelin, 1791. Destaca la "excesiva variabilidad" de *Patella candei* lo que conlleva la descripción de cuatro subespecies (Christiaens 1973): *P. candei candei* d'Orbigny, 1840; *P. candei gomesii* Drouet, 1858; *P. candei crenata* d'Orbigny, 1840; y *P. candei ordinaria* Mabille, 1888.

Una segunda revisión propone variaciones en el grupo *P. candei* (Titselaar 1998). Definiendo estos taxa para esas islas: *Patella gomesii* Drouet,1858; *P. candei* d'Orbigny, 1840; *P. tenuis crenata* d'Orbigny, 1840; *P. tenuis tenuis* Gmelin, 1791; *P. piperata* Gould, 1846; y *P. ulyssiponensis* Gmelin, 1791.

Diversos trabajos se han centrado en verificar, desde el punto de vista genético, la taxonomía propuesta para las especies macaronésicas (Côrte-Real et al. 1996a, b; Weber and Hawkins 2002, 2005; Sá-Pinto et al. 2005, 2008). Aunque ciertos aspectos parecen consensuarse es necesario una revisión actualizada con la inclusión de todos los datos genéticos actualmente disponibles.

En este trabajo se revisó el etiquetado genético o barcoding mitocondrial de diversas poblaciones de lapas en las islas atlánticas orientales, incorporando nuevo material biológico exhaustivamente caracterizado morfológicamente. Las hipótesis taxonómicas actuales relativas a *P. candei* fueron evaluadas con un marcador nuclear alternativo.

Materiales y Métodos

Se analizaron un total de 96 muestras individuales representativas de los archipiélagos considerados y morfotipos detectados. Esta muestra constituye una submuestra representativa del muestreo completo llevado a cabo, entre otros en el marco del proyecto BIOVAL, dónde, por ejemplo, en el Archipiélago de Madeira fueron caracterizadas un total de 890 individuos (Araújo et al. 2015). El ADN total fue aislado a partir de 30-50 mg de tejido del pie utilizando el kit EZNA Mollusk (Omega-Biotek). Un fragmento localizado en la primera mitad del gen mitocondrial COX1 fue amplificado con PATCOX1F1 diseñados específicamente para el género *Patella*.

Para cada linaje mitocondrial incluido dentro del taxón *Patella candei* fueron obtenidas secuencias correspondientes al ITS1. Para ello se llevó a cabo una amplificación inicial con los cebadores 28z-3' y 18d-5' (Palumbi 1998) localizados en los genes 28S y 18 S rRNA, respectivamente. A partir de las secuencias obtenidas se diseñaron los cebadores Pat-18S-1F/2R, Pat-18S-3F/4R específicos para el género *Patella*. Los productos de PCR de cada localización/linaje fueron combinados, purificados y clonados con el kit pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega).

Los productos de PCR y de colony-PCR fueron secuenciados con BigDye Kit y resueltos en un secuenciador ABI 3730 (Applied Biosystems). Las secuencias fueron revisadas, editadas y alineadas con Geneious (Kearse et al. 2012). Los análisis y reconstrucciones filogenéticas preliminares fueron llevadas a cabo con MEGA (Kumar et al. 2008).

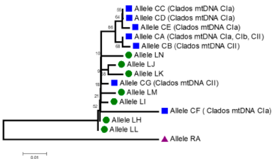


Figura 2. Árbol filogenético. No se observa una agrupación monofilética de los alelos detectados en P. candei (azul) y en P. lugubris (verde). Grupo externo, P. rustica (morado). Elaborado con Neighbor-joining a partir de las secuencias ITS1en el programa MEGA. Usadas 2000 réplicas y el alelo de P. rustica como grupo externo.Se indica la pertenencia de cada alelo a individuos del correspondiente clado en la topología mitocondrial.

Referencias

Araújo R, Ferreira S, Quinteiro J, González N, Medina C, Manent P, Sarmiento R, González JA (2015) Genetic diversity of the species of genus Patella in Madeira archipelago: preliminary results of the PCT-MAC project BIOVAL Estuaries and Coastal Seas in a rapidly changing World (ECSA55), London, U.K.

