



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

FILOGENIA MOLECULAR DE CARACOLES ACUATICOS
LITTORINIMORPHA, RISSOOIDEA E HYDROBIIDAE CON
ENFASIS EN LA MALACOFUNA ENDEMICA DE CUATRO
CIENEGAS COAHUILA, MEXICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
OSIRIS YURIKO RIOS VARGAS



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LUISA ISaura FALCON ALVAREZ

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

m 342266



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Filogenia molecular de caracoles acuáticos Littorinimorpha, Rissooidea e Hydrobiidae con énfasis en la malacofauna endémica de Cuatro Ciénegas Coahuila, México.

realizado por Osiris Yuriko Ríos Vargas.

con número de cuenta 9528585-0 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Luisa Isaura Falcón Alvarez. *Luisa I. Falcón A.*

Propietario

Dra. Valeria Souza Saldivar. *Valeria Souza*

Propietario

Dra. Edna Naranjo García. *Edna Naranjo A.*

Suplente

Dr. Francisco Javier Vega Vera. *FJ*

Suplente

Dr. Fernando Alvarez Noguera. *Fernando Alvarez*

Consejo Departamental de Biología.

Juan Manuel Rodríguez Chávez
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.

FACULTAD DE CIENCIAS



**UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA**

A mi familia, por todo el apoyo y cariño que me han brindado.

Agradecimientos

Quiero agradecer de todo corazón a mis padres, Guadalupe Vargas y Marcos Ríos quienes me han apoyado incondicionalmente durante toda mi vida.

A mis hermanos, Aldo y Rodrigo por su comprensión y cariño, sean dinámicos en todas sus actividades pues de ese modo lograran todas sus metas.

A mi directora de tesis, Dra. Luisa Isaura Falcón Alvarez por la asesoría tan profesional que recibí de ella, por sus buenos consejos y amistad.

A la Dra. Valeria Souza Saldívar por todas las facilidades que otorgó para la realización de esta obra y por la confianza que tuvo en mí.

A mis sinodales: Dra. Edna Naranjo García, Francisco Javier Vega Vera, Valeria Souza Saldívar y Fernando Alvarez Noguera por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Francisco Javier Vega Vera por las fotografías tan bonitas que tomó de los caracoles colectados en Churince y que sirvieron para ilustrar esta obra.

A Felipe Villegas Márquez dibujante del Instituto de Biología UNAM por ayudarme a dibujar el mapa de Cuatro Ciénegas (Fig.4).

También quiero agradecer la colaboración del Dr. Evan Carson, Arizona State University, por la valiosa información que proporcionó de Cuatro Ciénegas y por ayudar en la colecta de caracoles.

Quisiera agradecer a todos los integrantes del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología UNAM por la compañía tan agradable que resultaron ser durante mi estancia en dicho laboratorio, los llevaré siempre en mi memoria.

A todos, en verdad ¡mil gracias!

Filogenia molecular de caracoles acuáticos Littorinimorpha, Rissoidae e Hydrobiidae con énfasis en la malacofauna endémica de Cuatro Ciénegas Coahuila, México.

Índice

Resumen

Abstract

Introducción

La malacofauna de Cuatro Ciénegas

Diversidad.....	1
Ecología.....	2
Estudios previos.....	4
Clasificación de caracoles hidróbidos Rissoidae, Hydrobiidae	7
El uso de CO1 como marcador molecular en estudios de sistemática	10

Objetivos

Objetivo general	11
Objetivo particular.....	11

Hipótesis.....	11
-----------------------	-----------

Área de estudio

La Cuenca de Cuatro Ciénegas Coahuila, México.

Ubicación.....	12
Fisiografía e historia geológica.....	12
Hidrología.....	13
El sistema acuático Churince.....	15

Materiales y Métodos

Obtención de especímenes.....	16
Extracción del ADN y amplificación de CO1.....	17
Secuenciación	18
Alineación.....	18
Análisis genealógicos	19

Resultados.....

Relación genealógica de especies clasificadas dentro del infraorden Littorinimorpha mediante secuencias parciales de ADN mitocondrial (región CO1).....	22
---	----

Relación genealógica de especies clasificadas dentro de la superfamilia Rissooidea mediante secuencias parciales de ADN mitocondrial (región CO1).....	26
--	----

Relación genealógica de especies clasificadas dentro de las subfamilias Littoridininae y Nymphophilinae distribuidas en el NE de México y sur de Estados Unidos mediante secuencias parciales de ADN mitocondrial (región CO1).....	30
---	----

Discusión.....

Aspectos del marcador molecular CO1.....	34
Análisis genealógicos.....	36
Implicaciones biogeográficas y de conservación.....	41

Perspectivas.....

Conclusiones.....

Bibliografía.....

Anexos.....

Lista de Figuras

- Figura 1. Variación de la concha a nivel intraespecífico de *Mexipyrgus churinceanus* dentro del sistema Churince, Cuatro Ciénegas. (A, “Laguna Intermedia ” B, “Río Churince” C, “Poza Churince”)..... 3
- Figura 2. Concha de *Mexithauma quadripaludium* del sistema Churince..... 4
- Figura 3 Concha de *Nymphophilus minckleyi* del sistema Churince..... 4
- Figura 4 Mapa que representa la ubicación e hidrología de la Cuenca de Cuatro Ciénegas. Tomado de Badino *et al.* (2004) (con modificaciones)..... 14
- Figura 5.1 Genealogía obtenida con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen CO1 para especies dentro del infraorden Littorinimorpha. Los valores de bootstrap aparecen cuando estos son mayores a 60%..... 23
- Figura 5.2 Genealogía obtenida con el método de distancias neighbor joining a partir del gen CO1 para especies dentro del infraorden Littorinimorpha. Los valores de bootstrap aparecen cuando estos son mayores a 60%..... 25
- Figura 6.1 Genealogía obtenida con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen CO1 para especies de la superfamilia Rissoidae. Los valores de bootstrap aparecen cuando estos son mayores a 60%..... 27
- Figura 6.2 Genealogía obtenida con el método de distancia neighbor joining a partir de secuencias del gen CO1 para especies de la superfamilia Rissoidae. Los valores de bootstrap aparecen cuando estos son mayores a 60%..... 29
- Figura 7.1 Genealogía obtenida con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen CO1 para especies de la familia Hydrobiidae endémicas de Cuatro Ciénegas y sur de Estados Unidos. Los valores de bootstrap aparecen cuando son mayores a 60%. Las especies con doble asterisco habitan ambientes estuarinos de la costa este de Norte América..... 31

Figura 7.2 Genealogía obtenida con el método de distancias neighbor joining a partir de secuencias del gen CO1 para especies de la familia Hydrobiidae endémicas de Cuatro Ciénegas y sur de Estados Unidos. Los valores de bootstrap aparecen cuando son mayores a 60%. Las especies con doble asterisco habitan ambientes estuarinos de la costa este de Norte América..... 33

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Géneros de caracoles acuáticos que se pueden encontrar en Cuatro Ciénegas (tomado de Hershler, 2000)..... 2

Cuadro 2. Taxonomía de *Mexipyrgus churinceanus* y *Mexithauma quadripaludium* (tomado de Hershler, 2000)..... 6

Cuadro 3. Clasificaciones previas de los caracoles hidróbidos..... 9

Cuadro 4. Sitios de colecta en el sistema Churince..... 17

Cuadro 5. Oligonucleótidos usados para amplificar secuencias de ADN de CO1..... 17

Cuadro 6. Productos amplificados con los primers COIL1492 y COIH2390..... 18

Cuadro 7. Composición nucleotídica de las secuencias seleccionadas..... 21

Resumen

Caracoles pertenecientes a la familia Hydrobiidae, endémicos de la Cuenca de Cuatro Ciénegas (CCC), fueron colectados en cinco sitios de muestreo en el sistema acuático Churince con el objetivo de realizar un estudio de sistemática molecular. Se usaron secuencias parciales de ácido desoxirribonucleico (ADN) del gen mitocondrial que codifica para la subunidad 1 de la enzima Citocromo Oxidasa (CO1) para cumplir con dicho objetivo. Al aplicar técnicas de biología molecular, se lograron obtener 23 secuencias de ADN de *Mexipyrgus churinceanus* y 20 secuencias de ADN de *Mexithauma quadripaludium*; cada una de las secuencias obtenidas proviene de diferentes individuos. En el conjunto de las secuencias obtenidas para *M. churinceanus* se encontró un solo haplotipo, de igual forma se encontró uno solo para las secuencias de *M. quadripaludium*. Estos haplotipos (dos), se analizaron con 66 secuencias de CO1 que corresponden a especies que representan familias dentro del infraorden Littorinimorpha, dichas secuencias provienen de una base de datos genéticos (GenBank). Se aplicaron métodos de inferencia genealógica como: Máxima Parsimonia (MP) y distancias Neighbor Joining (NJ). Como grupos externos, se seleccionaron cuatro secuencias de especies que representan a la familia Truncatellidae y una correspondiente a la familia Turbinellidae. Ambos métodos genealógicos concuerdan en que hay dos grupos monofiléticos: 1) un clado que contiene a todos los taxones de la subfamilia Littoridininae de Norte América (incluyendo a *Mexipyrgus* y *Mexithauma*) y 2) un clado que contiene a los taxones de Nymphophilinae de Norte América. Las genealogías obtenidas colocan a la familia Hydrobiidae como polifilética. Se sugiere que la alta diversidad de caracoles en Cuatro Ciénegas, sea el resultado de la evolución de poblaciones ancestrales (probablemente caracoles de hábitat marino-estuarino) que quedaron aisladas en el Paleoceno, Neoceno (Kabat y Hershler, 1993), a la hidrografía cambiante debido a procesos geológicos de elevación y plegamiento, cuellos de botella genéticos, cambio climático, distintos tipos de interacciones ecológicas con otras especies y la baja capacidad de dispersión que tienen estos organismos.

Abstract

Hydrobiidae snails endemic from the Cuatro Ciénegas Basin (CCB) were collected from five sampling points along the Churince system to perform a molecular systematics study using partial DNA sequences of the mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I gene (CO1). Molecular biology methods were applied and twenty-three partial DNA sequences from different individuals of *Mexipyrgus churinceanus* were obtained as well as 20 partial DNA sequences from different individuals of *Mexithauma quadripaludium*. A single haplotype was found in the set of *M. churinceanus* and *M. quadripaludium* sequences. Those haplotypes (two) were included with a set of 66 partial CO1 DNA sequences which included representatives of families within the Littorinimorpha infraorder those sequences were obtained from the Gen Bank. Methods of genealogic inference, Maximum Parsimony (MP) and distance Neighbor Joining (NJ) were applied. Four sequences of Truncatellidae taxa and one sequence of Turbinellidae were selected as outgroups. Both approaches resolved two monophyletic groups: (1) a clade containing all Littoridininae taxa from North America (including *Mexipyrgus* and *Mexithauma*) and (2) a clade containing the Nymphophilinae taxa from North America. Genealogies also show that the Hydrobiidae family is polyphyletic. These results suggest that the snail diversity found in CCB is the result of evolution of ancient populations from marine-estuarine habitats that were isolated during the Paleocene, Neocene (Kabat y Hershler, 1993) by the changing hydrographic landscape due to geomorphologic processes, climatic change, genetic bottlenecks, low dispersal capability of aquatic snails and other ecological interactions.

Introducción

La malacofauna de Cuatro Ciénegas, Coahuila

Diversidad

Los ecosistemas acuáticos del desierto son sitios de una elevada diversidad biológica, la mayor parte endémica, debido a las condiciones ambientales estables y al aislamiento geográfico (a largo plazo) con otros sistemas acuáticos (Shepard, 1993; O'Brien y Blinn, 1999). Cuatro Ciénegas posee una malacofauna especialmente abundante en endemismos al ser comparada con otros sistemas acuáticos en otros desiertos (Minckley, 1984). Por ejemplo, Ash Meadows, Nevada, USA posee cinco especies de moluscos endémicas (Williams *et al.*, 1985; Deacon y Williams, 1991). Otro sitio con el que se ha comparado a Cuatro Ciénegas es Dalhousie Springs, Australia el cual contiene seis especies de moluscos endémicas (Moline *et al.*, 2004).

En Cuatro Ciénegas se reconocen actualmente 13 especies de caracoles, de las cuales nueve son endémicas (Hershler, 1985). Dichas especies se encuentran agrupadas en nueve géneros, seis de estos son exclusivos de Cuatro Ciénegas. Estos géneros a su vez, se clasifican dentro de dos subfamilias: Littoridininae y Nymphophilinae (Cuadro 1). Ambas subfamilias son integrantes de la familia Hydrobiidae la cual contiene casi 400 nombres de géneros válidos en uso distribuidos en todo el mundo (Kabat y Hershler, 1993). Los caracoles de la familia Hydrobiidae son pequeños, usualmente no mayores a un centímetro, aunque hay algunas especies que pueden llegar a medir cinco centímetros. La mayoría de los taxones habitan ambientes dulceacuícolas y estuarinos (Kabat y Hershler, 1993).

Cuadro 1. Géneros de caracoles acuáticos que se pueden encontrar en Cuatro Ciénegas (tomado de Hershler, 2000).

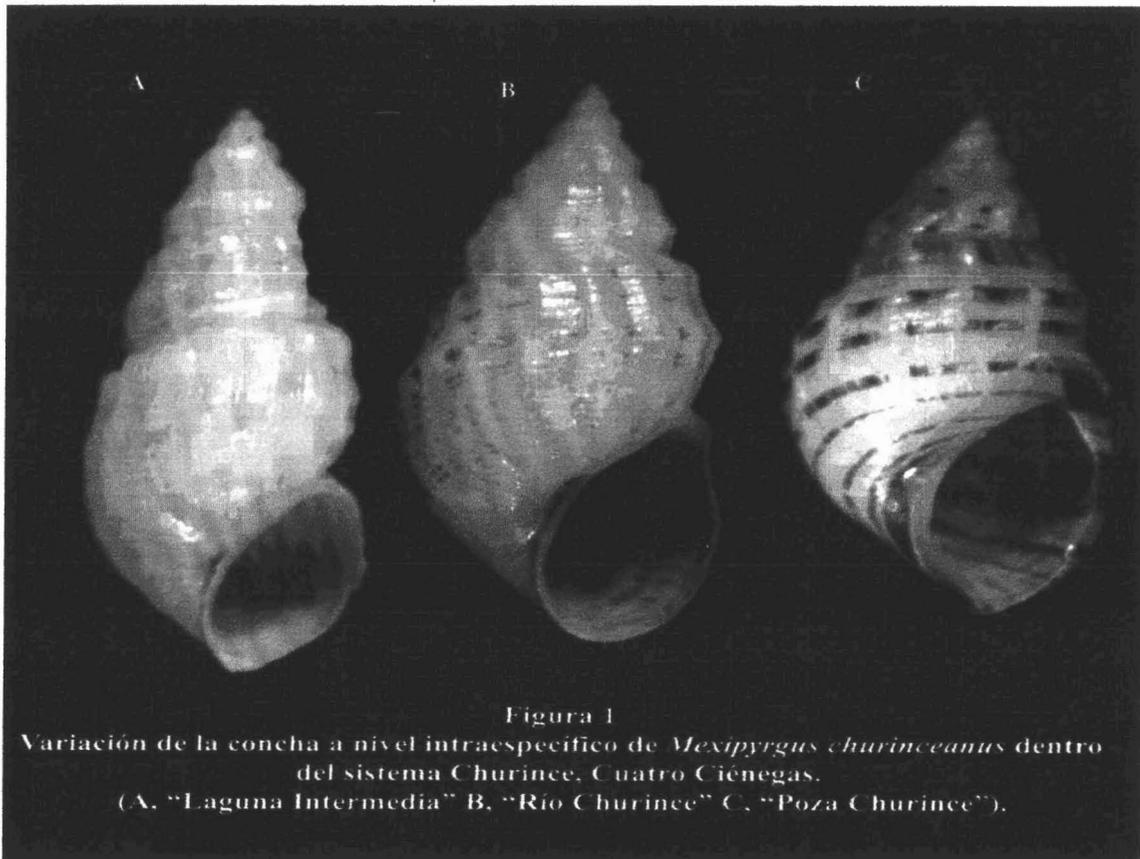
Subfamilia Littoridininae: * <i>Paludiscala</i> * <i>Coahuilix</i> * <i>Mexithauma</i> <i>Cochliopina</i> <i>Durangonella</i> * <i>Mexipyrgus</i> <i>Origoceras</i>	Subfamilia Nymphophilinae: * <i>Nymphophilus</i> * <i>Stobia</i>
--	--

* Géneros endémicos de Cuatro Ciénegas

Ecología

La malacofauna de Cuatro Ciénegas es estrictamente acuática y se encuentra repartida en grupos dentro de tres tipos de hábitats (Hershler, 2000). El primer grupo corresponde a las especies con conchas grandes y gruesas que habitan en pozas grandes y las corrientes asociadas a estas. El segundo grupo corresponde a las especies diminutas, ciegas y sin pigmentación que están restringidas a manantiales pequeños de aguas subterráneas termales. Un tercer grupo habita arroyos asociados a pozas pequeñas.

