

Estudios morfo-anatómicos y  
poblacionales en algunas especies de  
*Bulimulus*  
(Gastropoda: Bulimulidae),  
principalmente en provincia de  
Buenos Aires.

Lic. Ana Carolina Díaz  
Tesis Doctoral

Directoras

Stella Maris Martin

Alejandra Rumi Macchi  
Zubiaurre

Universidad Nacional de La Plata  
Museo de La Plata- Facultad de Ciencias Naturales y Museo

La Plata, 2022





Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

**Estudios morfo-anatómicos y poblacionales en algunas especies de *Bulimulus* (Gastropoda: Bulimulidae), principalmente en provincia de Buenos Aires**

Lic. Ana Carolina Díaz

Directoras:

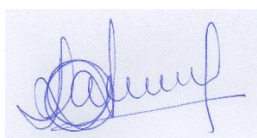
Stella Maris Martin  
Alejandra Rumi Macchi Zubiaurre

Lugar de Trabajo:

División Zoología Invertebrados  
Museo de La Plata- Facultad de Ciencias Naturales y Museo  
Universidad Nacional de La Plata

La Plata, 2022

El presente trabajo se presenta para optar por el título de Doctora en Ciencias Naturales. El mismo se realizó en la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata (MLP), Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), bajo la Dirección de la Dra. Stella Maris Martín y Dra. Alejandra Rumi Macchi Zubiaurre.



Tesista: Lic. Ana Carolina Díaz



Directora: Dra. Stella Maris Martín



Directora: Dra. Alejandra Rumi  
Macchi Zubiaurre

*“Las especies de este subgénero se encuentran entre los Bulimuli más difíciles de distinguir, basándose en la mayoría de los casos en leves y poco conspicuas diferencias....”*

Pilsbry, H. A. 1897-1898

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la Beca Doctoral otorgada que permitió desarrollar el presente trabajo de Tesis Doctoral.

A la Facultad de Ciencias Naturales y Museo y a la Dirección del Museo por permitirme trabajar, desarrollarme y crecer en el edificio histórico.

A mis directoras, Dra. Stella Maris Martín y Dra. Alejandra Rumi, por el apoyo y la confianza de siempre.

A los jurados Dr. Nicolás E. Tamburi, Dra. María Gabriela Cuezco y Dra. Julia Pizá que, con sus sugerencias y comentarios, contribuyeron a enriquecer esta tesis.

A la jefa de la División, Dra. Cristina Damborenea y al jefe de Sección Malacología, Dr. Gustavo Darrigran por brindarme siempre un lugar en la división.

A los encargados de las colecciones malacológicas en el Museo de La Plata y el Museo de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, por la excelente predisposición a ayudar.

Al personal de la Biblioteca “Florentino Ameghino”, por tantos trabajos rastreados.

A todos los autores que previamente investigaron a los Bulimulidae y que de esta manera con su esfuerzo y trabajo han contribuido con los antecedentes de la presente tesis.

A mi familia, amigos y compañeros de trabajo por el acompañamiento y la escucha constante.

A dos grandes que siempre que lo necesité me brindaron una mano enorme.

A todos.... ¡¡¡ Muchísimas gracias!!!

## INDICE ANALÍTICO

	<b>Página</b>
<b>ABREVIATURAS GENERALES.....</b>	<b>xix</b>
<b>ABREVIATURAS ESPECÍFICAS POR CAPÍTULO.....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTADO DE ESPECIES MENCIONADAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xxvi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxix</b>
<b>INTRODUCCION GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>8</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>8</b>
<b>PARTE 1.- ESTUDIOS MORFO-ANATÓMICOS</b>	
<b>CAPÍTULO 1.1.- CARACTERES CONQUIOLARES.....</b>	<b>9</b>
1.1.A. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1.B. MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
1.1.B.1. Material estudiado .....	16
1.1.B.2. Procesamiento de las muestras .....	21
1.1.B.3. Acondicionamiento de material conquiolar .....	21
1.1.B.4. Discriminación morfológica.....	22
1.1.B.4.a. Análisis cualitativo.....	22
1.1.B.4.b. Análisis morfométrico.....	22
1.1.C. RESULTADOS.....	26
1.1.C.1. Discriminación morfológica.....	26
1.1.C.1.a. Análisis cualitativo.....	26
<i>Bulimulus bonariensis</i> (Rafinesque, 1833).....	27
Sinonimia.....	27
Localidad tipo.....	28
Material tipo.....	28