Côrte-Real HBSM, Hawkins SJ, Thorpe JP (1996a) An Interpretation of the Taxonomic Relationship Between the Limpets Patella Rustica and P. Piperata. J Mar Biol Assoc UK 76: 717-732 doi doi:10.1017/S0025315400031416

Côrte-Real HBSM, Hawkins SJ, Thorpe JP (1996b) Population differentiation and taxonomic status of the exploited limpet Patella candei in the Macaronesian islands (Azores, Madeira, Canaries). Mar Biol 125: 141-152 doi 10.1007/BF00350768

Cracraft J (1983) Species concepts and speciation analysis. In: Johnston RF (ed) Curr Ornithol. Plenum Press, New York, pp 159-187

Christiaens J (1973) Révision du genre Patella (Mollusca, Gastropoda). Bulletin du Museum National d'Histoire Naturelle 3: 1305-1392

Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics (Oxf) 28: 1647

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. Brief Bioinform 9: 299-306 doi 10.1093/bib/bbn017

Palumbi SR (1996) Nucleic acid II: the polymerase chain reaction. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds) Molecular systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Quinteiro J, Manent P, Pérez-Diéguez L, González JA, Almeida C, Lopes E, Araújo R, Carreira GP, Rey-Méndez M & González-Henríquez N (2015) Phylogeography of a marine insular endemic in the Atlantic Macaronesia: The Azorean barnacle, Megabalanus azoricus (Pilsbry, 1916). PLoS ONE. 2015; 10(4), e0124707. doi:10.1371/journal.pone.0124707., pp 205-247

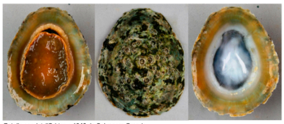
Sá-Pinto A, Branco M, Harris DJ, Alexandrino P (2005) Phylogeny and phylogeography of the genus Patella based on mitochondrial DNA sequence data. J Exp Mar Biol Ecol 325: 95-110

Sa-Pinto A, Branco M, Sayanda D, Alexandrino P (2008) Patterns of colonization, evolution and gene flow in species of the genus Patella in the Macaronesian Islands. Mol Ecol 17: 519-532 doi 10.1111/j.1365-294X.2007.03563.x

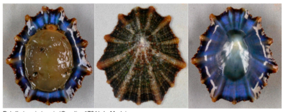
Titselaar F (1998) A revision of the recent European Patellidae (Mollusca: Gastropoda): 1. The Patellidae of the Azores, Madeira, the Selvagens and the Canary Islands. Vita Mar 45: 21-62

Weber LI, Hawkins SJ (2002) Evolution of the limpet Patella candei d'Orbigny (Mollusca, Patellidae) in Atlantic archipelagos: human intervention and natural processes. Biol J Linn Soc 77: 341-353 doi 10.1046/j.1095-8312.2002.00102.x

Weber LI, Hawkins SJ (2005) Patella aspera and P. ulyssiponensis: genetic evidence of speciation in the North-east Atlantic. Mar Biol 147: 153-162



Patella candei d'Orbigny, 1840 de Selvagem Grande



Patella tenuis tenuis (Gmelin, 1791) de Madeira

Resultados y Discusión

Se obtuvo un alineamiento consenso de 859 secuencias mitocondriales del gen COX1 de 499 pb de longitud, incluyendo 96 secuencias propias obtenidas en el presente muestreo y la totalidad de secuencias homólogas disponibles en el GenBank (N=769, fecha de acceso: 04/02/2015). No se detectan nuevos linajes respecto a los definidos por haplotipos previamente caracterizados (Sá-Pinto et al. 2005, 2008) (Fig.1).

Se observan incongruencias entre la taxonomía actual y la filogenia mitocondrial estimada, considerando el concepto filogenético de especie (Cracraft 1983), según el cual las especies constituyen grupos monofiléticos o clados bien definidos y soportados.

La especie *Patella piperata* Gould, 1846 con distribución macaronésica, presenta dos clados divergentes. Uno para para el archipiélago de Madeira, incluyendo Madeira, Desertas y Porto Santo, y el segundo para las islas Canarías y Salvajes. Sin embargo ambos clados han sido clasificados previamente como *Patella rustica* (Linnaeus, 1758) con una amplia distribución Mediterránea y Atlántica, aunque es observable una divergencia entre las muestras continentales y las macaronésicas. Ya Christiaens (1973) indica la asignación a *P. rustica* de ejemplares de *P. piperata* de Madeira en referencias y colecciones museísticas. Ante esta situación se plantea la posibilidad de acotar el uso de *P. rustica* (Linnaeus 1758) para las poblaciones atlánticas continentales y mediterráneas, y de *P. piperata* para las poblaciones de Canarias y Madeira. Las diferencias morfológicas no se han acompañado de una elevada divergencia alozímica, típicamente inter-específica, por lo que se ha considerado una subespecie de *P. rustica* (Côrte-Real et al. 1996a).

La especie *Patella candei* d'Orbigny, 1840, está distribuida por el Atlántico Norte, con la localidad tipo en la Orotava, Tenerife. La nomenclatura *Patella tenuis* Gmelin, 1791 es considerada "nomen oblitum" y sinonimia de la anterior, refiriéndose a una forma de *P. candei ordinaria* en Madeira (Christiaens 1973). Además, para ambos taxa se han descrito diversas subespecies. Sin embargo en el presente trabajo ha sido incluido *P. tenuis* para considerar la presencia de morfotipos muy diferenciados y la hipótesis taxonómica de Titselaar (1998).