Las pozas grandes contienen una considerable diversidad de micro-hábitats por ejemplo, el fondo de estos sistemas tiene sedimento suave compuesto por una mezcla de fragmentos de conchas, desechos de caracol, detrito de algas a menudo mezclado con pequeñas piezas de travertino. *Mexipyrgus churinceanus* (Fig. 1) prefiere este tipo de micro-hábitat en el que se le puede encontrar enterrado alcanzando altas densidades. Esta especie se caracteriza por poseer un alto grado de polimorfismo en los caracteres de la concha. *Mexithauma quadripaludium* (Fig. 2) prefiere los sustratos rocosos mientras que *Nymphophilus minckleyi* (Fig. 3) prefiere los micro-hábitats que se crean entre las plantas acuáticas como *Nymphaea* sp., *Chara* sp. y *Utricularia* sp. (Minckley, 1969).



Las pozas pequeñas, son alimentadas por manantiales probablemente asociados a actividad geotérmica (Evan Carson, Arizona State University com. pers.). La temperatura del agua descargada en estas pozas es de 29-33° C y la diversidad de microhábitats es reducida en comparación con las pozas grandes. El fondo de estos sistemas está compuesto por una mezcla de arena, lodo orgánico y travertinos, la vegetación es riparia y puede llegar a cubrir parte o toda la superficie acuática. Los caracoles que se pueden encontrar en estas pozas generalmente están restringidos a la cercanía del manantial. Estos caracoles son ciegos, no pigmentados y de concha relativamente frágil y suave, por ejemplo: *Paludiscala caramba*, *Coahuilix hubbsi*, *Coahuilix* n. sp., *Orygoceras* sp. Otro grupo de especies como *Durangonella coahuilae* y *Stiobia* n. sp. abundan en los arroyos asociados a las pozas pequeñas de agua termal. Estas especies tienen un cuerpo de color negro y se ha sugerido que esta pigmentación puede servir como un bloqueador solar ya que las conchas son transparentes (Hershler, 2000).



Figura 2
Concha de *Mexithauma quadripaludium*
del sistema Churince

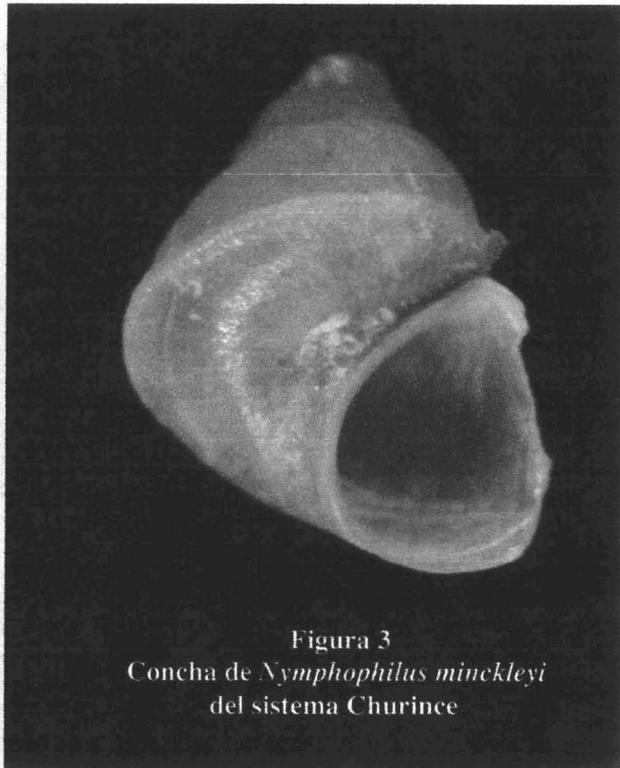


Figura 3
Concha de *Nymphophilus minckleyi*
del sistema Churince

La mayoría de los hidróbidos presentan un desarrollo directo y solo unas cuantas especies de ambientes estuarinos presentan un estado larvario pelágico de corta duración (Hershler y Ponder, 1998). *Durangonella coahuilae*, *M. churinceanus*, *M. quadripaludium* y *Cochliopina milleri* son vivíparos, los embriones pueden ser encontrados en los sacos de gestación durante todo el año (Hershler, 2000).

Estudios previos

El estudio de la malacofauna de Cuatro Ciénegas es reciente, se remonta a los 1960s, cuando Taylor, hace las primeras colectas de caracoles y publica el primer estudio detallado de la malacofauna de Cuatro Ciénegas (Taylor, 1966) aportación esencial para aquellos que quieran adentrarse en cualquier tipo de estudio relacionado con los caracoles de Cuatro Ciénegas, ya que contiene la primera información taxonómica, ecológica y biogeográfica hasta ese momento reunida en un solo estudio.

Taylor (1966) agrupa a las especies de Cuatro Ciénegas en cinco subfamilias: Cochliopinae, Littoridininae, Mexithaumatinae, Nymphophilinae y Paludiscalinae. Una de las propuestas que destacan dentro de su estudio es la correspondiente a la taxonomía de un caracol denominado *Nymphophilus minckleyi* Taylor, (1966). El autor considera a esta especie como un género monoespecífico endémico de Cuatro Ciénegas que por sus características morfológicas fue ascendido a nivel de subfamilia Nymphophilinae Taylor (1966). En 1979 F. G. Thompson, publicó un estudio a partir de caracteres morfológicos en el que relacionaba cercanamente a otras especies de caracoles distribuidas en Norte América y Europa con la subfamilia Nymphophilinae. En la actualidad, esta hipótesis ha sido confirmada con base en estudios sistemáticos moleculares (Hershler, 1994).

Hershler, en 1985 realizó un estudio detallado de la morfología de los hidróbidos de Cuatro Ciénegas, así como una revisión sistemática de la malacofauna (incluyendo descripciones de nuevas especies). En 1986, Hershler y Minckley llevaron a cabo un estudio sobre la variación microgeográfica de *M. churinceanus* en el sistema El Mojarral, debido a que esta especie había sido registrada con los niveles más altos de variación morfológica dentro y entre sistemas acuáticos, por lo que Taylor (1966) había considerado la existencia de varias subespecies. En el estudio realizado por Hershler y Minckley en 1986 concluyen que la variación morfológica de los caracoles se da en un gradiente a lo largo del sistema. En el 2000, Hershler propone que las seis subespecies de *Mexipyrgus* deben ser reducidas a una sola: *Mexipyrgus churinceanus*. Esta propuesta está hecha con base a un estudio más detallado de las características morfológicas de individuos provenientes de 100 sitios de muestreo de distintas pozas dentro de la cuenca de Cuatro Ciénegas. Aunque, (Tang y Roopnarine, 2001) sugieren que las subespecies descritas por Taylor en 1966 sean consideradas como especies distintas.

Recientemente (2000 a la fecha), los caracoles de Cuatro Ciénegas han sido usados en estudios de sistemática molecular, para establecer la relación que guardan dentro de la familia Hydrobiidae (Wilke *et al.*, 2001). Esta aproximación molecular se debe a que estudios taxonómicos previos habían revelado que caracteres morfológicos

como: la forma de la concha, rádula, opérculo y pene, habían convergido en muchas especies dentro de la familia Hydrobiidae y que existían escasos caracteres derivados que pudieran ser útiles en la sistemática de esta familia de moluscos. Estas convergencias y la escasez de caracteres derivados útiles para la sistemática se hizo patente en muchas especies dentro de la superfamilia Rissooidea. Por lo que fue necesario el estudio detallado de la anatomía de cada una de las especies para reconocer y clarificar relaciones sistemáticas dentro y entre familias, así como superfamilias pertenecientes al infraorden Littorinimorpha (Davis, 1979).

Estudios anatómicos han demostrado que dentro de la familia Hydrobiidae existen cuatro grupos básicos y cuatro más que son considerados grupos con un estatus taxonómico no claro (Wilke *et al.*, 2001). Los cuatro grupos anatómicos bien definidos (subfamilias) son: Cochliopinae = Littoridininae, Hydrobiinae, Lithoglyphinae y Nymphophilinae (Wilke *et al.*, 2001). El cuadro 2 contiene la ubicación taxonómica de *M. churinceanus* y *M. quadripaludium* de acuerdo con Hershler (2000).

Cuadro 2. Taxonomía de *Mexipyrgus churinceanus* y *Mexithauma quadripaludium* (tomado de Hershler, 2000).

Phylum	Mollusca	Mollusca
Clase	Gasteropoda	Gasteropoda
Subclase	Orthogastropoda	Orthogastropoda
Infraclase	Apogastropoda	Apogastropoda
Superorden	Caenogastropoda	Caenogastropoda
Orden	Sorbeoconcha	Sorbeoconcha
Suborden	Hypsogastropoda	Hypsogastropoda
Infraorden	Littorinimorpha	Littorinimorpha
Superfamilia	Rissooidea	Rissooidea
Familia	Hydrobiidae	Hydrobiidae
Género	<i>Mexipyrgus</i>	<i>Mexithauma</i>
Especie	<i>churinceanus</i> Taylor, 1966	<i>quadripaludium</i> Taylor, 1966

Clasificación de caracoles hidróbidos Risssooidea: Hydrobiidae

Desde el siglo XIX hasta la fecha, han existido numerosos intentos por clasificar a los caracoles hidróbidos. Troschel, a mediados del siglo XIX, es uno de los primeros investigadores en aceptar semejante reto. El definió la familia Hydrobiidae y dentro de ella agrupó a muchas especies consideradas hasta la fecha como verdaderos Hydrobiidae, aunque también incluyó a otras especies que actualmente no se encuentran dentro de esta familia. Tal es el caso de varios géneros que se encuentran actualmente clasificados dentro de Assimineidae y Pomatiopsidae (Kabat y Hershler, 1993). Durante el siglo XX también existieron numerosas clasificaciones, entre las que destaca la de Taylor (1966). En dicha clasificación, el autor usa caracteres que nadie había empleado como: tentáculos cefálicos, pigmentación, reproducción, características especiales de la concha y distribución geográfica, entre otros. Esta clasificación se basó principalmente en especies de Norte América, particularmente en los taxones que habitan la Cuenca de Cuatro Ciénegas.

Una de las clasificaciones más extensas y detalladas en el siglo XX es la que proponen Starobogatov y Sitnikova (1983). En esta clasificación los autores combinan la mayoría de los caracteres usados previamente con detalles de los genitales femeninos (forma de los oviductos glandular y renal así como las bolsas donde se almacena el esperma). Esta clasificación considera que los hidróbidos se dividen en cinco superfamilias, 25 familias y 31 subfamilias (cuadro 3). Semejante clasificación taxonómica de los hidróbidos sobrestimó el número de especies y aumentó los rangos supraespecíficos como nunca antes. Ponder y Waren (1988) sugieren una nueva clasificación en la que reducen el número de familias de hidróbidos a tres, dentro de una superfamilia Risssooidea, basados en el tubo de esperma, el cual se encuentra separado del oviducto glandular en los genitales femeninos (un carácter altamente convergente en Risssooidea. Ponder y Waren, 1988). En 1993, Kabat y Hershler plantean una clasificación detallada de la familia Hydrobiidae, esta clasificación contiene 725 géneros, de los cuales 405 están avalados por la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN).

Esta breve reseña indica que la clasificación de los caracoles hidróbidos por arriba del nivel de especie ha sido problemática y que cada nueva clasificación da lugar a nuevas controversias. Los principales problemas son: 1) Los caracoles que se asemejan a hidróbidos tienden a una simplicidad morfológica debido a la miniaturización, lo que produce una escasez de caracteres anatómicos robustos para la clasificación de taxones. 2) existe un alto grado de variación intraespecífica de caracteres anatómicos y 3) hay un alto grado de homoplasia en los caracteres anatómicos (Wilke *et al.*, 2001). Debido a estos problemas se puede pensar que el uso de caracteres anatómicos en una reconstrucción filogenética para hidróbidos dará como resultado diferentes filogenias por lo que se desconoce el grado de relevancia que tengan dichos caracteres (Wilke *et al.*, 2001). Dados estos problemas, Wilke *et al.* (2001) sugieren una nueva clasificación de este grupo de organismos a partir de marcadores moleculares tales como secuencias de ADN de la enzima mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad 1 (CO1) y 18s ADNr (cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificaciones previas de los caracoles hidróbidos.

Starobogatov y Sitnikova (1983)	Ponder y Waren (1988)	Kabat y Hershler (1993)	Wilke <i>et al.</i> ; (2001)
<p>Moitessierioidea Moitessieriidae Tanousiidae</p> <p>Bithynioidea *Bithyniidae *Bithyniinae *Parafossarulinae</p> <p>Amnicolidae Parabythinellidae Kolhyamnicolidae Emmericiidae Lepyrriidae ¿? Mexithaumidae ¿?</p> <p>Hydrobioidea Baicalidae Pyrgulidae Pyrgulinae Turriscapinae Hydrobiidae Sadlerianidae Pseudamnicolinae Sadlerianinae Pyrgorientalinae Kirelinae Islamiidae Islamiinae Graecoanatolicinae Horatidae Orientalininae Horatiinae Pseudohoratiinae Lanzaiidae Lithoglyphidae Dabrianidae Benedictiidae Fluminicolidae ¿?</p> <p>Tateioidea Tateidae Clenchiellidae ¿? Istrianidae</p> <p>Littoridinoidea Littoridinidae *Stenothyridae *Iravadiidae *Triculidae Pseudocaspiidae *Pomatiopsidae</p>	<p>Rissooidea</p> <p>Hydrobiidae Hydrobiinae Littoridininae Lithoglyphinae Nymphophilinae Clenchiellinae Moitessieriinae Amnicolinae Fontigentinae Baicaliinae Emmericiinae Tateinae Orygoceratiinae</p> <p>Pyrgulidae Pyrgulinae Conocaspiinae Micropyrgulinae</p> <p>Bohaispiridae</p>	<p>Rissooidea</p> <p>Bithyniidae</p> <p>Hydrobiidae Amnicolinae Baicaliinae Belgrandiellinae Benedictiinae Bucharamnicolinae Cochliopinae (=Littoridininae) Hydrobiinae Islamiinae Lithoglyphinae Mexithaumatinae Moitessieriinae Nymphophilinae Paludiscalinae Sadlerianinae</p> <p>(más otras 53 subfamilias)</p> <p>Pomatiopsidae</p> <p>Rissoidae</p> <p>Truncatellidae</p>	<p>Rissooidea</p> <p>Amnicolidae</p> <p>Bithyniidae</p> <p>Hydrobiidae Hydrobiinae Pseudamnicolinae Horatiinae ¿? Islaminae ¿? Nymphophilinae Cochliopinae (=Littoridininae)</p> <p>Lithoglyphidae</p> <p>Moitessieriidae</p> <p>Pomatiopsidae</p> <p>Rissoidae</p> <p>Truncatellidae</p>

Simbología: (*) corresponde a grupos que no se encuentran actualmente colocados dentro de Hydrobiidae. (¿?) corresponde a grupos con un estatus taxonómico no claro.

El uso de CO1 como marcador molecular en estudios de sistemática

El genoma mitocondrial de los moluscos es una molécula circular, pequeña, contiene 37 genes: 13 que codifican para subunidades proteicas que constituyen las enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa (cox1-3, nad1-6, nad4L, cob, atp6, atp8), dos genes que codifican para RNA ribosomal (rrnS y rrnL) y 22 genes que codifican para RNA de transferencia (tRNAs) (uno por cada aminoácido) (Bore, 1999; Bore *et al.*, 2004). Numerosos estudios en moluscos, han usado secuencias parciales del gen mitocondrial que codifica para la subunidad 1 de la enzima Citocromo Oxidasa (CO1) y han señalado la utilidad de dicho marcador para reconstrucciones filogenéticas (Brown, 1985; Folmer *et al.*, 1994; Holland y Hadfield, 2002; Hershler *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Wilke *et al.*, 2000; Wilke *et al.*, 2001). Estos autores indican que este locus puede tener una tasa promedio de divergencia por arriba del 13.27% y 3.18% a nivel nucleotídico y de secuencia de aminoácidos respectivamente. Los mismos autores han indicado que esta relativamente rápida tasa de evolución es apropiada para distinguir diferencias entre taxones, incluso a nivel intraespecífico.

Las secuencias de ADN de CO1 presentan las siguientes propiedades: 1. En la superfamilia Rissooidea, las secuencias de CO1 no contienen inserciones o deleciones por lo que pueden ser alineadas fácilmente (Wilke *et al.*, 2001). 2. Cuentan con suficientes caracteres filogenéticamente informativos, por lo tanto la reconstrucción filogenética será más confiable. 3. Son muy consistentes a nivel de género y familia. La desventaja que puede tener el uso de CO1 es el alto polimorfismo en su secuencia. Una de las observaciones de este alto polimorfismo es la alta tasa de sustituciones a nivel de transiciones, por lo que las relaciones por arriba del nivel de familia pudieran estar afectadas por saturación transicional, indicado por un bajo soporte de bootstrap en los nodos más profundos de una topología (Wilke *et al.*, 2001). Se debe señalar que este fragmento de gen es típicamente rico en Adenina y Timina (Folmer *et al.*, 1994). Adicionalmente, se ha registrado que los genomas mitocondriales del Phylum Mollusca presentan altos niveles de rearrreglos genéticos, los cuales han mostrado ser caracteres muy poderosos para la reconstrucción de relaciones evolutivas (Boore *et al.*, 2004).

Objetivos

Objetivo general

Conocer la relación genealógica que mantienen los caracoles dulceacuícolas Hydrobiidae de Cuatro Ciénegas con especies representantes del infraorden Littorinimorpha, superfamilia Rissooidea, a partir del análisis de secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad 1 (CO1).