Distribución.....	28
Ecorregiones.....	28
Lotes identificados.....	28
Descripción.....	29
<i>Bulimulus rushii</i> Pilsbry, 1897.....	35
Sinonimia.....	35
Localidad tipo.....	35
Material tipo.....	36
Distribución.....	36
Ecorregiones.....	36
Lotes identificados.....	36
Descripción.....	36
<i>Bulimulus vesicalis</i> Pfeiffer, 1853.....	41
Sinonimia.....	41
Localidad tipo .....	41
Material tipo .....	41
Distribución.....	42
Ecorregiones.....	42
Lotes identificados.....	42
Descripción.....	42
1.1.C.1.b. Análisis morfométrico.....	45
1.1.D. DISCUSIÓN.....	59
<b>CAPÍTULO 1.2.- CARACTERES ANATÓMICOS.....</b>	<b>65</b>
1.2.A. INTRODUCCIÓN.....	66
1.2.B. MATERIALES Y MÉTODOS.....	70
1.2.B.1. Material estudiado.....	70
1.2.B.2. Procesamiento de las muestras.....	71
1.2.B.2.a. Proceso de disección.....	72
1.2.B.2.b. Acondicionamiento de rádula y mandíbula.....	72

1.2.C. RESULTADOS.....	74
1.2.C.1. <i>Bulimulus bonariensis</i> .....	74
1.2.C.1.a. Morfología general y masa visceral.....	74
1.2.C.1.b. Órganos del manto.....	77
1.2.C.1.c. Sistema digestivo.....	79
1.2.C.1.d. Sistema nervioso central.....	83
1.2.C.1.e. Sistema reproductor .....	84
Morfología del complejo peniano “A”.....	86
Morfología del complejo peniano “B” .....	86
Morfología del complejo peniano “C” .....	86
Morfología del complejo peniano “D” .....	86
Morfología del complejo peniano “E” .....	87
Morfología del complejo peniano “F” .....	87
Morfología del complejo peniano “G” .....	87
Morfología del complejo peniano “H” .....	87
Caracterización histológica del complejo peniano con morfología “A”.....	94
1.2.C.2. <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	98
1.2.C.2.a. Morfología general y masa visceral .....	98
1.2.C.2.b. Órganos del manto.....	99
1.2.C.2.c. Sistema digestivo.....	100
1.2.C.2.d. Sistema nervioso central.....	104
1.2.C.2.e. Sistema reproductor.....	105
Caracterización histológica del complejo peniano.....	107
1.2.C.3. <i>Bulimulus rushii</i> .....	112
1.2.C.3.a. Morfología general y masa visceral.....	112
1.2.C.3.b. Órganos del manto.....	114
1.2.C.3.c. Sistema digestivo.....	115
1.2.C.3.d. Sistema nervioso central.....	119
1.2.C.3.e. Sistema reproductor.....	120
Caracterización histológica del complejo peniano.....	122
1.2.D. DISCUSIÓN.....	127

<b>CAPÍTULO 1.3.- ANÁLISIS GENÉTICOS</b> .....	<b>134</b>
1.3.A. INTRODUCCIÓN .....	<b>135</b>
1.3.B. MATERIALES Y MÉTODOS .....	<b>137</b>
1.3.B.1. Material estudiado.....	<b>137</b>
1.3.B.2. Procesamiento de las muestras.....	<b>137</b>
1.3.B.3. Extracción de ADN genómico total.....	<b>138</b>
1.3.B.4. Amplificación de genes mitocondriales.....	<b>139</b>
1.3.B.5. Purificación y secuenciación.....	<b>141</b>
1.3.B.6. Análisis Bioinformático .....	<b>141</b>
1.3.B.6.a. Distancia genética.....	<b>142</b>
1.3.B.6.b. Abordaje Filogenético.....	<b>142</b>
1.3.B.6.c. Delimitación de especies.....	<b>143</b>
1.3.C. RESULTADOS .....	<b>144</b>
1.3.C.1. Extracción de ADN genómico total.....	<b>144</b>
1.3.C.2. Amplificación de genes mitocondriales.....	<b>145</b>
1.3.C.3. Análisis y edición de secuencias.....	<b>145</b>
1.3.C.4 Análisis Bioinformático.....	<b>146</b>
1.3.C.4.a Distancias genéticas.....	<b>146</b>
1.3.C.4.b. Abordaje Filogenético.....	<b>148</b>
1.3.C.4.c. Delimitación de especies.....	<b>150</b>
1.3.D. DISCUSIÓN.....	<b>152</b>
<b>PARTE 1. COMPLEMENTO.-</b>	
<b>DIAGNOSIS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS</b> .....	<b>155</b>
1.A. <i>Bulimulus bonariensis</i> (Rafinesque, 1833).....	<b>155</b>
1.A.1. Diagnósis .....	<b>155</b>
1.A.2. <u>Distribución</u> .....	<b>155</b>
1.A.1.a. <i>B. bonariensis</i> propiamente dicho/ Morfotipo 1.....	<b>155</b>
Diagnósis .....	<b>155</b>