A partir de las secuencias mitocondriales se observan 3 clados divergentes dentro del grupo *candei*, en coincidencia con anteriores trabajos. Un clado incluye la población de Azores (Clado Ia), su clado hermano incluye las secuencias de Madeira y Desertas (Clado Ib), y un tercer clado divergente que incluye *P. candei* de Canarias y Salvajes (Clado II).

Las muestras del presente trabajo, originarias del archipiélago de Madeira y clasificadas como *P. tenuis*, portadoras de ese morfotipo, se agruparon en el segundo clado citado de *P. candei*. Estos datos mitocondriales avalan la hipótesis de la actual taxonomía.

La hipótesis de Christiaens (1973) no se ve completamente soportada por los datos mitocondriales. La población azoriana presenta una elevada divergencia mitocondrial congruente con su separación como la subespecie *P. candei gomessi*. El clado que agrupa a las muestras de Madeira y Desertas coincidiría con la definición de la subespecie *P. candei ordinaria*, que incluiría la forma de *P. tenuis*. Sin embargo, las subespecies *P. candei candei* y *P. candei crenata*, analizadas a partir de muestras de Salvajes y Canarias, respectivamente, se localizan en el mismo clado sin divergencia alguna.

Destaca la incongruencia de la posición de clado de la caboverdiana *P. lugubris* como clado hermano del clado del linaje de Canarias *P. candei*. Ello invalidaría su clasificación como especie situándose como una población aislada de *P. candei*, localizada en el archipiélago de Cabo Verde.

Las hipótesis mitocondriales fueron valoradas mediante la secuenciación del ITS1 en muestras de *P. candei* (14 alelos A-N), usando además como grupo externo una muestra de *P. rustica/piperata* (1 alelo, RA). No se detectaron los patrones de divergencia, agrupamientos y tipologías obtenidas a partir del marcador mitocondrial COX1. Así, se han detectado alelos comunes en diferentes localizaciones geográficas/clados. Por ejemplo, el alelo CA, está presente en individuos de todas las áreas/clados muestreadas (Fig. 2).

Los datos obtenidos no indican una partición taxonómica de *P. candei* que incluiría poblaciones/subespecies con un alto grado de aislamiento, previamente descritas. Sin embargo, las subespecies, con morfotipos muy dispares, *P. candei candei* y *P. candei crenata* no muestran, con los datos obtenidos, los valores esperables de divergencia genética.

Tanto los datos mitocondriales (COX1) como nucleares (locus ITS1) indicarían la incongruencia de la actual taxonomía, ya que *P. candei* es un taxón parafilético. Debería incluir a *P. lugubris* como una población de *P. candei*.

La obtención de un mayor número de alelos ITS, marcadores nucleares alternativos, y/o la aplicación de secuenciación masiva a estos problemáticos taxa, permitirá confirmar estas inferencias iniciales.

BIOVAL es un Proyecto de investigación y Colaboración cofinanciado por EU-ERDF en el marco del Programa de Cooperación Transnacional Madeira-Açores-Canarias (PCT-MAC 2007-2013).

PROGRAMA MAC 2007 - 2013 Cooperação Transnacional

União Europeia
Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional

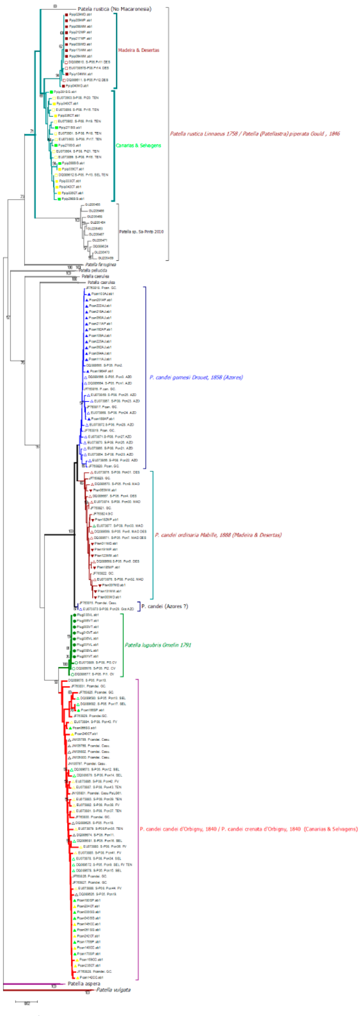


Figura 1.. Árbol filogenético . No se observa una agrupación monofilética de los alelos detectados en P. candei (azul) y en P. lugubris (verde). Grupo externo, P. rustica (morado). Elaborado con Neighbor-joining a partir de las secuencias ITS1en el programa MEGA. Usadas 2000 réplicas y el alelo de P. rustica como grupo externo.Se indica la pertenencia de cada alelo a individuos del correspondiente clado en la topología mitocondrial.