Objetivo particular

Conocer la relación genealógica de los caracoles dulceacuícolas (Hydrobiidae), *Mexipyrgus churinceanus* y *Mexithauma quadripaludium*, endémicos de Cuatro Ciénegas y especies nativas de Norte América, mediante el análisis de secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad 1 (CO1)

Hipótesis

Ho1) La malacofauna de Cuatro Ciénegas no está relacionada con ancestros que habitaron ambientes costeros o estuarinos y no hay relación con especies del sur de Estados Unidos y Europa (regiones que formaron parte del proto Golfo de México).

Ha1) Las especies actuales que conforman la malacofauna de Cuatro Ciénegas se relacionan con ancestros que habitaron ambientes costeros a estuarinos. Además, existe una estrecha relación con especies del sur de Estados Unidos y Europa (regiones que formaron parte del proto Golfo de México).

Área de Estudio

La Cuenca de Cuatro Ciénegas Coahuila, México.

Ubicación

La cuenca de Cuatro Ciénegas se encuentra ubicada en el municipio de Cuatro Ciénegas de Carranza, Coahuila, México a 80 kilómetros al oeste de la ciudad de Monclova. El 7 de noviembre de 1994, la Cuenca de Cuatro Ciénegas se decretó como área de Protección de Flora y Fauna (Diario de la Federación noviembre, 1994). Sus coordenadas geográficas son: 26° 45' 00'' - 27° 00' 00'' Norte y 101° 48' 49'' - 102° 17' 53'' Oeste. La totalidad del área protegida se encuentra en la cota de los 700 msnm (SEMARNAP, 1999).

Fisiografía e historia geológica

Cuatro Ciénegas se encuentra rodeada por las siguientes sierras: al norte La Madera y La Menchaca, al oeste La Purísima y San Vicente, al sur San Marcos y Pinos y al sureste La Fragua. La Sierra de La Madera es la más alta de todas con una altitud mayor a los 2000 msnm (Instituto Nacional de Ecología, 1999). Cuatro Ciénegas forma parte del conjunto de la Sierra Madre Oriental, sub-provincia de las Sierras y Llanuras Coahuilenses y se ubica geológicamente entre el límite de dos provincias: el Golfo de Sabinas y la Plataforma de Coahuila, donde la Sierra de la Fragua sirve como división entre estas dos. La historia geológica de esta zona ha sido interpretada a partir de los registros geológicos de las provincias mencionadas anteriormente. Las formaciones montañosas de la sub-provincia de las Sierras y Llanuras Coahuilenses contienen predominantemente estratos de la Era Mesozoica (hace 248-65 millones de años), estas formaciones yacen sobre un basamento de sedimento marino del Pérmico (hace 286-248 millones de años) y de rocas intrusivas del post-Pérmico con dirección hacia el sur (SEMARNAP, 1999).

Hidrología

Cuatro Ciénegas se encuentra dentro de la zona geohidrológica conocida como Cuatro Ciénegas-San Miguel, en la cual se han identificado dos grupos diferentes de aguas: el primero, con baja salinidad y temperatura fría, ubicado en la Sierra Purísima donde se forman manantiales como La Vega y El Venado; y el segundo, compuesto por agua asociada a actividad geotérmica, rica en minerales como sulfatos y carbonatos. La mayoría de las pozas de Cuatro Ciénegas son muy ricas en sales por lo que no se les puede dar un uso potable, industrial o agrícola (Forti *et al.*, 2004).

Los principales sistemas acuáticos en Cuatro Ciénegas son: Churince, Santa Tecla, Mojarral, Tío Cándido, Pozas Azules y Antiguos Mineros del Norte (Fig. 4) aparentemente aislados uno del otro en la superficie por dunas y suelos compuestos por calizas. Todos ellos se encuentran alrededor de la Sierra de San Marcos y se ha postulado flujo de agua subterránea entre estos sistemas cársticos (Minckley, 1969).

En Cuatro Ciénegas existen más de 200 cuerpos de agua conocidos como "Pozas", de dimensiones muy variadas, estas pueden ser menores a 9 m^2 , o tener hasta una hectárea de área superficial con descargas de hasta $1 \text{ m}^3/\text{s}$. La temperatura en algunas pozas llega hasta los 40° C por lo que se sospecha de actividad geotérmica. Los sólidos disueltos totales van de $0.3\text{-}2 \text{ mg/l}$ y la química de MgSO_4 cambia a $\text{Ca}(\text{H}_2\text{CO}_3)_2$ (Minckley, 1984).

A partir de núcleos sedimentarios de las pozas y con técnicas de fechamiento por radiocarbono, se ha podido estimar que algunas pozas han existido desde hace aproximadamente 31,000 años (Meyer, 1973). Este investigador también analizó núcleos provenientes de la región central de la cuenca, indicando la presencia de pozas y ambientes acuáticos extintos.

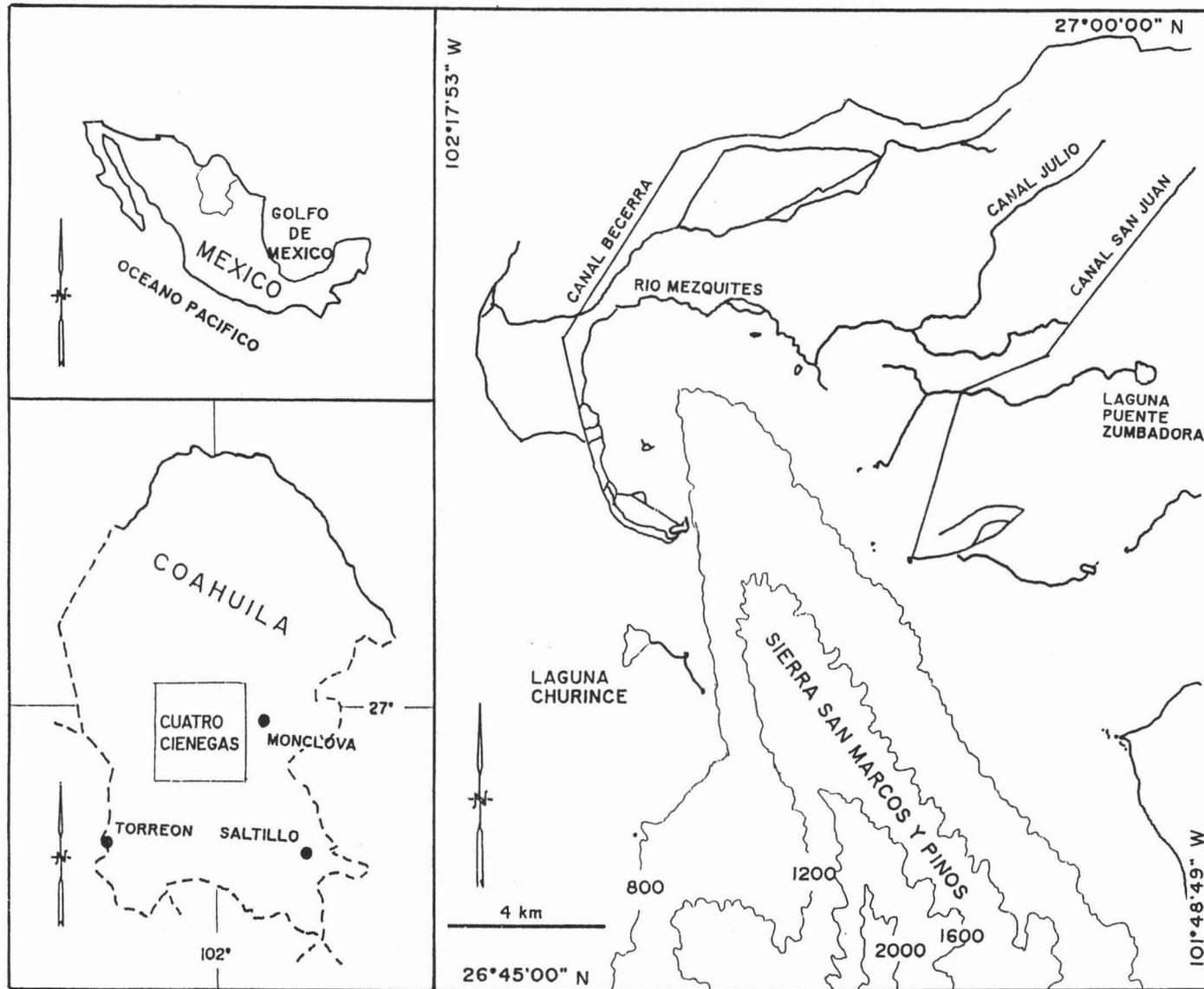


Figura 4. Mapa que representa la ubicación e hidrología de la Cuenca de Cuatro Ciéneas. Tomado de Badino *et al.* (2004) (con modificaciones).

El sistema acuático Churince

Churince es uno de los siete sistemas hidrológicos principales en Cuatro Ciénegas (Minckley, 1969). Tiene una orientación sur-suroeste con respecto a la cuenca y sus coordenadas geográficas son: 26° 50' Norte y 102° 08' Oeste. El sistema está compuesto por un manantial conocido como "Poza Churince" que da cauce a un río estrecho y sinuoso (con dirección oeste) conocido como "río Churince", el cual desemboca en la "Laguna Intermedia" y finalmente el cauce termina en una gran laguna de desecación conocida como "Laguna Grande". La profundidad promedio de este sistema acuático es menor a un metro.

En agosto de 2003 se realizaron mediciones para conocer las propiedades fisico-químicas del agua (Evan Carson, com. pers.) las variables medidas fueron: temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto. Los resultados de estas mediciones indican la existencia de un gradiente físico-químico a lo largo del sistema que se describe a continuación: La temperatura del agua va disminuyendo gradualmente a lo largo de su cauce. En la Poza Churince se registran 31° C, en la Laguna Intermedia la temperatura permanece constante entre los 25.5 – 26° C, finalmente en la Laguna Grande la temperatura llega a los 21° C. El pH del agua incrementa desde la Poza Churince hasta la Laguna Grande. En la Poza Churince el pH es de 8.5, oscila entre 9.1- 9.8 en la Laguna Intermedia y llega a 10 en la Laguna Grande. El oxígeno disuelto incrementa a lo largo del gradiente: en la Poza Churince el valor es de 4.5 y llega a 9.5 en la Laguna Grande. La conductividad oscila entre los 1.4 v en el manantial y 4.6 v en la Laguna Grande.

En el fondo de la Poza Churince predominan piezas de travertino; en la Laguna Intermedia el fondo está compuesto por fragmentos de conchas, desechos de caracol, detrito de algas, a menudo mezclado con pequeñas piezas de travertino formando un sedimento suave. En la Laguna Grande el fondo es arenoso con una coloración gris a blanca. *Mexipyrgus churinceanus* se distribuye a lo largo del sistema alcanzando grandes densidades en la Laguna Intermedia ya que prefiere el hábitat de sedimento suave, mientras que *Mexithauma quadripaludium* se distribuye a lo largo del río Churince hasta la Poza del mismo nombre en donde se encuentra la mayor densidad de individuos de esta especie, debido a que prefieren los estratos rocosos (Hershler, 2000).

Materiales y Métodos

Obtención de especímenes

Se colectaron especímenes vivos de *Mexipyrgus churinceanus* y *Mexithauma quadripaludium* en el sistema acuático Churince (26° 50' N y los 102° 08' W) en agosto, 2003. Se seleccionaron cinco sitios de colecta dentro del área de estudio de acuerdo a los siguientes criterios: para la consideración del sitio fue necesario que contara con un flujo de agua constante. Los sitios se escogieron a lo largo del sistema con el propósito de cubrir en la medida de lo posible el gradiente físico, químico y biótico para obtener un muestreo representativo de los haplotipos de estas dos especies de caracoles.

La colecta inició a partir del sitio conocido como Laguna Intermedia (sitio uno) hasta el manantial, río arriba (sitio cinco, ver Cuadro 4). Se usaron varios tamices metálicos de mano con un tamaño de malla de 2 mm para poder retener a los caracoles. A cada uno de los individuos colectados se le observó la presencia de opérculo, indicativo de que el caracol se encontraba vivo. Para la colecta de especímenes se contó con la asesoría de Evan Carson. Se registraron los datos de posición geográfica de cada sitio de colecta (cuadro 4). Posteriormente se limpiaron, separaron por especie, empaquetaron y etiquetaron los especímenes para cada uno de los cinco sitios. Las muestras se guardaron en un tanque que contenía nitrógeno líquido hasta su almacenamiento en un ultra congelador (Revco) a - 80° C en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM.

Cuadro 4. Sitios de colecta en el sistema Churince.

	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4	Sitio 5
Sistema Churince	Laguna Intermedia	Inicio de Laguna Intermedia	Fuera de la Laguna Intermedia	río Churince	Manantial Churince
26° 50' N 102° 08' W Altitud 775 msnm.	52.4'' N 25.9'' W	52.6'' N 20.1'' W	42.6'' N 16.7'' W	34'' N 12.1'' W	24.5'' N 2.2'' W
<i>M. churinceanus</i>	presente	ausente	presente	presente	presente
<i>M. quadripaludium</i>	ausente	ausente	presente	presente	presente

Extracción del ADN y amplificación de CO1

Se extrajo ADN total de *M. quadripaludium* y *M. churinceanus* a partir de tejido fresco de individuos completos (con todo y concha) de aproximadamente seis milímetros de largo. Para la extracción se empleó el método de Spolsky *et al.* (1996) (Anexo 1). A partir del ADN total, se llevó a cabo la amplificación de 500 a 630 pares de bases (pb) de la enzima mitocondrial CO1, por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para la amplificación de este fragmento se utilizaron los siguientes oligonucleótidos (primers): primer COIL 1492 que es una modificación diseñada específicamente para caracoles Hydrobiidae a partir del primer COIL 1490 (Folmer *et al.*, 1994) y el primer COIH2390 está diseñado a partir de secuencias publicadas de varias especies de moluscos (*Cypraea*, *Katharina* y *Mytilus*; GenBank) (Liu *et al.*, 2001). Los primers usados se muestran en el cuadro cinco.

Cuadro 5. Oligonucleótidos usados para amplificar secuencias de ADN de CO1.

COIL1492 F (5' -TCA ACA AAT CAT AAA GAT ATT GGT AC- 3')
COIH 2390 R (5' -ATA GTA GCC GCA GTA AAA TAA GC- 3')

Para *M. churinceanus* se amplificaron muestras de 23 individuos y para *M. quadripaludium* se amplificaron muestras de 20 individuos, que cubrían los cinco puntos de muestreo del sistema Churince. El siguiente cuadro (Cuadro 6) muestra el número de productos amplificados por sitio de muestreo para ambas especies. El protocolo y los detalles de la amplificación se encuentran en el Anexo 2.

Cuadro 6. Productos amplificados con los primers COIL1492 y COIH2390.

	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4	Sitio 5
<i>M. churinceanus</i>	n = 5	ausente	n = 7	n = 6	n = 5
<i>M. quadripaludium</i>	ausente	ausente	n = 7	n = 6	n = 7

Secuenciación

La secuenciación se llevó a cabo en Arizona State University, School of Life Sciences usando el ABI^{PRISM} Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Terminator Ready Reaxion Mix con AmpliTaq® FS DNA polimerasa). Se utilizaron de 20 a 30 ng de ADN purificado de los productos amplificados en el laboratorio (IE-UNAM). Se utilizaron los primers arriba mencionados y para cada muestra se realizaron dos reacciones de secuenciación para obtener la secuencia 5'-3' y la de reversa 3'-5'. La longitud de los productos secuenciados osciló entre los 500 y 630 pb. Las secuencias se obtuvieron con un secuenciador automático: Applied Biosystems Strech 373 DNA Sequencer (ABI^{PRISM}®). Se utilizaron solo aquellas secuencias con mayor longitud de nucleótidos, así como aquellas que no tuvieran ambigüedades en su composición nucleotídica como por ejemplo "gaps" (huecos en la secuencia).

Alineación

Las dos secuencias obtenidas por muestra (5'-3' y 3'-5') se alinearon y editaron con el programa BioEdit versión 5.0.9 para PC. Para comprobar que las secuencias de COI obtenidas fuesen las correctas, se comparó su similitud con las secuencias de COI que se encuentran en la base de datos del GenBank por medio del programa BLASTN. Posteriormente, se realizó una alineación para todas las secuencias involucradas en este estudio, con el programa Sequencher versión 4.2 para Macintosh.

Análisis genealógicos

Para la reconstrucción genealógica, se utilizó el Método de Parsimonia sin peso (unweighted parsimony approach). Se determinaron los árboles mas parsimoniosos a partir de una búsqueda heurística (Swofford, 1999) y el uso del algoritmo TBR (Tree Bisection Reconnection). La confianza de cada nodo fue obtenida a partir de 100 series de muestreos bootstrap de los datos (Felsenstein, 1985). Como una aproximación genealógica alternativa se hicieron análisis de distancias Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987), a partir del método de distancias de Kimura de dos parámetros (1980). La confianza de cada nodo fue obtenida a partir de 100 series de muestreos bootstrap de los datos (Felsenstein, 1985). Ambos métodos de reconstrucción genealógica se aplicaron a cada uno de los niveles taxonómicos que se mencionan a continuación: infraorden Littorinimorpha, superfamilia Risssoidea, familia Hydrobiidae (subfamilia Littoridininae, Nymphophilinae). Como grupos externos se seleccionaron cuatro secuencias parciales de CO1 correspondientes a los siguientes taxones: *Truncatella guerinii*, *Truncatella pulchella*, *Geomelania inornata*, de la familia Truncatellidae y uno correspondiente a *Turbinella angulata* de la familia Turbinellidae, la cual pertenece al infraorden Neogastropoda.