Distribución.....	156
1.A.1.b. Morfotipo 2.....	156
Diagnosis .....	156
Distribución.....	156
1.A.1.c. Morfotipo 3.....	156
Diagnosis .....	156
Distribución .....	156
1.A.1.d. Morfotipo 4.....	156
Diagnosis .....	156
Distribución.....	156
1.A.1.e. Morfotipo 5 .....	156
Diagnosis .....	156
Distribución.....	157
1.A.1.f. Morfotipo 6.....	157
Diagnosis .....	157
Distribución.....	157
1.A.1.g. Morfotipo 7.....	157
Diagnosis .....	157
Distribución.....	157
1.A.1.h. Morfotipo 8.....	157
Diagnosis .....	157
Distribución.....	157
1.B. <i>Bulimulus rushii</i> Pilsbry, 1897.....	157
1.B.1. Diagnosis.....	157
1.B.2. Distribución .....	158
1.C. <i>Bulimulus vesicalis</i> (Pfeiffer, 1853).....	158
1.C.1. Diagnosis .....	158
1.C.2. Distribución .....	159

**PARTE 2.- ESTUDIOS POBLACIONALES EN *Bulimulus bonariensis*.**

<b>CAPÍTULO 2.1.- CRECIMIENTO EN BIOMASA.....</b>	<b>160</b>
2.1.A. INTRODUCCIÓN .....	161
2.1.B. MATERIALES Y MÉTODOS.....	163
2.1.B.1. Colecta.....	163
2.1.B.2. Mantenimiento de los individuos en el laboratorio.....	163
2.1.B.3. Parámetros biológicos de las puestas.....	163
2.1.B.4. Modelos de crecimiento.....	164
2.1.B.4.a. Modelo de von Bertalanffy.....	164
2.1.B.4.b. Modelo Logístico.....	164
2.1.B.4.c. Modelo de Gompertz.....	165
2.1.B.5. Tabla de vida.....	166
2.1.C. RESULTADOS.....	168
2.1.C.1. Parámetros biológicos de las puestas.....	168
2.1.C.2. Modelos de crecimiento.....	169
2.1.C.2.a. Análisis de crecimiento considerando a todos los individuos como una cohorte.....	169
Modelo de von Bertalanffy.....	169
Modelo Logístico.....	171
Modelo de Gompertz.....	171
2.1.C.2.b. Análisis de crecimiento en los grupos individuales.....	173
Puesta/Grupo 1.....	173
Puesta/Grupo 2.....	174
Puesta/Grupo 3.....	175
Puesta/Grupo 4.....	176
Puesta/Grupo 5.....	177
2.1.C.3. Tabla de vida.....	179
2.1.D. DISCUSIÓN.....	183

<b>CAPÍTULO 2.2.- CICLO GAMÉTICO Y MADUREZ GONADAL.....</b>	<b>189</b>
2.2.A. INTRODUCCIÓN.....	190
2.2.B. MATERIALES Y MÉTODOS.....	192
2.2.B.1. Muestreos .....	192
2.2.B.2. Procesamiento de las muestras.....	194
2.2.B.3. Mediciones.....	194
2.2.B.4. Procesamiento histológico.....	194
2.2.B.4.a. Fijado, conservación y deshidratación.....	194
2.2.B.4.b. Inclusión y montaje.....	195
2.2.B.4.c. Tinción.....	195
2.2.B.5. Estructura gonadal.....	196
2.2.B.6. Ciclo gametogénico.....	196
2.2.B.6.a. Estadios del desarrollo gonadal.....	196
2.2.B.6.b. Clasificación de las células germinales.....	196
2.2.B.6.c. Variación morfológica en relación al desarrollo gonadal.....	197
2.2.B.6.d. Talla de primera madurez gonadal.....	197
2.2.C. RESULTADOS.....	198
2.2.C.1. Muestreos.....	198
2.2.C.2 Estructura gonadal.....	198
2.2.C.3. Ciclo gametogénico.....	202
2.2.C.3.a. Estadios del desarrollo gonadal.....	202
Proliferación .....	202
Crecimiento.....	202
Pre-evacuación.....	203
Evacuación.....	203
Reabsorción.....	203
2.2.C.3.b. Períodos del ciclo gonadal.....	204
Reclutamiento.....	204