Todos los análisis se realizaron con el programa PAUP (Análisis Filogenéticos a partir del uso de Parsimonia) versión 4.0b10 para Macintosh PPC. Los árboles obtenidos, se editaron utilizando el programa MacDraw Pro (Claris-®). Para el análisis de la relación genealógica de especies clasificadas dentro del infraorden Littorinimorpha (Figuras 5.1 y 5.2) se estableció un conjunto de secuencias con un parámetro de alineación de 80% de mínima similitud, el conjunto se editó a una longitud de 585 pares de bases. Mientras que para el análisis de la relación genealógica de especies clasificadas en la superfamilia Risssoidea, así como para la relación genealógica de especies distribuidas al noreste de México y sur de Estados Unidos (figuras 6.1, 6.2, 7.1 y 7.2) el parámetro de alineación fue de 85% de mínima similitud. En estos dos conjuntos, las secuencias quedaron editadas a una longitud de 582 pares de bases.

Resultados

Alineación

Las secuencias obtenidas en el laboratorio, resultaron positivas para *M. churinceanus* y *M. quadripaludium* al ser comparadas por medio de BLASTN. En todas las secuencias de *M. quadripaludium* (20 secuencias) se pudo observar un solo haplotipo en los cinco sitios de muestreo del sistema Churince. Se observó lo mismo para el conjunto de 23 secuencias obtenidas para *M. churinceanus*. Dado que las secuencias resultaron ser idénticas en cada sitio de muestreo, se seleccionó un solo haplotipo de cada especie y se consideró como secuencia consenso.

Las secuencias de *M. churinceanus* y *M. quadripaludium* se comportan como secuencias típicas de un gen mitocondrial de invertebrados (fragmentos ricos en nucleótidos de Adenina y Timina Hershler *et al.*, 1999). La secuencia consenso de *Mexipyrgus churinceanus*, resultó ser polimórfica al ser comparada con el único haplotipo de la misma especie en GenBank, proveniente del oeste de la Laguna Mojarral. La comparación de 585 pb de ambos haplotipos arrojó un total de 13 sitios variables, lo que representa un 2.22% de variación entre secuencias, 12 de estos sitios polimórficos se encuentran en la tercera posición del codón y uno en la primera. De los 195 residuos de aminoácidos codificados en ambas secuencias, el 100% se encontraba conservado.

Para las secuencias de *Mexipyrgus churinceanus* y *Mexithauma quadripaludium*, obtenidas en el laboratorio, la alineación por BLASTN dió como resultado 38 secuencias de CO1 de taxones cercanamente relacionados pertenecientes a la familia Hydrobiidae y 13 secuencias de CO1 de taxones representantes de seis familias dentro de la superfamilia Risssoidea: Amnicolidae, Benedictiidae, Bithyniidae, Pomatiopsidae, Pyrgulidae, Risssoidea. Posteriormente se buscó dentro del infraorden Littorinimorpha secuencias de taxones que presentaran una distribución marina, se archivaron 15 secuencias de CO1 de especies pertenecientes a cuatro superfamilias (Calyptraeoidea, Capuloidea, Cypraeoidea y Littorinoidea) para su análisis posterior. Se seleccionaron como grupos externos tres secuencias de CO1 correspondientes a especies de la superfamilia Risssoidea: Truncatellidae y uno correspondiente a la familia Turbinellidae del infraorden Neogastropoda. Estas secuencias son resultado de otros estudios y están disponibles para su uso en la base de datos del GenBank (anexo3).

A continuación se describe la composición de las secuencias consenso obtenidas en el laboratorio (Cuadro 7).

Cuadro 7. Composición nucleotídica de las secuencias seleccionadas.

Molécula de ADN mitocondrial correspondiente a un segmento del gen CO1 de: <i>Mexipyrgus churinceanus</i> n = 23 secuencias obtenidas			Molécula de ADN mitocondrial correspondiente a un segmento del gen CO1 de: <i>Mexithauma quadripaludium</i> n = 20 secuencias obtenidas		
Longitud	600 pares de bases		Longitud	600 pares de bases	
Peso molecular cadena sencilla	180370 Daltons		Peso molecular cadena sencilla	179984	
Peso molecular cadena doble	363365 Daltons		Peso molecular cadena doble	363178	
Contenido G+C	36.17%		Contenido G+C	34.33%	
Contenido A+T	63.83%		Contenido A+T	65.67%	
Nucleótido	Número	% Molécula	Nucleótido	Número	% Molécula
A	151	25.17	A	152	25.33
C	101	16.83	C	91	15.17
G	116	19.33	G	115	19.17
T	232	38.67	T	242	40.33
Total	600	100.00	Total	600	100.00

Simbología: A = adenina T = timina G = guanina C = citosina

Genealogías

En total se obtuvieron seis genealogías, dos para cada nivel taxonómico (infraorden, superfamilia, familia). Las dos primeras corresponden al infraorden Littorinimorpha que contiene especies de ambiente marino y dulceacuícola. Las siguientes dos corresponden a la superfamilia Rissooidea especies que en su mayoría se distribuyen en ambientes dulceacuícolas y por último, dos genealogías para especies que integran la familia Hydrobiidae (subfamilia Littoridininae y Nymphophilinae) dichas especies habitan ambientes dulceacuícolas a estuarinos con distribución en los sistemas hidrológicos de Norte América y Europa.

Relación genealógica de especies clasificadas dentro del infraorden Littorinimorpha mediante secuencias parciales de ADN mitocondrial (región COI).

Las Figuras 5.1 y 5.2 muestran las relaciones genealógicas, mediante el análisis de 51 secuencias parciales de ADN mitocondrial COI de especies pertenecientes a cinco súper familias clasificadas dentro del infraorden Littorinimorpha las cuales son: Caliptraeidea, Capuloidea, Cypraeoidea, Littorinoidea y Rissooidea. De 585 pares de bases, 319 (54.52%) son constantes, 243 (41.53%) son parsimonio informativas y 23 (3.93%) son parsimonio no informativas.

En la figura 5.1 se observa una genealogía obtenida mediante el método de Máxima Parsimonia (MP), se observan siete clados principales y varios subclados que se describen de arriba abajo: Clado uno con un valor de confianza de bootstrap (P_B) de 100%, agrupa a géneros representantes de la subfamilia Nymphophilinae como: *Pyrgulopsis*, *Nymphophilus* y *Floridobia* dichos géneros son de hábitat dulceacuícola y se distribuyen en Norte América. Clado dos con un $P_B = 87\%$, contiene a *Bicatillus* y *Crepidula*, géneros de hábitat marino pertenecientes a la familia Calyptraeidae, distribuidos en las costas de Singapur. Clado tres con un $P_B = 66\%$, contiene géneros representantes de la subfamilia Littoridininae de Norte América, los géneros de esta subfamilia son en su mayoría dulceacuícolas, dentro del clado tres hay cuatro subclados: 3.a) con $P_B = 100\%$, agrupa a *Semisalsa*, *Heleobia* y *Heleobops*. 3.b) con $P_B = 77\%$, *Durangonella* y *Juturnia*. 3.c) con $P_B = 88\%$, *Lithococcus* y *Cochliopa*. 3.d) con $P_B = 94\%$, *Mexipyrgus* y *Tryonia*. Clado cuatro con $P_B = 75\%$, contiene a *Erhaia* y *Colligyryrus* géneros clasificados dentro de la familia Amnicolidae, el primero se distribuye en China y el segundo en Estados Unidos ambos de hábitat dulceacuícola. Clado cinco con $P_B = 71\%$, *Afrolittorina*, *Austrolittorina* y *Littoraria*, géneros de hábitat marino clasificados dentro de la familia Littorinidae. Clado seis con $P_B = 80\%$, *Pseudozonaria*, *Notadusta*, *Cribrarula* y *Lyncina*, géneros de hábitat marino pertenecientes a la familia Cypraeidae. Clado siete con $P_B = 72\%$, *Pyrgula* y *Phrantela*, géneros pertenecientes a la superfamilia Rissooidea, el primero es clasificado dentro de Pyrgulidae y se distribuye en el lago Baical, mientras que el segundo es clasificado dentro de Hydrobiidae y se distribuye en Australia.

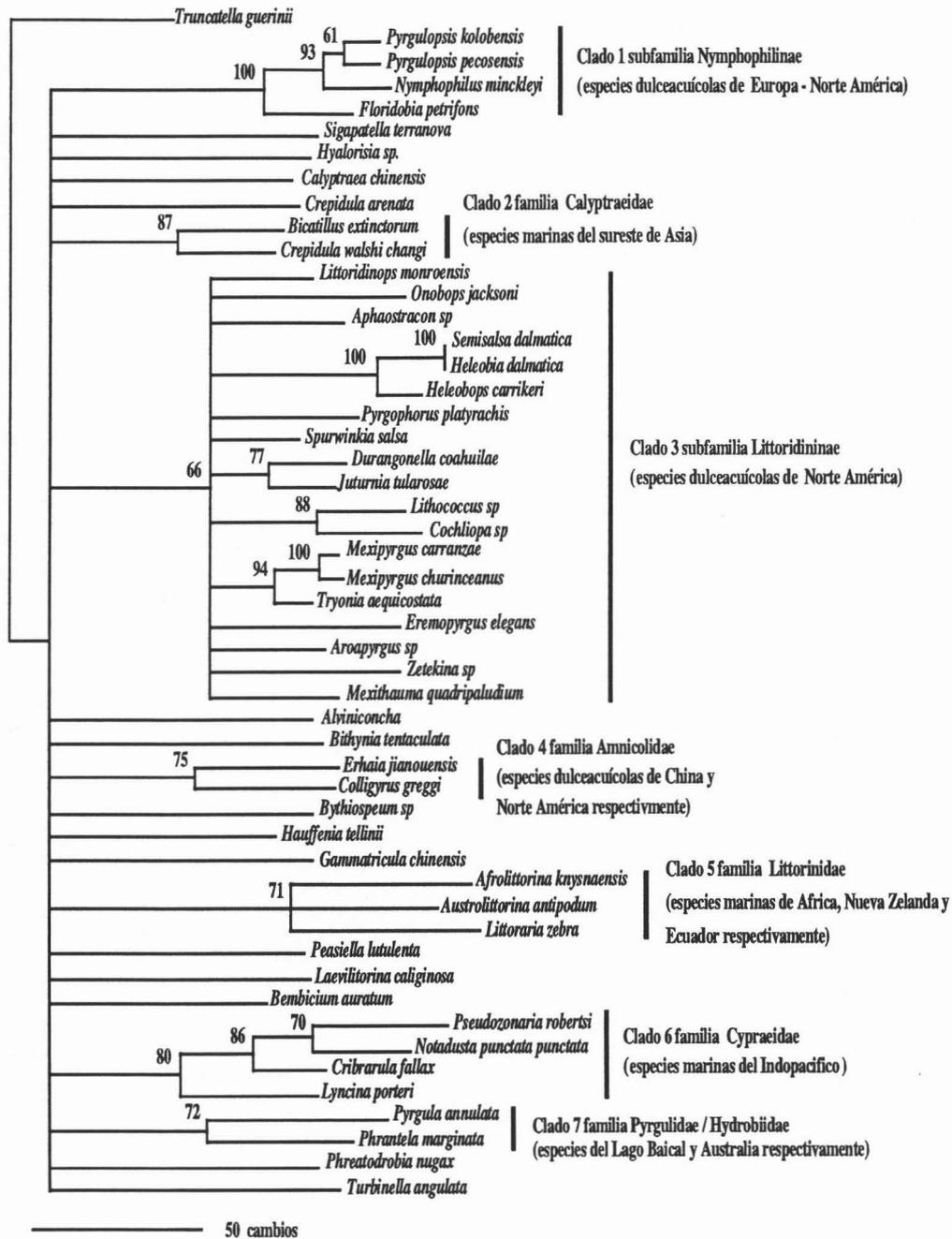


Figura 5.1 Genealogía obtenida con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen CO1 para especies dentro del infraorden Littorinimorpha. Los valores de bootstrap aparecen cuando estos son mayores a 60%

Se aplicó (para el mismo conjunto de datos) el método de reconstrucción filogenética de distancias Neighbor Joining (NJ), se decidió aplicar este método para corroborar la topología obtenida por el método anterior. Usando dicho método se pueden observar también siete clados principales y varios subclados que se describen de arriba abajo en la figura 5.2. Clado uno con valor $P_B = 100\%$ agrupa géneros representantes de la subfamilia Nymphophilinae: *Pyrgulopsis*, *Nymphophilus* y *Floridobia*. Clado dos con $P_B = 68\%$ agrupa a *Bicatillus*, *Crepidula* y *Peasiella* los dos primeros pertenecientes a la Familia Calyptraeidae (con distribución y hábitat ya mencionados) y *Peasiella* incluido dentro de familia Littorinidae, se distribuye en las costas de Viet Nam. Clado tres con $P_B = 82\%$ contiene géneros representantes de la subfamilia Littoridininae de Norte América. Se divide en tres subclados: 3.a) con $P_B = 67\%$, *Littoridinops*, *Spurwinkia*, *Durangonella* y *Juturnia*. 3.b) con $P_B = 99\%$, *Mexipyrgus* y *Tryonia*. 3.c) con $P_B = 66\%$, *Lithococcus*, *Cochliopa*, *Mexithauma* y *Aroapyrgus*. Clado cuatro con $P_B = 82\%$, *Semisalsa*, *Heleobia* y *Heleobops*, géneros de ambiente dulceacuícola distribuidos en Europa y Norte América pertenecientes a la familia Hydrobiidae. Clado cinco con $P_B = 81\%$, *Erhaia* y *Colligyrus*. Clado seis con $P_B = 81\%$, agrupa géneros representantes de la familia Cypraeidae: *Pseudozonaria*, *Cribrarula*, *Notadusta* y *Lyncina*. Clado siete con $P_B = 76\%$, contiene a los géneros *Pyrgula* y *Phrantella*.

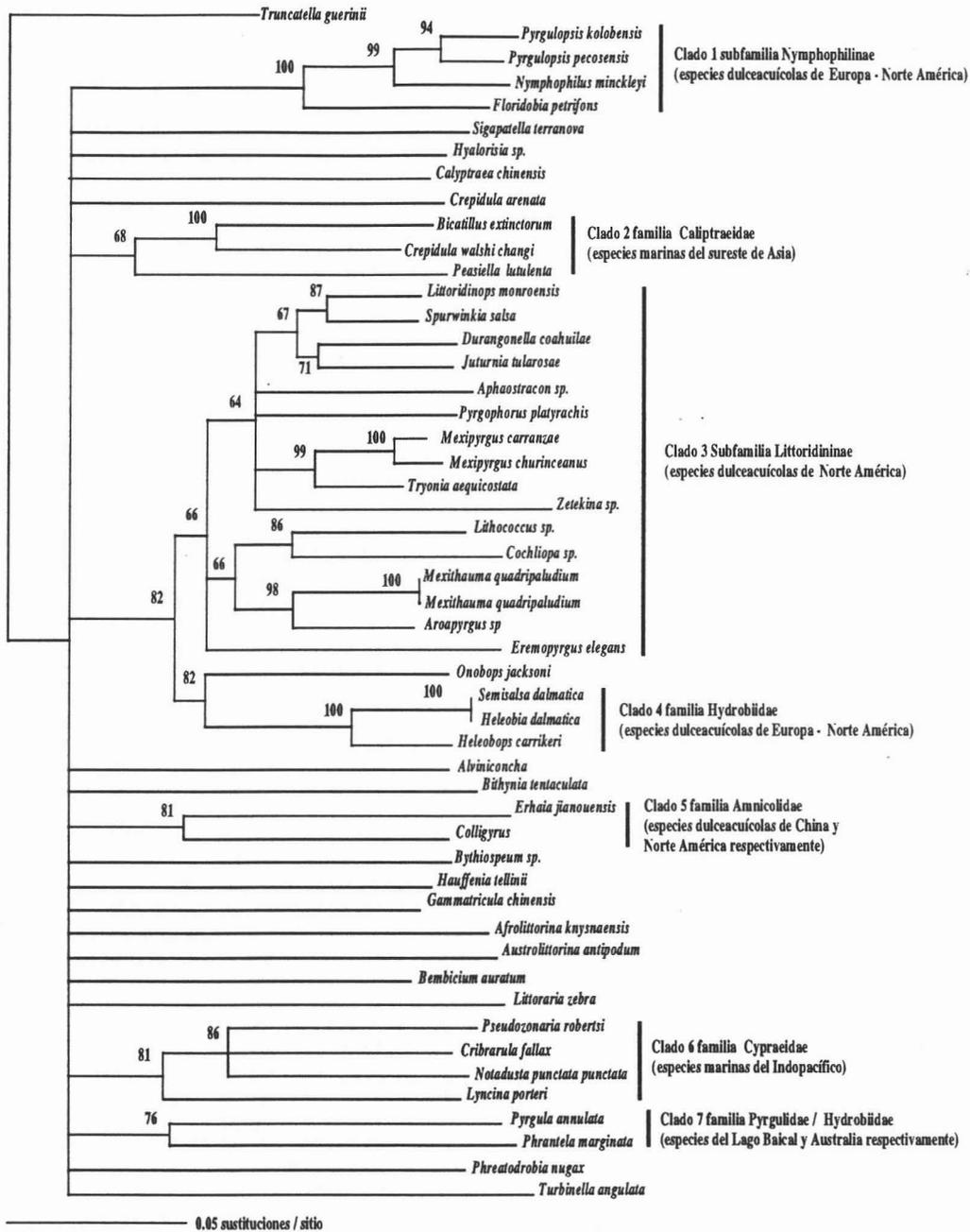


Figura 5.2 Genealogía obtenida con el método de distancias neighbor joining a partir de secuencias del gen CO1 para especies dentro del infraorden Littorinimorpha. Los valores de bootstrap aparecen cuando estos son mayores a 60%

Relación genealógica de especies clasificadas en la superfamilia Risssoidea mediante secuencias parciales de ADN mitocondrial (región CO1).