Post-reclutamiento.....	<b>204</b>
Pre-reclutamiento.....	<b>204</b>
2.2.C.3.c. Variación morfológica en relación al desarrollo gonadal.....	<b>208</b>
2.2.C.3.d. Talla de primera madurez gonadal.....	<b>209</b>
2.2.D. DISCUSIÓN.....	<b>212</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>216</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>222</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>244</b>
Secuencias	
Citocromo Oxidasa subunidad I (COI).....	<b>244</b>
Gen ribosomal 16S (16S-ARNr).....	<b>248</b>

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.1.1.</b> Distribución geográfica de los lotes de <i>Bulimulus</i> (Leach, 1814) estudiados.....	20
<b>Figura 1.1.2.</b> Distribución geográfica de lotes estudiados procedentes del área metropolitana de Buenos Aires.....	21
<b>Figura 1.1.3.</b> Representación de las variables continuas medidas en ejemplares de <i>Bulimulus</i> .....	25
<b>Figura 1.1.4.</b> Conchilla adulta de <i>Bulimulus bonariensis</i> . Morfología "A" .....	31
<b>Figura 1.1.5.</b> Conchilla adulta de <i>Bulimulus bonariensis</i> . Morfología "B" .....	32
<b>Figura 1.1.6.</b> Conchilla adulta de <i>Bulimulus bonariensis</i> . Morfología "C" .....	33
<b>Figura 1.1.7.</b> Protoconcha de <i>Bulimulus bonariensis</i> adulto.....	34
<b>Figura 1.1.8.</b> Protoconcha de <i>Bulimulus bonariensis</i> juvenil.....	35
<b>Figura 1.1.9.</b> Conchilla adulta de <i>Bulimulus rushii</i> procedente de la provincia de Córdoba.....	38
<b>Figura 1.1.10.</b> Conchilla adulta de <i>Bulimulus rushii</i> procedente de la provincia de Buenos Aires.....	39
<b>Figura 1.1.11.</b> Protoconcha de <i>Bulimulus rushii</i> .....	40
<b>Figura 1.1.12.</b> Conchilla de <i>Bulimulus rushii</i> .....	41
<b>Figura 1.1.13.</b> Conchilla adulta de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	43
<b>Figura 1.1.14.</b> Protoconcha de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	44
<b>Figura 1.1.15.</b> Representación gráfica de los componentes principales 1 y 2 en <i>B. bonariensis</i> , <i>B. rushii</i> y <i>B. vesicalis</i> .....	47
<b>Figura 1.1.16.</b> Representación del análisis discriminante en <i>B. bonariensis</i> , <i>B. rushii</i> y <i>B. vesicalis</i> .....	49
<b>Figura 1.1.17.</b> Análisis de componentes principales 1 y 2 en las tres morfologías de <i>B. bonariensis</i> .....	51

<b>Figura 1.1.18.</b> <i>Análisis discriminante en las tres morfologías de <u>B. bonariensis</u></i> .....	<b>52</b>
<b>Figura 1.1.19.</b> <i>Análisis de componentes principales 1 y 2 de <u>B. bonariensis</u> con sus tres morfologías y <u>B. vesicalis</u></i> .....	<b>54</b>
<b>Figura 1.1.20.</b> <i>Análisis discriminante de <u>B. bonariensis</u> con sus tres morfologías y <u>B. vesicalis</u></i> .....	<b>56</b>
<b>Figura 1.1.21.</b> <i>Análisis de componentes principales 1 y 2 de <u>B. rushii</u></i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 1.2.1.</b> <i>Aspecto general de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>75</b>
<b>Figura 1.2.2.</b> <i>Morfología general y masa visceral de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>76</b>
<b>Figura 1.2.3.</b> <i>Aspecto de <u>Bulimulus bonariensis</u> bajo MEB</i> .....	<b>77</b>
<b>Figura 1.2.4.</b> <i>Órganos del manto de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>78</b>
<b>Figura 1.2.5.</b> <i>Detalle de los vasos</i> .....	<b>79</b>
<b>Figura 1.2.6.</b> <i>Sistema digestivo completo de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>81</b>
<b>Figura 1.2.7.</b> <i>Bulbo bucal de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>82</b>
<b>Figura 1.2.8.</b> <i>Rádula y mandíbula de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>82</b>
<b>Figura 1.2.9.</b> <i>Sistema nervioso central de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>84</b>
<b>Figura 1.2.10.</b> <i>Sistema reproductor de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>88</b>
<b>Figura 1.2.11.</b> <i>Detalle del ovotestis de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>89</b>
<b>Figura 1.2.12.</b> <i>Variación morfológica del complejo peniano en <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>90</b>
<b>Figura 1.2.13.</b> <i>Localización de los ejemplares de <u>Bulimulus bonariensis</u> según la morfología del complejo peniano</i> .....	<b>93</b>
<b>Figura 1.2.14.</b> <i>Complejo peniano con morfología “A” de <u>Bulimulus bonariensis</u>, típico de la provincia de Buenos Aires</i> .....	<b>95</b>
<b>Figura 1.2.15.</b> <i>Cortes transversales del complejo peniano de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>96</b>
<b>Figura 1.2.16.</b> <i>Detalle de los tipos celulares encontrados en el complejo peniano de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>97</b>
<b>Figura 1.2.17.</b> <i>Morfología general y masa visceral de <u>Bulimulus vesicalis</u></i> .....	<b>99</b>

<b>Figura 1.2.18.</b> Órganos del manto de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>100</b>
<b>Figura 1.2.19.</b> Sistema digestivo completo de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>102</b>
<b>Figura 1.2.20.</b> Bulbo bucal de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>103</b>
<b>Figura 1.2.21.</b> Rádula y mandíbula de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>103</b>
<b>Figura 1.2.22.</b> Sistema nervioso central de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>104</b>
<b>Figura 1.2.23.</b> Sistema reproductor de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>106</b>
<b>Figura 1.2.24.</b> Detalle del sistema reproductor.....	<b>107</b>
<b>Figura 1.2.25.</b> Complejo peniano de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>109</b>
<b>Figura 1.2.26.</b> Cortes transversales del complejo peniano de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>110</b>
<b>Figura 1.2.27.</b> Detalle de los tipos celulares encontrados en el complejo peniano de <i>Bulimulus vesicalis</i> .....	<b>111</b>
<b>Figura 1.2.28.</b> Aspecto general de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>113</b>
<b>Figura 1.2.29.</b> Morfología general y masa visceral de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>114</b>
<b>Figura 1.2.30.</b> Órganos del manto de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>115</b>
<b>Figura 1.2.31.</b> Sistema digestivo completo de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>117</b>
<b>Figura 1.2.32.</b> Bulbo bucal de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>118</b>
<b>Figura 1.2.33.</b> Rádula y mandíbula de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>118</b>
<b>Figura 1.2.34.</b> Sistema nervioso central de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>119</b>
<b>Figura 1.2.35.</b> Sistema reproductor de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>121</b>
<b>Figura 1.2.36.</b> Vista en detalle de algunas estructuras del sistema reproductor de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>122</b>
<b>Figura 1.2.37.</b> Complejo peniano de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>124</b>
<b>Figura 1.2.38.</b> Cortes transversales del complejo peniano de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>125</b>
<b>Figura 1.2.39.</b> Detalle de los tipos celulares encontrados en el complejo peniano de <i>Bulimulus rushii</i> .....	<b>126</b>
<b>Figura 1.3.1.</b> Extracción de ADN genómico total.....	<b>144</b>