Las figuras 6.1 y 6.2 muestran un análisis filogenético usando 53 secuencias parciales de ADN mitocondrial de CO1 de especies representantes de la superfamilia Risssoidea, la cual contiene nueve familias de caracoles, la mayoría habita ambientes dulceacuícolas y estuarinos. La familia Hydrobiidae se encuentra incluida dentro de esta superfamilia. El conjunto de secuencias analizadas tiene una longitud de 582 pares de bases, de estas 334 (57.38%) son constantes, 222 (38.14%) son parsimonio informativas, 26 (4.46%) son parsimonio no informativas.

En la figura 6.1 se pueden observar seis clados principales y varios subclados, que se describen de arriba abajo: clado uno con $P_B = 88\%$ contiene exclusivamente géneros de la subfamilia Littoridininae distribuidas al noreste de México y sur de Estados Unidos, este clado está dividido en cuatro subclados: 1.a) subclado (bien definido) con $P_B = 93\%$ agrupa a los géneros *Mexipyrghus* y *Tryonia*. 1.b) con $P_B = 62\%$ *Semisalsa* y *Onobops*. 1.c) con $P_B = 83\%$ *Cochliopa* y *Lithococcus*. 1.d) con $P_B = 63\%$ *Durangonella* y *Juturnia*. Clado 2 (bien definido) con $P_B = 100\%$ agrupa dos géneros *Adrioinsulana* y *Pseudamnicola* de la familia Hydrobiidae, ambos géneros con distribución en aguas continentales de Europa. Clado 3 (bien definido) con $P_B = 99\%$ agrupa géneros representantes de la subfamilia Nymphophilinae que se encuentran distribuidas en el noreste de México y sur de Estados Unidos. El mismo clado se divide en dos subclados: 3.a) con $P_B = 86\%$ contiene a los géneros *Cincinnatia* y *Floridobia*. 3.b) con $P_B = 100\%$ contiene a los géneros *Notogillia* y *Spilochlamys*. Es importante mencionar que *Nymphophilus* y *Pyrgulopsis* se encuentran agrupados en este clado. Clado 4 (bien definido) con $P_B = 99\%$ contiene a los géneros *Graziana* y *Hauffenia*, ambos de la familia Hydrobiidae con distribución también en aguas continentales de Europa. Clado5 (bien definido) con $P_B = 100\%$ contiene a los géneros *Lithoglyphus* de la familia Hydrobiidae y *Kobeltocochlea* de la familia Benedictiidae, el primero se distribuye en aguas continentales en Polonia y el segundo en el lago Baical. Clado 6 con $P_B = 78\%$ contiene a los géneros *Neotricula* y *Robertsia* de la familia Pomatiopsidae distribuidos en aguas continentales de Asia.

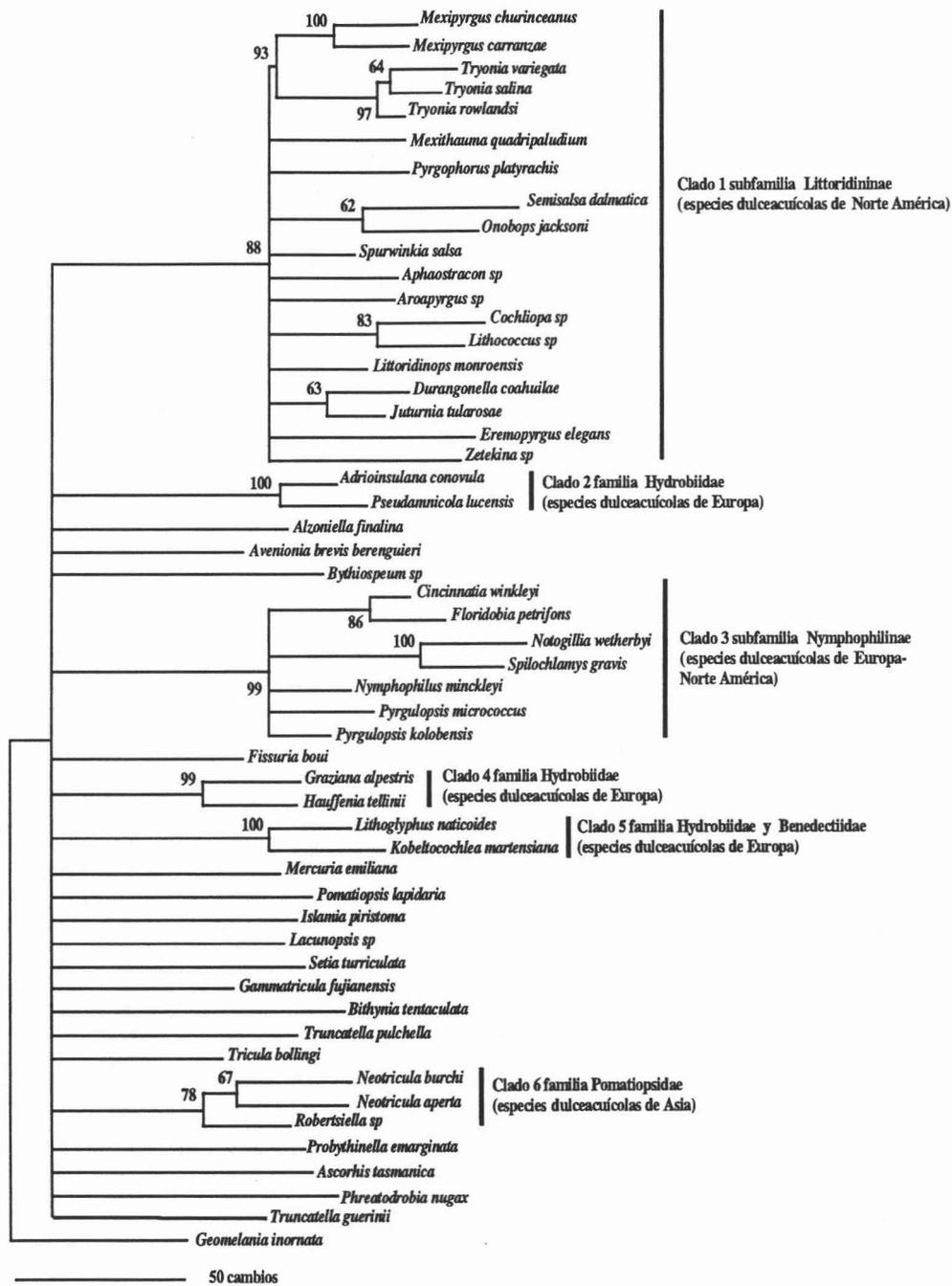


Figura 6.1 Genealogía obtenida con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen CO1 para especies de la superfamilia Rissooidea. Los valores de bootstrap aparecen cuando estos son mayores a 60%

La Figura 6.2 muestra la topología obtenida aplicando el método de distancias (NJ) para especies representantes de la superfamilia Rissooidea. En esta figura se pueden observar ocho clados principales, seis de estos están presentes en la topología anterior y dos más que resultaron al emplear este método de inferencia filogenética. Se puede observar, al comparar las figuras 6.1 y 6.2 un patrón de agrupación de los taxones bastante similar, por lo que se podría optar por una u otra topología sin embargo se decidió que ambas estuvieran presentes. Clado uno $P_B = 89\%$ agrupa géneros de la subfamilia Littoridininae que se distribuyen al noreste de México y sur de Estados Unidos. Se divide en cuatro subclados: 1.a) con $P_B = 85\%$, *Mexipyrgus* y *Tryonia* 1.b) con $P_B = 60\%$, *Mexithauma*, *Aroapyrgus*, *Cochliopa* y *Lithococcus*. 1.c) con $P_B = 68\%$, *Pyrgophorus*, *Spurwinkia*, *Littoridinops*, *Durangonella*, *Juturnia* y *Aphaostracon*. 1.d) con $P_B = 65\%$, *Semisalsa* y *Onobops*. Clado 2 este clado es idéntico al clado 2 de la figura 6.1 Clado 3 con $P_B = 60\%$, *Alzoniella*, *Fissuria* e *Islamia* de la familia Hydrobiidae, distribuidos en aguas continentales de Europa. Clado 4 (bien definido) con $P_B = 100\%$, agrupa a géneros representantes de la subfamilia Nymphophilinae que se distribuyen exclusivamente al NE de México y Sur de Estados Unidos. Se divide en tres subclados: 4.a) con $P_B = 100\%$, *Cincinnatia* y *Floridobia*. 4.b) con $P_B = 100\%$, *Notogillia* y *Spilochlamys*. 4.c) con $P_B = 100\%$, *Nymphophilus* y *Pyrgulopsis*. Clado 5 con $P_B = 100\%$, contiene a los géneros *Graziana* y *Hauffenia*. Clado 6 con $P_B = 100\%$, contiene a los géneros *Lithoglyfus* de la familia Hydrobiidae y *Pomatiopsis* de la familia Pomatiopsidae, el primero se distribuye en aguas continentales de Polonia y el segundo en el estado de Michigan, USA. Clado 7 con $P_B = 86\%$, contiene a los géneros *Lacunopsis* y *Tricula*, ambos de la familia Pomatiopsidae. Clado 8 con $P_B = 73\%$, contiene a los géneros *Gammatricula*, *Neotricula* y *Robertsia*, todos de la familia Pomatiopsidae.

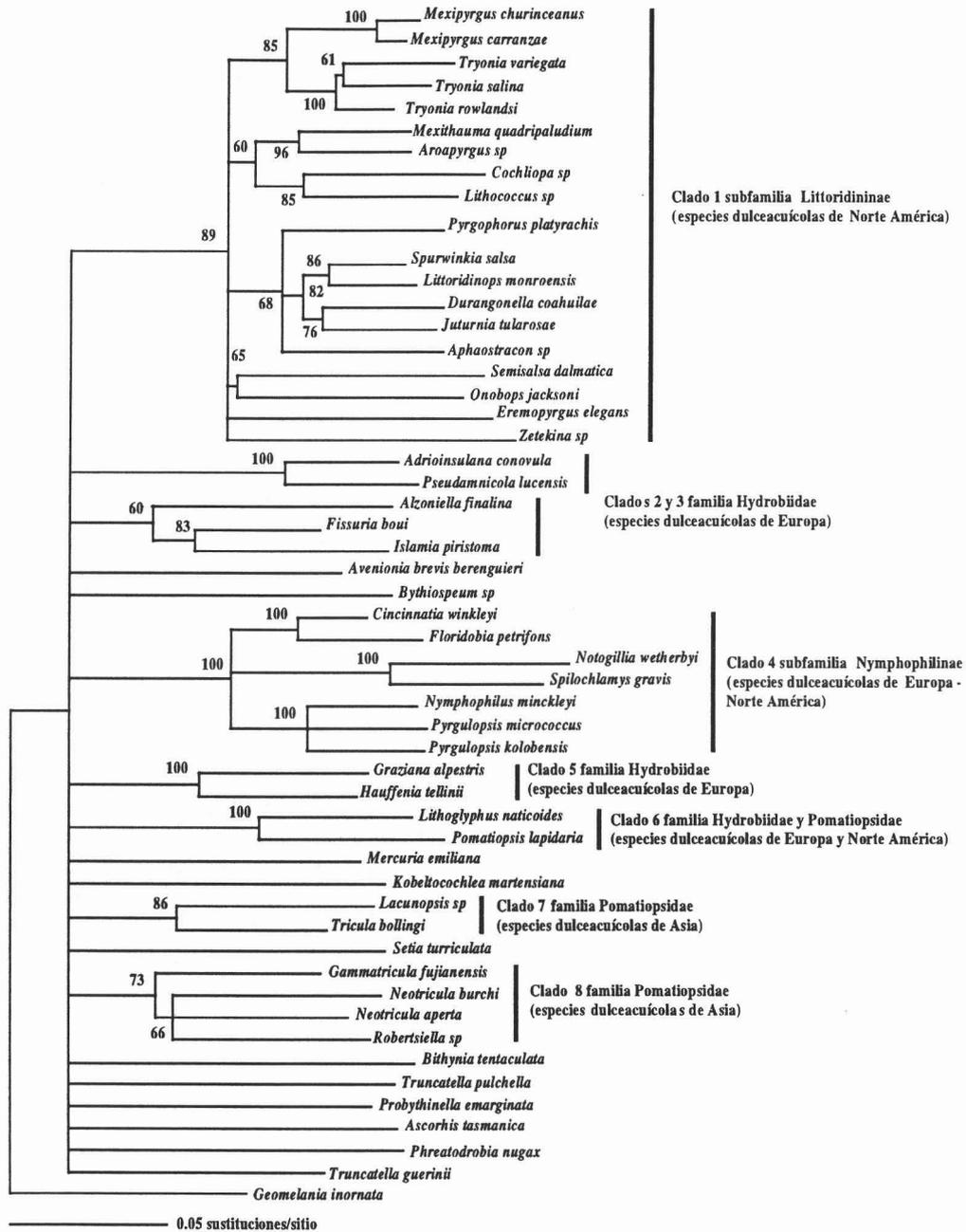


Figura 6.2 Genealogía obtenida con el método de distancias neighbor joining a partir de secuencias del gen CO1 para especies de la superfamilia Rissooidea. Los valores de bootstrap aparecen cuando estos son mayores a 60%

Relación genealógica de especies clasificadas dentro de las subfamilias Littoridininae y Nymphophilinae distribuidas en el noreste de México y sur de Estados Unidos mediante secuencias parciales de ADN mitocondrial (región CO1).

El tercer análisis se llevó a cabo con 28 secuencias de CO1 de especies de la familia Hydrobiidae que se distribuyen en Cuatro Ciénegas y sur de Estados Unidos. Las secuencias analizadas están editadas a una longitud de 582 pares de bases, de estas 334 (57.38%) son constantes, 222 (38.14%) son parsimonio informativas y 26 (4.46%) son parsimonio no informativas.

La figura 7.1 obtenida con el método de Máxima Parsimonia (MP) muestra dos clados dominantes bien definidos, estos se dividen formando varios subclados (de arriba abajo): Clado uno con $P_B = 87\%$, contiene a las especies de la subfamilia Littoridininae, como grupo hermano a este clado, con $P_B = 100\%$, una especie del género *Onobops*. El clado de Littoridininae se divide en tres subclados: 1.a) con $P_B = 93\%$, *Mexipyrgus* y *Tryonia*, 1.b) con $P_B = 89\%$, *Cochliopa* y *Lithococcus*, 1.c) con $P_B = 68\%$, *Durangonella* y *Juturnia*. Clado dos con $P_B = 100\%$, contiene a las especies de la subfamilia Nymphophilinae. Como grupo hermano a este clado está asociada una especie del género *Probythinella* con $P_B = 72\%$. Nymphophilinae se divide en tres subclados: 2.a) con $P_B = 93\%$, *Cincinnatia* y *Floridobia*, 2.b) con $P_B = 100\%$, *Notogillia* y *Spilochlamys*, 2.c) con $P_B = 70\%$, *Nymphophilus* y *Pyrgulopsis*.