<b>Figura 1.3.2.</b> Amplificación de regiones parciales de los genes COI y 16S.....	<b>145</b>
<b>Figura 1.3.3.</b> Electroferogramas parciales de MLP-Ma 15166.....	<b>146</b>
<b>Figura 1.3.4.</b> Árbol basado en la región parcial del gen COI.....	<b>149</b>
<b>Figura 1.3.5.</b> Árbol basado en la región parcial del gen 16S ARNr.....	<b>150</b>
<b>Figura 2.1.1.</b> Puesta y juvenil de <i>Bulimulus bonariensis</i> .....	<b>168</b>
<b>Figura 2.1.2.</b> Método gráfico de Walford.....	<b>170</b>
<b>Figura 2.1.3.</b> Curva de crecimiento ajustada al modelo de von Bertalanffy.....	<b>170</b>
<b>Figura 2.1.4.</b> Curva de crecimiento ajustada al modelo logístico.....	<b>171</b>
<b>Figura 2.1.5.</b> Curva de crecimiento ajustada al modelo de Gompertz.....	<b>172</b>
<b>Figura 2.1.6.</b> Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 1.....	<b>173</b>
<b>Figura 2.1.7.</b> Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 2.....	<b>174</b>
<b>Figura 2.1.8.</b> Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 3.....	<b>175</b>
<b>Figura 2.1.9.</b> Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 4.....	<b>176</b>
<b>Figura 2.1.10.</b> Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 5.....	<b>177</b>
<b>Figura 2.1.11.</b> Curva de supervivencia.....	<b>181</b>
<b>Figura 2.1.12.</b> Mortalidad.....	<b>182</b>
<b>Figura 2.1.13.</b> Esperanza de vida.....	<b>182</b>
<b>Figura 2.2.1.</b> Sitio de colecta de ejemplares de <i>Bulimulus bonariensis</i> para el estudio de ciclo gamético y madurez gonadal .....	<b>192</b>
<b>Figura 2.2.2.</b> Ambiente en el cual se realizaron los muestreos de <i>Bulimulus bonariensis</i> .....	<b>193</b>
<b>Figura 2.2.3.</b> Aspecto general del ovotestis.....	<b>200</b>
<b>Figura 2.2.4.</b> Estadios gonadales <i>Bulimulus bonariensis</i> .....	<b>200</b>

<b>Figura 2.2.5.</b> <i>Frecuencia estacional porcentual de los estadios gonadales observados en <u>B. bonariensis</u> durante el período 2018-2019.....</i>	<b>205</b>
<b>Figura 2.2.6.</b> <i>Corte longitudinal del conducto hermafrodita de <u>Bulimulus bonariensis</u>.....</i>	<b>206</b>
<b>Figura 2.2.7.</b> <i>Histogramas de frecuencias de tallas ovocitarias estacionales (marzo 2018 - diciembre 2019).....</i>	<b>207</b>
<b>Figura. 2.2. 8.</b> <i>Variación morfológica del espermioviducto.....</i>	<b>209</b>
<b>Figura 2.2.9.</b> <i>Modelo de regresión logística para estimar la madurez gonadal de <u>Bulimulus bonariensis</u>.....</i>	<b>210</b>
<b>Figura 2.2.10.</b> <i>Longitud del complejo peniano (LCP) en función de la longitud total (LT).....</i>	<b>211</b>
<b>ANEXO Figura 1.....</b>	<b>256</b>
<b>ANEXO Figura 2.....</b>	<b>256</b>

## INDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.1.1.</b> <i>Material estudiado en la Parte 1.- de la presente tesis doctoral.....</i>	<b>16</b>
<b>Tabla 1.1.2.</b> <i>Lotes y ejemplares seleccionados para el análisis morfométrico.....</i>	<b>45</b>
<b>Tabla 1.1.3.</b> <i>Resumen de valores de cada variable en las especies estudiadas.....</i>	<b>46</b>
<b>Tabla 1.1.4.</b> <i>Aporte de las variables al ACP de <u>B. bonariensis</u>, <u>B. rushii</u> y <u>B. vesicalis</u>.....</i>	<b>48</b>
<b>Tabla 1.1.5.</b> <i>Aporte de las variables al AD de <u>B. bonariensis</u>, <u>B. rushii</u> y <u>B. vesicalis</u> .....</i>	<b>49</b>
<b>Tabla 1.1.6.</b> <i>Aporte de las variables al ACP en las tres morfologías de <u>B. bonariensis</u>.....</i>	<b>51</b>
<b>Tabla 1.1.7.</b> <i>Aporte de las variables al AD en las tres morfologías de <u>B. bonariensis</u>.....</i>	<b>52</b>
<b>Tabla 1.1.8.</b> <i>Resumen de las morfologías conquiolares encontradas en <u>B. bonariensis</u>.....</i>	<b>53</b>
<b>Tabla 1.1.9.</b> <i>Aporte de las variables al ACP de <u>B. bonariensis</u> con sus tres morfologías y <u>B. vesicalis</u> .....</i>	<b>55</b>
<b>Tabla 1.1.10.</b> <i>Aporte de las variables al AD de las tres morfologías de <u>B. bonariensis</u> y <u>B. vesicalis</u>.....</i>	<b>56</b>
<b>Tabla 1.1.11.</b> <i>Aporte de las variables al ACP de <u>B. rushii</u>.....</i>	<b>58</b>
<b>Tabla 1.2.1.</b> <i>Lotes y ejemplares seleccionados para el análisis anatómico.....</i>	<b>70</b>
<b>Tabla 1.2.2.</b> <i>Morfologías de complejo peniano y conquiolares asociadas.....</i>	<b>91</b>
<b>Tabla 1.3.1.</b> <i>Material implementado en el análisis genético.....</i>	<b>137</b>
<b>Tabla 1.3.2.</b> <i>Composición de la mezcla de reacción utilizada en la amplificación de 16S ARNr y COI.....</i>	<b>140</b>
<b>Tabla 1.3.3.</b> <i>Perfiles de ciclado térmico.....</i>	<b>140</b>
<b>Tabla 1.3.4.</b> <i>Distancias genéticas basadas en el marcador COI.....</i>	<b>147</b>
<b>Tabla 1.3.5.</b> <i>Distancias genéticas basadas en el marcador 16S.....</i>	<b>148</b>
<b>Tabla 1.3.6.</b> <i>Resumen de los resultados <math>\kappa/\theta</math> testeados en base al set de datos del</i>	

<i>gen COI</i> .....	<b>151</b>
<b>Tabla 1.3.7.</b> <i>Resumen de los resultados <math>\kappa/\theta</math> testeados en base al set de datos del gen 16S ARNr</i> .....	<b>151</b>
<b>Tabla 2.1.1.</b> <i>Parámetros biológicos de las puestas de <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>169</b>
<b>Tabla 2.1.2.</b> <i>Estadísticos y criterios de información para los modelos de crecimiento aplicados en la cohorte de <u>Bulimulus bonariensis</u> estudiada</i> .....	<b>172</b>
<b>Tabla 2.1.3.</b> <i>Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 1</i> .....	<b>174</b>
<b>Tabla 2.1.4.</b> <i>Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 2</i> .....	<b>175</b>
<b>Tabla 2.1.5.</b> <i>Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 3</i> .....	<b>176</b>
<b>Tabla 2.1.6.</b> <i>Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 4</i> .....	<b>177</b>
<b>Tabla 2.1.7.</b> <i>Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 5</i> .....	<b>178</b>
<b>Tabla 2.1.8.</b> <i>Comparación de parámetros con especies exóticas</i> .....	<b>179</b>
<b>Tabla 2.1.9.</b> <i>Tabla de vida</i> .....	<b>180</b>
<b>Tabla 2.2.1.</b> <i>Clasificación de las células germinales en <u>Bulimulus bonariensis</u></i> .....	<b>206</b>
<b>ANEXO Tabla 1</b> .....	<b>252</b>
<b>ANEXO Tabla 2</b> .....	<b>254</b>

## ABREVIATURAS GENERALES

ANSP: Academy of Natural Sciences Philadelphia	MLP: Museo de La Plata
cm: centímetro	mm: milímetro
DE: desvío estándar	mM: milimolar
Fig: figura	ng: nanogramo
hs: hora	NHMUK: The Natural History Museum United Kingdom
IBS: Instituto de Biología Subtropical	p/v: peso/volumen
M: molar	seg: segundo
-Ma: Colección Malacológica	U: unidades
MACN: Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”	µm: micras
MEB: microscopio electrónico de barrido	µl: microlitro
mg/ml: miligramo/mililitro	µM: micromolar
min: minuto	v/v: volumen/volumen
ml: mililitro	̄x: promedio

## ABREVIATURAS ESPECÍFICAS POR CAPÍTULO

<b>Parte 1.- Capítulo 1.1.-</b>	LPV: longitud de la penúltima vuelta
AA: ancho de la abertura	LT: longitud total de la conchilla
ACP: Análisis de Componentes Principales	LUA: longitud del último anfracto
AD: Análisis Discriminante	M: morfología conquiliar
APV: ancho de la penúltima vuelta	MANOVA: Análisis multivariado de la varianza
CP: componente principal	Nº: número identificadorio
DMA: diámetro mayor	n: número total de ejemplares que compone cada lote
DME: diámetro menor	PB: número de ejemplares del correspondiente lote que cuenta con partes blandas
E: eje	R: número de referencia en el mapa
LA: longitud de la abertura	
LE: longitud de la espira	
LEP: longitud del espacio parietal	