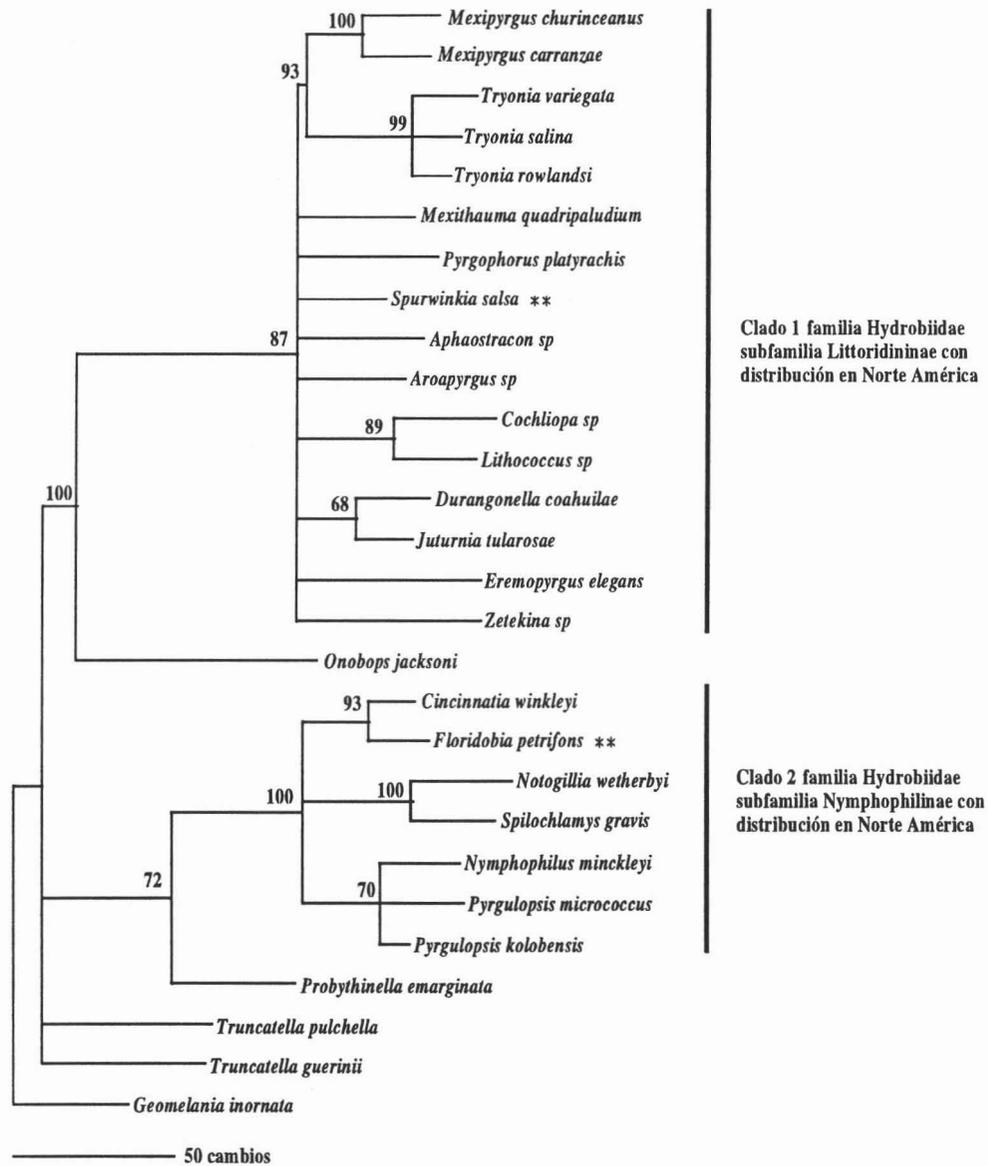


Figura 7.1 Genealogía obtenida con el método de máxima parsimonia a partir de secuencias del gen CO1 para especies de la familia Hydrobiidae endémicas de Cuatro Ciénegas y sur de Estados Unidos. Los valores de bootstrap aparecen cuando son mayores a 60%. Las especies con doble asterisco habitan ambientes estuarinos de la costa este de Norte América.

La figura 7.2 muestra la topología resultante al utilizar el método de distancias NJ. En esta figura se pueden observar también dos clados dominantes, uno bien definido (valor de confianza de bootstrap = 100%) que corresponde a la subfamilia Nymphophilinae y otro con valor de confianza de bootstrap más bajo pero por arriba del 60% se describe de arriba abajo: Clado uno con $P_B = 63\%$, corresponde a géneros clasificados dentro de la subfamilia Littoridininae, como grupo hermano a este clado con valor bt. de 94%, una especie del género *Onobops*. El clado se divide en tres subclados: 1.a) con $P_B = 99\%$, *Mexipyrgus* y *Tryonia*, 1.b) con $P_B = 67\%$, *Mexithauma*, *Aroapyrgus*, *Cochliopa* y *Lithococcus*, 1.c) con $P_B = 66\%$, *Spurwinkia*, *Durangonella* y *Juturnia*. Clado dos (bien definido) con $P_B = 100\%$, contiene a los representantes de la subfamilia Nymphophilinae. El clado se divide en tres subclados. Como grupo hermano al clado dos está asociada una especie del género *Probythinella* $P_B = 79\%$, 2.a) con $P_B = 100\%$, *Cincinnatia* y *Floridobia*, 2.b) con $P_B = 100\%$, *Notogillia* y *Spilochlamys*, 2.c) con $P_B = 100\%$, se agrupan *Nymphophilus* y *Pyrgulopsis*.

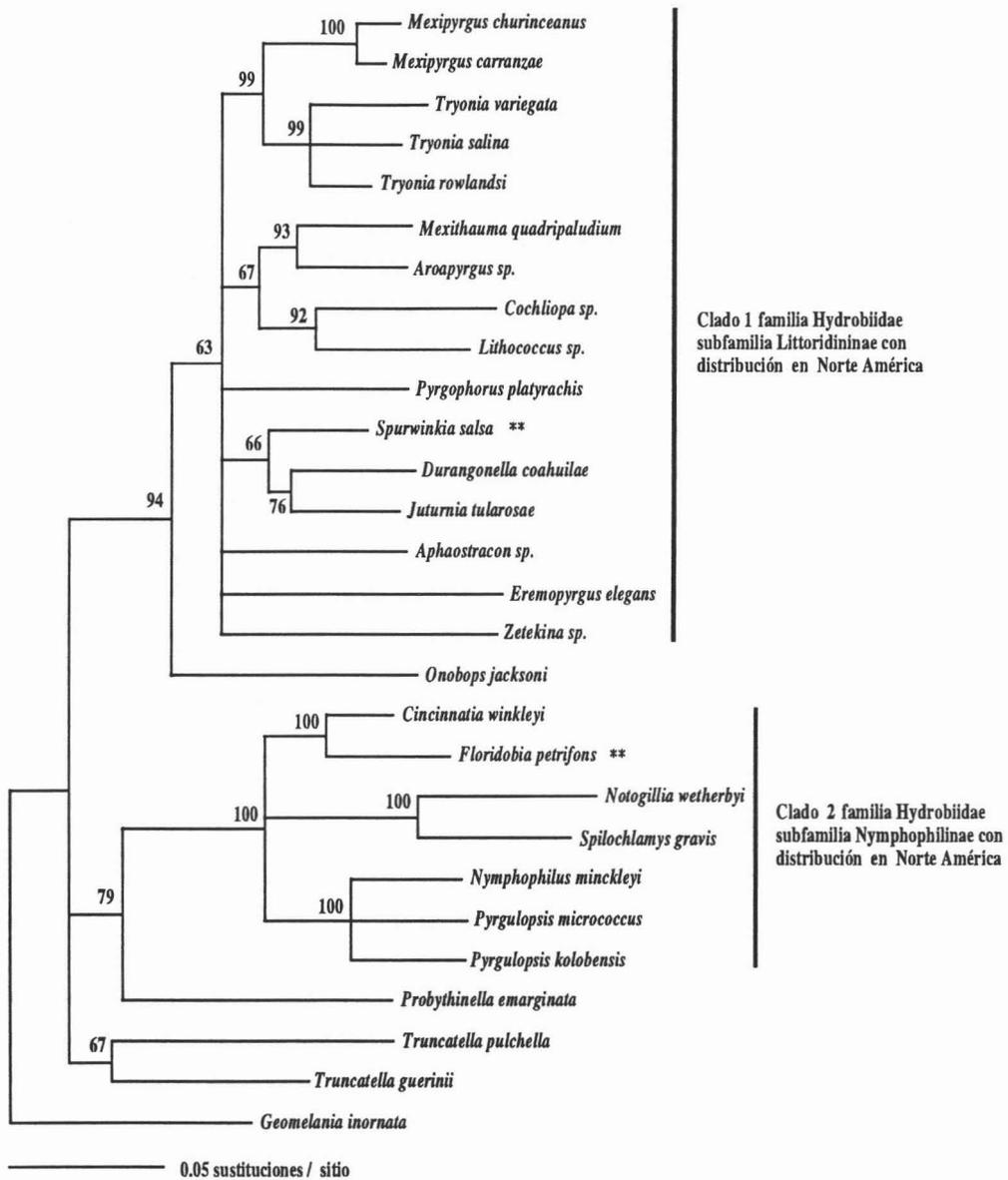


Figura 7.2 Genealogía obtenida con el método de distancias neighbor joining a partir de secuencias del gen CO1 para especies de la familia Hydrobiidae endémicas de Cuatro Ciénegas y sur de Estados Unidos. Los valores de bootstrap aparecen cuando son mayores a 60%. Las especies con doble asterisco habitan ambientes estuarinos de la costa este de Norte América.

Discusión

Aspectos del marcador molecular CO1

Las secuencias de taxones, usadas para la obtención de las genealogías a nivel de la familia Hydrobiidae, registraron niveles de divergencia por arriba del 13.27%, niveles bastante similares a los reportados en la literatura (Brown, 1985; Folmer *et al.*, 1994; Holland y Hadfield, 2002; Hershler *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Wilke *et al.*, 2001; Wilke *et al.*, 2000). Sin embargo, las genealogías por arriba del nivel de familia no son satisfactorias (ver Figuras 5.1 a 6.2) debido en parte, a que la secuencia del gen CO1 analizada tiene una alta tasa de sustituciones a nivel de transiciones, lo que hace que la mayoría de las relaciones entre familias estudiadas pueda estar afectada por saturación mutacional, indicada por un bajo valor de bootstrap para los nodos basales de las genealogías. Por ejemplo, dentro del infraorden Littorinimorpha no se encuentra una asociación clara entre familias de ambiente marino y familias de ambiente dulceacuícola (Fig. 5.1 y 5.2). Dentro de la superfamilia Rissooidea (Fig. 6.1 y 6.2), se agrupan taxones dentro de familias como Pomatiopsidae ó Hydrobiidae (con valores de bootstrap bajos) sin embargo, esta agrupación coincide con otros análisis filogenéticos obtenidos en otros estudios (Wilke *et al.*, 2000; Wilke *et al.*, 2001). Aunque las genealogías 5.1 a 6.2 indican relaciones a diferentes niveles taxonómicos, en todas estas se observan los taxones que corresponden a las subfamilias Littoridininae y Nymphophilinae agrupados en un patrón muy similar.

Como medida para disminuir el efecto de la alta tasa de sustituciones a nivel de transiciones (saturación mutacional) por arriba del nivel de familia y obtener mayor resolución en las genealogías, Wilke *et al.* (2001) recomiendan eliminar las sustituciones en la tercera posición del codón o considerar sólo las transversiones. También se podría emplear un fragmento de CO1 más grande y más conservado, así como la combinación de regiones conservadas de otros marcadores moleculares como la secuencia que codifica para ARN ribosomal 18S (Wilke *et al.*, 2001), sin embargo en este estudio no se aplicaron ninguna de estas medidas.

La variabilidad genética de CO1 a nivel intraespecífico, es otro aspecto que debe ser discutido ya que estudios realizados con el mismo marcador, han revelado diferencias considerables a este nivel por ejemplo, Holland y Hadfield (2002) señalan niveles de divergencia genética entre cero y cinco por ciento para especies de caracoles terrestres de la familia Achantinellidae que habitan la isla de Hawaii. El nivel de variación genética para *Achantinella mustelina* (una de las especies estudiadas) se caracterizó por ser mayor entre poblaciones distribuidas a lo largo de una cadena montañosa que tiene una longitud de 24 Km y menor a nivel intrapoblacional.

La ausencia de diferencias en las secuencias nucleotídicas de CO1 para *M. churinceanus* y *M. quadripaludium* en Churince, puede explicarse a partir del hecho de que los caracteres morfológicos y moleculares, como aloenzimas, ó secuencias de ADN, divergen a tasas diferentes dentro de un mismo taxón (Nei y Kumar, 2000). *Mexipyrgus churinceanus* es una especie con alta plasticidad fenotípica que se hace evidente a lo largo del sistema (Fig. 1), mientras que la variación morfológica en *M. quadripaludium* no es tan marcada. Es importante señalar que al comparar dos haplotipos de *Mexipyrgus* provenientes de diferentes pozas (Churince y Laguna Mojarral) se obtiene un nivel de divergencia genética de un 2.22% esta variación podría sugerir un considerable nivel de estructura genética entre poblaciones de diferentes pozas, las cuales se encuentran separadas por pocos kilómetros, por lo que sugiero el uso de secuencias de ADN más variables, como los microsátélites o las secuencias espaciadoras de ARN, así como el uso de aloenzimas para estimar el grado de variabilidad dentro y entre poblaciones.

La ausencia de polimorfismos en las secuencias de CO1 sugieren que *M. churinceanus* y *M. quadripaludium* conforman una gran población dentro del sistema Churince, que no ha estado subdividida genéticamente y que el gradiente de condiciones abióticas afecta principalmente los caracteres morfológicos de la concha. Probablemente estas modificaciones externas tienen una ventaja adaptativa para la especie. Otra explicación probable con respecto a la falta de diversidad de haplotipos es que, en Churince se dió un cambio drástico que ocasionó un cuello de botella y que a partir de unos cuantos organismos se fundó la población actual.

Análisis genealógicos

Los árboles obtenidos a partir del método de Máxima Parsimonia (MP) y distancias Neighbor Joining (NJ) resultan ser muy similares dentro de cada nivel estudiado. Los dos primeros niveles (infraorden y súper familia) no muestran un patrón genealógico claro. Sin embargo, los patrones genealógicos de Littoridininae y Nymphophilinae se mantienen constantes en los dos primeros niveles ya mencionados y en el tercero, a nivel de la familia Hydrobiidae.

Relación genealógica de especies clasificadas dentro del infraorden Littorinimorpha.

Las topologías obtenidas para el infraorden Littorinimorpha (Fig. 5.1 y 5.2) no poseen una resolución adecuada que nos permita sugerir la relación que tuvieron moluscos de ambientes marinos con la familia Hydrobiidae, que contiene a la mayoría de los caracoles dulceacuícolas. Esta falta de resolución se debe en parte a las observaciones discutidas previamente: alta tasa de sustituciones a nivel de transiciones (saturación del marcador) y no haber usado marcadores moleculares complementarios.

Relación genealógica de especies clasificadas dentro de la superfamilia Rissooidea.

Las figuras 6.1 y 6.2 no muestran una resolución adecuada para establecer relaciones dentro y entre familias integrantes de la superfamilia Rissooidea, por ejemplo Pomatiopsidae, la cual se sabe que tiene un origen monofilético (Davis, 1979). La falta de resolución se debe probablemente a que CO1 llegó al límite de saturación mutacional ya que los taxones usados para la obtención de estas genealogías representan a varias familias. Los árboles filogenéticos (6.1 y 6.2) muestran que los hidróbidos de Europa tienen un origen polifilético, a diferencia de los hidróbidos de Norte América que poseen un origen monofilético. La monofilia de estos organismos pueden ser explicada a partir de poblaciones ancestrales que quedaron aisladas dentro de grandes zonas geográficas como los sistemas hidrológicos del NE de Norte América (Taylor, 1985)

Relación genealógica de especies clasificadas dentro de las subfamilias Littoridininae y Nymphophilinae distribuidas en el NE de México y sur de Estados Unidos.

Las figuras 7.1-7.2 presentan el mismo patrón de agrupamiento para las especies que habitan el noreste de México y sur de Estados Unidos, con valores de bootstrap ligeramente distintos pero siempre mayores a 60%. Las figuras 7.1 y 7.2 son muy interesantes y poseen mejor resolución, ya que se puede observar un clado bien resuelto en el que se agrupan exclusivamente especies de la subfamilia Nymphophilinae que es uno de los grupos más grandes de moluscos acuáticos que se distribuyen en Norte América. Actualmente se consideran 159 especies distribuidas en 10 géneros (Hershler *et al.*, 2003). Esta subfamilia fue creada por Taylor (1966) a partir de los estudios morfológicos de *Nymphophilus minckleyi*. Thompson (1979) incluye en esta familia a siete géneros distribuidos en Norte América y seis géneros distribuidos en Europa Central con base a los caracteres propuestos por Taylor (1966) y siete caracteres morfológicos más. El carácter morfológico que distingue a la subfamilia Nymphophilinae de otras es la presencia de glándulas superficiales sobre el pene (Thompson, 1979; Hershler, 1994). Es importante mencionar que todos los Nymphophilinae de Norte América tienen una o más de estas glándulas, excepto por algunas pocas especies del género *Pyrgulopsis* (*P. bruesi* y *P. greggi*, Hershler, 1994). Las especies norte americanas de Nymphophilinae son más parecidas entre ellas con respecto a los patrones de las glándulas, lo mismo sucede con las especies europeas, las primeras tienen glándulas relativamente alargadas, mientras que las segundas no tienen glándulas tan pronunciadas (Thompson, 1979). El clado de Nymphophilinae obtenido en este estudio, soporta la hipótesis de Thompson (1979) y los resultados de Hershler *et al.* (2002) con respecto a la monofilia de la subfamilia Nymphophilinae de Norte América. De hecho, los valores de bootstrap que resuelven este clado son mayores a los presentados por Hershler (2002), bootstrap menor a 50 en comparación con los valores de bootstrap de 100 obtenidos por diferentes métodos de inferencia genealógica en este estudio (Fig. 7.1 y 7.2).

Aunque los Nymphophilinae continúan siendo reconocidos como una subfamilia distinta (Ponder y Waren, 1988), otros especialistas han estado en desacuerdo y discuten que esta subfamilia está muy escasamente diferenciada de la subfamilia Hydrobiinae (Bodon y Giusti, 1991). Con respecto a esta discusión, Hershler *et al.* (2002) obtiene en sus resultados de inferencia filogenética una cercana relación de los Nymphophilinae de Norte América y la subfamilia Hydrobiinae de Europa. Los resultados de este estudio (Fig. 6.1 y 6.2) indican que las especies europeas consideradas dentro Nymphophilinae (*Avenionia brevis berenguieri* y *Mercuria emiliana*) no se relacionan cercanamente con el clado de los Nymphophilinae de Norte América. Las figuras 7.1 y 7.2 resuelven que el género más cercanamente relacionado con Nymphophilinae es *Probythinella*; éste género es considerado por algunos autores como Nymphophilinae y por otros como Hydrobiinae. Algunos aspectos interesantes de este género son: Ausencia de glándulas sobre el pene (Hershler *et al.*, 2003) y su distribución en la costa este de los Estados Unidos. Las genealogías mencionadas anteriormente muestran a *Probythinella emarginata* excluida del clado de Nymphophilinae y esto podría sugerir que pertenece a las especies americanas de la subfamilia Hydrobiinae, aunque hacen falta más estudios a nivel morfológico, molecular y de distribución.

El clado compuesto por *Nymphophilus*, *Pyrgulopsis*, *Floridobia*, *Cincinnatia*, *Notogillia* y *Spilochlamys*, es consistente morfológicamente, con la posición superficial, en las hembras, de la *bursa copulatrix* y su ducto sobre la glándula de albúmina, que es única en especies de Norte América (Hershler *et al.*, 2003). Desafortunadamente los resultados de este estudio no permiten discutir la relación de los Nymphophilinae europeos, se considera que se debe trabajar a nivel molecular con más secuencias de taxones norte americanos y europeos pertenecientes a esta subfamilia, además se deben analizar secuencias de Hydrobiidae de ambos continentes para establecer claramente su relación.

Respecto a la distribución de Nymphophilinae, se sabe que es disyunta Norte América-Europa (Thompson, 1979) sin encontrarse en otro lugar. Este patrón de distribución no parece ser consecuencia de la dispersión de larvas planctónicas a través del océano, sino una consecuencia del desplazamiento de las placas tectónicas. Esto puede sugerir que el origen de este grupo de moluscos pueda ser anterior a la separación de Laurasia en Norte América y Europa al abrirse el Océano Atlántico. En tal caso estos moluscos se originaron probablemente antes del Triásico (Thompson, 1979). Esta hipótesis tendrá que ser estudiada principalmente a nivel molecular aunque, debido a la carencia de registro fósil para especies de esta familia los datos de reloj molecular pudieran no ser precisos.

Clado de la subfamilia Cochliopinae (Taylor, 1966) = Littoridininae

El género *Tryonia* está constituido como una subunidad monofilética dentro de la subfamilia Cochliopinae = Littoridininae basado en una sinapomorfía de la inserción posterior-dorsal del vaso deferente (*vas deferens*) dentro de la próstata y análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN mitocondrial. El género está conformado por 18 especies reconocidas que se distribuyen desde Centro América (dos especies) hasta los Estados Unidos (16 especies) (Hershler, 2001). Un nuevo género norteamericano, *Pseudotryonia* Hershler, fué erigido para tres especies previamente colocadas en el género *Tryonia*. El nuevo género *Pseudotryonia* es diagnosticado con base en una combinación de caracteres genitales. Los miembros de este género son *P. brevissima* Pilsbry, (1890) distribuido en Florida; *P. adamantina* Taylor, (1987) y *P. alamosae* Taylor, (1987) distribuidas en la Cuenca del río Bravo, y una especie no descrita que se encuentra en la cuenca del río Tombigbee. Un nuevo género monotípico, *Ipnobius* Hershler, es erigido para *Tryonia robusta* Hershler, (1989) que se distribuye en el Valle de la Muerte, en California. *Ipnobius* es diagnosticado por autoapomorfias genitálicas. Los lectotipos son *Melania exigua* Morelet y *Amnicola protea* Gould (Hershler, 2001). La distribución de *Tryonia* y los géneros relacionados con él, puede sugerir una población ancestral, ampliamente distribuida desde Centro América hasta los sistemas hidrográficos de Norte América especialmente los del oeste, en donde llegó

a su punto máximo de diversificación (Hershler *et al.*, 2001). Se debe destacar que el género mono específico *Mexipyrgus* es el que se encuentra más cercanamente relacionado con el género *Tryonia* (Hershler *et al.*, 2001).

Mexithauma es un género monoespecífico que se encuentra en Cuatro Ciénegas y se relaciona cercanamente con el género *Aroapyrgus* al aplicar el método de NJ (Fig. 7.2). *Aroapyrgus* se distribuye en México en donde se reconocen cuatro especies, tres distribuidas en el sureste y una en el norte del país. El número de especies es desconocido y los datos moleculares son escasos, existe solo una secuencia en GenBank para este género proveniente de río Jagual al suroeste de la provincia de Guabalá en Panamá (Hershler *et al.*, 2001). Esta carencia de información debe resolverse para poder establecer la relación que guardan estos dos géneros. Se debe prestar atención al subclado compuesto por *Juturnia* y *Durangonella* de la subfamilia Littoridininae. De acuerdo con Hershler *et al.* (2002), *Juturnia* es un nuevo género compuesto por tres especies que habitan la región del río Grande del suroeste de Norte América. Es considerado como una subunidad monofilética de la subfamilia Littoridininae, con base a un análisis de secuencias de ADN mitocondrial y un carácter morfológico único compartido (la presencia de un solo lóbulo no glandular sobre el borde superficial del pene), (Hershler *et al.*, 2002). Este autor indica que *Juturnia* está más cercanamente relacionado con especies que habitan zonas costeras y sugiere que los progenitores de este género penetraron tierra adentro, debido al ascenso del nivel del mar durante el Laramide (Cretácico tardío hace 70 millones de años). Subsecuentemente se atribuyen eventos de vicarianza de las poblaciones ancestrales en el sureste de Nuevo México, debido al desarrollo de la depresión del Pecos, el origen del sistema hidrográfico entre la falla del río Grande y las grandes planicies del sur. En este estudio *Juturnia* se relaciona más con *Durangonella*, género que se distribuye en México. *Durangonella coahuilae* Taylor, (1966), es endémica de la cuenca de Cuatro Ciénegas y habita pozas en donde el agua es ligeramente salada.

Los géneros *Lithococcus* y *Cochliopa* deben ser analizados detalladamente ya que el primero tiene una distribución en Costa Rica en ambientes estuarinos; no se conoce adecuadamente el número de especies que integran este género y su rango de distribución. Para *Cochliopa* se han identificado cinco especies: *Cochliopa compacta* Pilsbry (1935), en San Luis Potosí México, *C. francesae* Goodrich y Schaile, (1935) en Guatemala, *C. picta* Pilsbry (1909) en San Luis Potosí, *C. riograndensis* Pilsbry (1935) y *C. texana* Pilsbry (1935) ambas distribuidas en Texas. Es importante integrar a estos análisis las especies del género *Cochliopina* que se distribuyen en Coahuila.

Implicaciones biogeográficas y de conservación.

Los hidróbidos presentan características atractivas para estudios evolutivos y biogeográficos. Por ejemplo, son caracoles obligadamente acuáticos, la capacidad de dispersión es muy limitada y el registro fósil de los Hydrobiidae de Norte América se encuentra desde la Era Cenozoica hace 65.5 millones de años (Taylor, 1985). Los hidróbidos actuales de Norte América exhiben un mayor grado de endemismo local en comparación con otros organismos como peces y salamandras y por lo tanto podrían ser muy útiles para comprender el cambio hidrogeográfico de Norte América durante el Periodo Cuaternario (hace dos millones de años hasta la época actual). También pueden ser un modelo ideal para estudiar los procesos de especiación a partir de vicarianza, así como el impacto que han tenido las fuerzas evolutivas en los eventos de especiación. Debido al rango de distribución tan restringido en la mayoría de los hidróbidos, el alto grado de endemismo y su susceptibilidad a los ambientes perturbados, hacen de estas especies buenos indicadores de contaminación ambiental.

Perspectivas.

- Para resolver las relaciones filogenéticas a nivel de súper familias dentro del infraorden Littorinimorpha, considero necesario el uso combinado de varios marcadores moleculares que se encuentren conservados, especialmente aquellas secuencias de ADN relacionadas con la síntesis de enzimas metabólicas. En cuanto a las especies que integran la superfamilia Rissooidea, el marcador CO1 puede ser muy útil, sin embargo se deben emplear pruebas de saturación mutacional, así como el análisis de segmentos más grandes y conservados. Se podrían analizar solo transversiones, o hacer uso combinado de varios marcadores moleculares como el gen que codifica para el ARN-r 18s más CO1.
- Las especies dentro de Nymphophilinae y Littoridininae deben ser estudiadas más detalladamente a nivel de estructura genética de las poblaciones en toda Norte América, para poder identificar Unidades Evolutivamente Significativas (ESU) es decir, poblaciones discretas a nivel geográfico que difieran a nivel molecular o no molecular como morfología y hábito alimenticio. Lo anterior con el propósito de maximizar la conservación de la diversidad biológica de las especies endémicas. Para esta aproximación es aconsejable el uso de otros marcadores como microsatélites, ITS, genes nucleares variables, aloenzimas, etc. sin descartar el uso de CO1 el cual se podría emplear para medir los niveles de diversidad genética de las especies que se distribuyen en más de un sistema acuático en Cuatro Ciénegas.

- En Cuatro Ciénegas, se deben hacer estudios de variabilidad genética de *Mexyppyrgus* y *Mexithauma*, caracoles asociados a manantiales termales, así como caracoles no nativos. Estos estudios contribuirían al esclarecimiento de la hipótesis concerniente al flujo subterráneo del agua (Minckley, 1969), ya que las conexiones hidrológicas entre sistemas permitirían la dispersión y por lo tanto el flujo génico entre poblaciones que se encuentran aisladas en la superficie. Con este conocimiento, se podrán identificar posibles rutas de dispersión para especies invasivas y elaborar estrategias de conservación y manejo de fauna.
- Sería muy interesante diseñar estudios que contesten las siguientes preguntas:
 1. ¿Cuál es el tipo de recurso(s) alimenticio(s) que usan los hidróbidos de Cuatro Ciénegas?
 2. ¿Cada especie de hidróbido en Cuatro Ciénegas se especializa en consumir un recurso?
 3. ¿La distribución de los caracoles está asociada a la distribución del recurso alimenticio?
 4. ¿Los microorganismos que sirven como recurso alimenticio son endémicos de Cuatro Ciénegas y cuál es la relación que mantienen con otros microorganismos de otros sistemas acuáticos de Norte América?

Conclusiones

- Las topologías obtenidas a partir de los análisis genealógicos realizados indican que las subfamilias Nymphophilinae y Littoridininae tienen un origen monofilético, la primera presenta una distribución disyunta (Europa, Norte América), siendo el sur y la costa este de Estados Unidos, el lugar en donde se encuentra la mayor diversidad de especies. La subfamilia Littoridininae se distribuye en el continente Americano y son los sistemas hidrológicos de Norte América donde se encuentra la mayor diversidad de especies para esta subfamilia. La relación del género *Mexipyrgus* (endémico de Cuatro Ciénegas) y el género *Tryonia* (oeste de Estados Unidos) sugiere que los sistemas hidrológicos de Norte América eran más amplios, que se encontraban interconectados y que los cambios geohidrológicos y climatológicos han afectado los patrones de distribución y diversidad en esta zona.
- El marcador molecular Citocromo Oxidasa subunidad 1 (CO1) resultó útil para establecer relaciones entre taxones asociados a las subfamilias Nymphophilinae y Littoridininae sin embargo las relaciones por arriba de este nivel taxonómico están poco resueltas debido en parte a la saturación mutacional del marcador.
- Las genealogías obtenidas en esta tesis indican que las especies de caracoles que habitan los sistemas acuáticos de Cuatro Ciénegas, Coahuila, sí se encuentran relacionadas estrechamente con especies del oeste, sur y costa este de los Estados Unidos. Se puede sugerir que las especies actuales que conforman la malacofauna de Cuatro Ciénegas se relacionan con ancestros que habitaban ambientes costeros a estuarinos, pues se tienen evidencias de especies del género *Spurwinkia* en la subfamilia Littoridininae, ó especies del género *Floridobia* en la subfamilia Nymphophilinae que se distribuyen en hábitats estuarinos, (ver Fig. 7.1 y 7.2). El tipo de relación de las especies clasificadas dentro de Nymphophilinae, especialmente las europeas debe resolverse en trabajos posteriores con la combinación de otros marcadores moleculares, búsqueda de registro fósil y comparación anatómica de las especies que se distribuyen en América y Europa.

Bibliografía

Badino, G., Bernabel, T., De Vivo, A., Giulivo, I., Savino, G. 2004. Bajo el desierto: el misterio de las aguas de Cuatro Ciénegas. pp. 28-43. Tintoretto editzioni, Italia.

Bodon, M. and Giusti, F. 1991. The genus *Moitessieria* in the island of Sardinia in Italy: new data on the systematics of *Moitessieria* and *Paladilhia* (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Malacologia* 33: 1-30.

Boore, J.L. 1999. Survey and summary animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 8: 1767-1780.

Boore, J.L., Medina, M. and Rosenberg, L. 2004. Complete Sequences of the Highly Rearranged Molluscan Mitochondrial Genomes of the Scaphopod *Graptacme eborea* and the Bivalve *Mytilus edulis*. *Molecular Biology and Evolution* 8: 1492-1503.

Brown, W.M. 1985. The mitochondrial genome of animals. In: *Molecular evolutionary genetics* (R. J. MacIntyre, ed.), pp. 95-130. Plenum Press, New York.

Davis, G.M. 1979. The origin and evolution of the gastropod family Pomatiopsidae, with emphasis on the Mekong River Triculinae. *Academy of Natural Sciences Philadelphia* 20: 1-120.

Davis, G.M., Mazurkiewicz, M. and Mandracchia, M. 1982. *Spurwinkia*: Morphology, Systematics, and Ecology of a new genus of North American Marshland Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda). *Proceedings of Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 134: 143-177.

Deacon, J.E. and Williams, C.D. 1991. Ash Meadows and the legacy of the Devils Hole pupfish. In Minckley, W.L. and J.E. Deacon (eds), *Battle Against Extinction: Native Fish Management in the American West*. pp. 68-87. University of Arizona Press, Tucson.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

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

Forti, P., Giulivo, I., Mecchia, M. and Piccini, L. 2004. Las aguas de Cuatro Ciénegas. En: *Bajo el desierto: el misterio de las aguas de Cuatro Ciénegas* (Badino, G. ed.), pp. 77-87. Tintoretto edizioni, Italia.

Hall, T. A. 1997 - 2001. BioEdit versión 5.0.9 Sequence Alignment Editor.

Hershler, R. 1985. Systematic revision of the Hydrobiidae (Gastropoda: Rissoacea) of the Cuatro Cienegas basin, Coahuila, Mexico. *Malacologia* 26: 31-123.

Hershler, R. 1994. A review of the North American freshwater snail genus *Pyrgulopsis* (Hydrobiidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 554: 1-115.

Hershler, R. 2000. The Hydrobiid snails (Gastropoda: Rissooidea) of the Cuatro Ciénegas Basin: Systematic Relationships and Ecology of a Unique Fauna. pp. 1-20. Texas State University, USA.

Hershler, R. 2001. Systematics of the North and Central American aquatic snail genus *Tryonia* (Rissooidea: Hydrobiidae). *Smithsonian Contributions to Zoology* 612:1-53.

Hershler, R., Liu, H.P. and Stockwell, C. 2002. A new genus and species of aquatic gastropods (Rissooidea: Hydrobiidae) from the North American Southwest: phylogenetic relationships and biogeography. *Proceedings of the Biological Society of Washington* 115: 171-188.

- Hershler, R., Liu, H.P. and Thompson, F.G. 2001. Phylogenetic Relationships of the Cochliopinae (Rissooidea: Hydrobiidae) An Enigmatic Group of Aquatic Gastropods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 17-25.
- Hershler, R., Liu, H.P. and Thompson, F.G. 2003. Phylogenetic relationships of North American nymphophilinae gastropods based on mitochondrial DNA sequences. *Zoologica Scripta* 4: 357-366.
- Hershler, R., Liu, H.P. and Mulvey, M. 1999. Phylogenetic relationships within the aquatic snail genus *Tryonia*: Implications for biogeography of the North American Southwest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 377-391.
- Hershler, R. and Minckley, W.L. 1986. Microgeographic variation in the banded spring snail (Hydrobiidae: *Mexipyrghus*) from the Cuatro Cienegas Basin. Coahuila, Mexico. *Malacologia* 2: 357-374.
- Hershler, R. and Ponder, W. 1998. A review of morphological characters of hydrobioid snails. *Smithsonian Contributions to Zoology* 600: 1-55.
- Holland, B.S. and Hadfield, M.G. 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology* 11, 365-375.
- Kabat, A. and Hershler, R. 1993. The prosobranch snail family Hydrobiidae (Gastropoda: Rissooidea): review of classification and supraspecific taxa. *Smithsonian Contributions to Zoology* 547: 1-94.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.

Liu, H.P., Hershler, R. and Thompson, F.G. 2001 Phylogenetic Relationships of the Cochliopinae (Rissooidea: Hydrobiidae): An enigmatic Group of Aquatic Gastropods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21: 17-25.

Meyer, E.R. 1973. Late-Quaternary paleoecology of the Cuatro Ciénegas basin, Coahuila, Mexico. *Ecology* 54: 982-995.

Minckley, W.L. 1969. Environments of the Bolson of Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico: With Special Reference to the Aquatic Biota. *University of Texas* 2:1-65.

Minckley, W.L. 1984. Cuatro Ciénegas Fishes: research review and a local test of diversity vs. habitat size. *Journal of Arizona-Nevada Academy of Sciences* 19: 13-21.

Moline, A., Shuster, S., Hendrickson, D., Marks, J. 2004. Genetic variation in a desert aquatic snail (*Nymphophilus minckleyi*) from Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. *Hydrobiologia* 522: 179-192

Nei, M. and Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and Phylogenetics*, pp. 87-140. Oxford University Press, Inc. New York.

O'Brien, C. and Blinn, D.W. 1999. The endemic spring snail *Pyrgulopsis montezumensis* in a high CO₂ environment: importance of extreme chemical habitats as refugia. *Freshwater Biology* 42: 225-234.

Pinkava, D.J. 1984. Vegetation and Flora of the Bolsón of Cuatro Ciénegas Region. Coahuila, México: IV. Summary, Endemism and Corrected Catalogue. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science* 19: 23-47.

Ponder, W.F. and Waren, A. 1988. Appendix: Clasification of the Caenogastropoda and Heterostropha a list of the family group names and higher taxa: prosobranch phylogeny. *Malacological Review, Supplement* 4: 288-326.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The Neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

SEMARNAP. 1999. Programa de manejo del área de protección de flora y fauna Cuatro Ciénegas México, pp. 7 – 31. Instituto Nacional de Ecología, Ciudad de México.

Shepard, W.D. 1993. Desert springs both rare and endangered. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 3: 351–359.

Souza, S.V. 2002-01. Comunidades bacterianas de Cuatro Ciénegas Coahuila. Propuesta para investigación científica y tecnológica. CONACYT, SEMARNAT- 2002-1.

Spolsky, Ch., Davis, M. and Yi, Z. 1996. Sequencing methodology and Phylogenetic analysis: Cytochrome b gene sequences reveals significant diversity in Chinese populations of *Oncomelania* (Gastropoda: Pomatiopsidae). *Malacologia*, 38: 213-221.

Starobogatov, Y. I. and Sitnikova, T.Y. 1983. Sistema otryada Littoriniformes (Gastropoda Pectinibranchia). In Likharev, I. M. (ed.). *Mollusci, sistematika, ekologiya I zakonomernosti raspredeleniya*. pp. 18-22. Izdatel'stvo Nauka, Leningrad.

Swofford, D. L. 1999. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Tang, C.M. and Roopnarine P.D. 2001. Extreme morphological variability in extreme evaporitic systems: Thermal spring snails from the Chihuahuan Desert, Mexico. pp. 1-28. California Academy of Sciences, USA.

Taylor, D.W. 1966. A remarkable snail fauna from Coahuila, Mexico. *Veliger*, 9, 2: 152-228.

Taylor, D.W. 1985. Evolution of freshwater drainages and molluscs in western North America. In: Late Cenozoic History of the Pacific Northwest Interdisciplinary studies on the Clarkia Fossil beds of Northern Idaho. (Charles J. Smiley, ed.), pp. 265-321. Pacific Division Press, USA.

Thompson, F.G. 1979. The systematic relationships of the hydrobiid snail genus *Nymphophilus* Taylor 1966 and the status of the subfamily Nymphophilinae. Malacological Review 12: 41-50.

Wilke, T., Davis, G.M., Falniowski, A., Giusti, F., Bodon, M. 2001. Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 151:1-21.

Wilke, T., Davis, G.M., Gong, X. and Liu, H.X. 2000. *Erhaia* (Gastropoda: Rissooidea) phylogenetic relationships and the question of *Paragonimus* coevolution in Asia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 62 , 4: 453-459.

Williams, J.E., Bowman, D.B., Brooks, J.E., Echelle, A.A., Edwards, R.J., Hendrickson, D.A. and Landye, J.J. 1985. Endangered aquatic ecosystems in North American deserts with a list of vanishing fishes of the region. Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science 20: 1-61.

Anexos

Anexo 1.

Protocolo para extraer ADN de caracoles Hydrobiidae, endémicos de Cuatro Ciénegas a partir del método de Spolsky *et al.*, (1996).

Para la extracción de ADN total, se seleccionaron individuos adultos de *Mexithauma quadripaludium* y *Mexipyrgus churinceanus* de una longitud promedio de seis milímetros. Se usó la superficie plana de un vidrio de reloj para moler al individuo con todo y concha, el uso del mortero no es muy aconsejable por que las micro porosidades retienen una parte del tejido (el cual no es muy abundante).

La lisis celular se llevó a cabo agregando 600 µl de buffer de lisis (0.02M tris, 0.1M EDTA, 0.5% Sarkosil, 200 ug/ml de proteinasa K). Las muestras permanecieron en incubación a 55° C toda la noche. Posteriormente se agregaron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de solución de extracción (5% CTAB, 0.5M NaCl), se mezcló ligeramente y se agregaron 600 µl de cloroformo. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante un minuto, se tomó la fase acuosa (la parte superior SIN TOCAR la interfase blanca que contiene proteínas). Se agregaron 800 µl de solución de precipitación (1% CTAB, 50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA), se mezcló gentilmente y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante (se debe tener mucho cuidado de no desprender el agregado sedimentado “pellet” del fondo del vial) al eliminar el sobrenadante. Posteriormente, el agregado sedimentado se resuspendió en 300 µl de solución NTE (1.2M NaCl, 10mM Tris, 1mM EDTA conteniendo 100 ug/ml RNasa). Las muestras debieron ser incubadas a 37° C por 20 minutos. Transcurrido este tiempo se agregaron 600 µl de etanol al 100% frío y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se realizaron dos lavados más con etanol frío al 70%, (se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos). Después del segundo lavado, se permitió la evaporación de todo el alcohol posible que hubiese quedado, dejando los viales destapados, dentro de una campana de flujo laminar, después se resuspendió el pellet en 50µl de agua para PCR (bidestilada, estéril, libre de ADNasas) y se incubó a 55° C por 20-30 minutos, se hicieron alícuotas del ADN en solución y se guardaron a -20° C hasta su uso.

Anexo 2

Protocolo de PCR para *Mexipyrgus* y *Mexithauma*.

Se cuantificó la cantidad y calidad del ADN total, mediante el uso de un biofotómetro. Para conocer la cantidad de ADN, se midió el rango de absorción a una longitud de onda de 260 nm. Se midieron otros parámetros como: concentración de proteínas, en el rango de absorción de 320nm. Posteriormente se estandarizaron todas las muestras, mediante diluciones, a una concentración de 35 ng/μl.

Las reacciones para el PCR se hicieron en un volumen total de 100 μl. Las siguientes tablas muestran las concentraciones y volúmenes usados para una reacción.

PCR para *Mexipyrgus churinceanus*:

	[] inicial	[] Final	Volumen
Amortiguador de reacción	10x	1x.	10 μl.
MgCl	30mM.	2.5mM.	8.33 μl.
Dinucleotidos (A, T, G, C)	10mM.	0.15mM.	1.5 μl.
Primer COIL1492 F	10 μm.	0.1 μm.	1.0 μl.
Primer COIH 2390 R	10 μm.	0.1 μm.	1.0 μl.
ADN polimerasa	5u/ μl.	1ul.	0.2 μl.
H2O			76.97 μl.
ADN		35ng/reacción	1.0 μl.

Ciclos de temperatura: 5 min. 95° C (1 ciclo), [1 min. 94° C, 1 min. 46° C, 2 min. 72° C por 35 ciclos] 7 min. 72° C (1 ciclo).

PCR para *Mexithauma quadripaludium*:

	[] inicial	[] Final	Volumen
Amortiguador de reacción	10x	1x	10 µl.
MgCl	30mM.	2.6mM.	8.64 µl.
Dinucleotidos (A, T, G, C)	10mM.	0.2mM.	2 µl.
Primer COIL1492 F	10 µm.	0.05 µm.	0.5 µl.
Primer COIH2390 R	10 µm.	0.05 µm.	0.5 µl.
ADN polimerasa	5u/ µl.	0.5u	0.15 µl.
H2O			77.21 µl.
ADN		35ng/reacción	1 µl.

Ciclos de temperatura: 5 min. 94° C (1 ciclo), [1 min. 94° C, 1 min. 53° C, 2 min. 72° C por 35 ciclos] 7 min. 72° C (1 ciclo).

En ambas especies, las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ThermoHybrid PCR Express ®. En cada PCR realizado, se llevó a cabo una reacción control, para verificar que no hubiese contaminación. El control consistió en una reacción de PCR en donde se colocaron todos los reactivos en la misma concentración descrita dependiendo de la especie, pero no se añadió el ADN. Cinco µl de cada reacción de PCR, incluyendo el control, se corrieron en un gel de agarosa al 1%, con buffer TAE y bromuro de etidio adicionado al gel durante 25 minutos. Para verificar que la amplificación correspondía a la longitud del segmento deseado y que no hubiese contaminación. Se utilizó una escalera (ladder de 100pb) para identificar la longitud de los productos sintetizados. De no existir alguna irregularidad, se tomaron los 95µl restantes de cada reacción de PCR y se sometieron a electroforesis durante 25 minutos en gel hecho con agarosa al 1% con buffer TAE y bromuro de etidio adicionado al gel. Las bandas que correspondían a la longitud del segmento amplificado (600 pares de bases) fueron cortadas y el ADN entrelazado a la matriz de agarosa, se purificó usando el QIAquick kit de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Anexo 3

Lista de taxones analizados

Familia Hydrobiidae	Localidad	Número de acceso de GenBank
<i>Alzoniella finalina</i>	Italy, Liguria, Savona, Rialto, Molino, spring at Porra River. 44.219°N; 8.255°E	AF367650
<i>Adrioinsulana conovula</i>	Croatia, Pag Island, Zubovici. 44.520°N; 14.972° E	AF367628
<i>Aphaostracon</i> sp.	USA, Alexander Springs, FL.	AF129320
<i>Aroapyrgus</i> sp.	Panama, río Jagual, 2.0 Km. Southwest of Guabalá.	AF354759
<i>Ascorhis tasmanica</i>	Australia.	AF129330
<i>Avenionia brevis berenguieri</i>	France, Gard, spring of the fountain of St. Victor-La Coste. 44.057°N; 4.636°E	AF367638
<i>Bythiospeum</i> sp.	France, Gard, Lirac, source de la Nizon. 44.03°N; 4.68°E	AF367634
<i>Cincinnatia winkeyi</i>	USA, Dunstan River salt marsh, Scarborough.	AF520917
<i>Cochliopa</i> sp.	Panama, río Jagual, 2.0 Km. Southwest of Guabalá. (UF271928)	AF354762
<i>Durangonella coahuilae</i>	México, Spring west of Sierra San Marcos Cuatro Ciénegas Coahuila. (USNM854953)	AF354761
<i>Eremopyrgus elegans</i>	Mexico, Ojo Vareleno, 2.4 km NW of Casas Grandes, Chihuahua. 30° 24' N; 107° 59' E	AF388170

<i>Fissuria boui</i>	France, Alpes Maritimes, Peymeinade, spring near La Prouveresse". 43.642°N; 6.887°E	AF367654
<i>Floridobia petrifons</i>	USA, Rock Springs, Kelly Park, Orange Co, FL.	AF520920
<i>Graziana alpestris</i>	Italy, Liguria, Savona, Molino, spring at the Porra River. 44.219°N; 8.255°E	AF367641
<i>Hauffenia tellinii</i>	Italy, Friuli-Venetia-Julia, Udine Aquileila, Canale Panigai near Panigai. 45.874°N; 13.485°E	AF367640
<i>Heleobia dalmatica</i>	Croacia, provincia Pirovac.	AF129321
<i>Heleobops carrikieri</i>	USA, Maryland, Dorchester County, End of Ragged Point Road (597).	AF213347
<i>Islamia piristoma</i>	Italy, Liguria, La Spezia, Arcola, Magra River. 44.104°N; 9.933°E	AF367639
<i>Juturnia tularosae</i>	USA, North American Southwest.	AF474371
<i>Lithococcus sp</i>	Ecuador, Rio Cayapas, south of burbon Esmeraldas.	AF354763
<i>Lithoglyphus naticoides</i>	Poland, Narew River near Drozdowo.	AF367642
<i>Littoridinops monroensis</i>	USA, Maryland, Dorchester Co., marsh near the boatyard on Ragged Point Road. 38.557°N ; 76.251°W	AF367644
<i>Mercuria emiliana</i>	Spain, Mallorca, La Puebla.	AF213346
<i>Mexipyrgus carranzae</i>	México, Mojarral West Laguna Coahuila.	AF129325

<i>Mexipyrgus churinceamus</i>	México, Laguna Churince Cuenca de Cuatro Ciénegas Coah.	Trabajo laboratorio
<i>Mexithauma quadripaludium</i>	México, Laguna Churince Cuenca de Cuatro Ciénegas Coah.	Trabajo laboratorio
<i>Nymphophilus minckleyi</i>	México, Laguna Churince, Cuatro Ciénegas Coahuila.	AF354771
<i>Notogillia wetherbyi</i>	USA, North America.	AF520918
<i>Onobops jacksoni</i>	USA, Maryland, Dorchester Co., Town Point.	AF367645
<i>Phrantela marginata</i>	Australia, tributary of Thirteen Mile Creek.	AF129331
<i>Phreatodrobia nugax</i>	USA, Artesian well, South-west Texas.	AF520927
<i>Probythinella emarginata</i>	USA, North America.	AF520913
<i>Pseudamnicola lucensis</i>	Italy, Tuscany, Lucca, Bagni Caldi. 44.007°N; 10.585°E	AF367651
<i>Pyrgophorus platyrachis</i>	USA, Florida, Hillsborough County, Lithia Spring". 27.866°N; 82.225°E	AF367632
<i>Pyrgulopsis kolobensis</i>	USA, North America.	AY485532
<i>Pyrgulopsis pecosensis</i>	USA, North America.	AF520929
<i>Semisalsa dalmatica</i>	Croatia, Pirovac spring near Pirovac. 43.816°N; 15.676°E	AF367631
<i>Spilochlamys gravis</i>	USA, Alexander Springs, Lake Co., FL.	AF520919
<i>Spurwinkia salsa</i>	USA, Maryland, Dorchester Co., Town Point.	AF367633
<i>Tryonia rowlandsi</i>	USA, North America.	AF061775

<i>Tryonia salina</i>	USA, North America.	AF061776
<i>Tryonia variegata</i>	USA, North America.	AF061778
<i>Zetekina sp</i>	Panama, Chiriqui Prov., Rio Jagual, 2.0 km southwest of Guabala.	AF354767
Familia Pomatiopsidae <i>Pomatiopsis lapidaria</i>	USA, Michigan, Washtenaw County. 42.0893°N; 83.9725°W	AF367636
<i>Lacunopsis sp</i>	China, Yunnan, Xishuangbanna, Mengla.	AF213343
<i>Tricula bollingi</i>	Thailand, Northern Thailand.	AF531553
<i>Gammatricula chinensis</i>	Asia.	AF253068
<i>Neotricula burchi</i>	Thailand, Northern Thailand.	AF531544
<i>Neotricula aperta</i>	Laos, Mekong river, Khong Island.	AF531541
<i>Robertsiaella sp</i>	Asia.	AF531550
Familia Amnicolidae		
<i>Erhaia jianouensis</i>	China, Fujian, Nanping, Tianxi.	AF367652
<i>Colligyus greggi</i>	USA, ID, Bear Lake Co., Saint Charles Spring.	AY196173
Familia Bithyniidae		
<i>Bithynia tentaculata</i>	Croatia, Cetina River estuary near Omis.	AF367643
Familia Benedictiidae		
<i>Kobeltocochlea martesiana</i>	Rusia.	Z92984

Familia Pyrgulidae		
<i>Pyrgula annulata</i>	Baical.	AF445331
Familia Rissoidae		
<i>Setia turriculata</i>	Bulgaria, 1Km W of Nensebar; 27° 71' 73'', 42° 65' 99''	AF253082
Familia Littorinidae		
<i>Peasiella lutulenta</i>	Viet Nam, Ha Long Bay, Tuan Chau Island.	AJ488611
<i>Laevilittorina caliginosa</i>	Argentina, Tierra del Fuego, Bahia Lapataia.	AJ488607
<i>Bembicium auratum</i>	Australia, New South Wales, Sydney Harbour.	AJ488606
<i>Afrolittorina knysnaensis</i>	South Africa, East London.	AJ488628
<i>Austrolittorina antipodum</i>	New Zealand, South Island, Kaikoura.	AJ488623
<i>Littoraria zebra</i>	Ecuador, Esmeraldas, San Lorenzo.	AJ488636
Familia Cypraeidae		
<i>Lyncina porteri</i>	Indo-Pacific.	AY161681
<i>Pseudozonaria robertsi</i>	Indo-Pacific.	AY161753
<i>Notadusta punctata punctata</i>	Indo- Pacific.	AY161823
<i>Cribrarula falax</i>	Indo-Pacific.	AY161803
Familia Capuloidae		
<i>Hyalorisia sp</i>	Nueva Caledonia.	AF550501

Familia Calyptraeidae		
<i>Calyptraea chinensis</i>	Spain, O'Grove Bay, Spain"	AF546064
<i>Crepidula arenata</i>	México, La Paz, BCS. 24° 17' N, 110° 17' W"	AF546023
<i>Bicatillus extintorum</i>	Singapore, Changi Point Beach, East of Singapore.	AF546061
<i>Sigapatella terranova</i>	New Zealand.	AF550498
<i>Crepidula walshi</i>	Singapore, Changi Point Beach, East of Singapore.	AF550488
Grupo externo		
<i>Truncatella guerinii</i> (marino)	Western Pacific.	AF120635
<i>Truncatella pulchella</i> (marino)	Jamaica, W of Falmouth. 18° 29' 46'' N 77° 39' 46'' W	AF253085
<i>Geomelania inornata</i> (marino)	Jamaica, Trelawny Parish, Quickstep.	AF367629
Infraorden Neogastropoda		
<i>Turbinella angulata</i>	Bahamas, Great Guana Cay.	U86332