**Capítulo 1.2.-**

a: aurícula	f: folículo
an: ano	fl: flagelo
au: abertura del uréter	g: gonoporo
b: boca	gb: ganglio bucal
bb: bulbo bucal	gc: ganglio cerebral
bc: bursa copulatrix	gd: glándula digestiva
bm: borde del manto	gla: glándula del albumen
bnm: borde nuczal del manto	gp: ganglio pedial
bpe: base del pie	gpl: ganglio pleural
ca: cámara del albumen	gs: glándula salival
cbc: conducto de la bursa copulatrix	ia: intestino anterior
cc: conectivo cerebral	l: línea del collar
ccg: cuello de célula glandular	ip: intestino posterior
ccp: conectivo cerebro-pleural	li: labio inferior
cgs: conducto de la glándula salival	lo: lóbulo del ovotestis
ch: conducto hermafrodita	ls: labio superior
cp: cavidad pericárdica	m: musculatura
cpe: complejo peniano	mb: mandíbula
cpl: cavidad pulmonar	mbb: músculo retractor ventral del bulbo bucal
cl: conducto lobular	mc: musculatura circular
dl: diente lateral	mcp: músculo retractor del complejo peniano
dm: diente marginal	mdb: musculo dorsal del bulbo bucal
dp: divertículo peniano	mpb: músculo peribucal
dr: diente raquídeo	mpba: músculo peribucal accesorio
ea: esófago anterior	mpbv: músculo peribucal ventral
ef: epifragma	mrt: músculo retractor del tentáculo
eo: espermioviducto	mt: musculatura tegumentaria
ep: epifalo	mvb: músculo ventral del bulbo bucal
eps: esófago posterior	n1-4: nervio
es: estómago	nc: nodo cerebral
esc: escotadura	o: ojo

ov: ovotestis	IB: Inferencia Bayesiana
p: pigmento	K2P: Kimura 2 Parámetros
pb: palpo bucal	NaCl: cloruro de sodio
pe: pie	NJ: <i>Neighbor-Joining</i>
pn: pene	ON: “ <i>over nighth</i> ”
pne: pneumostoma	pb: pares de bases
pr: próstata	PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
r: riñón	PM: peso molecular
rc: región cefálica	16S ARNr: gen ribosomal mitocondrial
re: recto	16S
rs: receptáculo seminal	
sr: saco radular	<b>Parte 2.- Capítulo 2.1.-</b>
t: tentáculo portador de ojo	b: pendiente de la recta
tg: tegumento	CIA: valor del Criterio de Información de Akaike
ts: tentáculo sensorial	d(x)= mortalidad
up: uréter primario	e: base del logaritmo natural
us: uréter secundario	e(x)= esperanza de vida
v: ventrículo	g.l: grados de libertad
va: vagina	k: constante de crecimiento
vc: vaso del collar	LL: valor de log-Likelihood
vd: vaso deferente	Lm: longitud modal
vl: vasos laterales	Lmax: longitud máxima asintótica
vp: vena pulmonar	ln: logaritmo natural
vpn: vaina del pene	Lt: longitud modal al tiempo t
vps: vasos pulmonares	L(x)= individuos vivos durante el intervalo de edad (x) hasta (x+1).
vsc: vaso secundario del collar	l(x)= individuos que sobreviven a la edad (x)
<b>Capítulo 1.3.-</b>	n(x)= individuos vivos a la edad especificada
ABGD: <i>Automatic Barcode Gap Discovery</i>	q(x)= tasa de mortalidad específica por edad
Cl <sub>2</sub> Mg: cloruro de magnesio	r: coeficiente de correlación
COI: Citocromo Oxidasa subunidad I	
c.s: cantidad suficiente	

r<sup>2</sup>: coeficiente de determinación  
 t: tiempo  
 to: tiempo hipotético donde la longitud es igual a “cero”  
 T(x)= expectativa de vida  
 x: edad en días

### **Capítulo 2.2.-**

am: amebocito  
 c: conducto  
 cbc: conducto de la bursa copulatrix  
 ch: conducto hermafrodita  
 ech: epitelio del conducto hermafrodita  
 eg: espermatogonia  
 eo: espermioviducto  
 epf: epitelio folicular  
 es1: espermocito primario  
 es2: espermocito secundario  
 esp1: espermátida temprana  
 esp2: espermátida tardía  
 ez: espermatozoide maduro  
 f: folículo  
 gd: glándula digestiva  
 gla: glándula del albumen  
 gvi: gránulos de vitelo  
 LCP: longitud total del complejo peniano  
 LT: longitud total  
 ma: manto  
 mi: mitosis  
 n: núcleo  
 nu: nucléolo  
 oog: ovogonia

oom: ovocito maduro  
 opv: ovocito pre-vitelogénico  
 ovi: ovocito vitelogénico  
 PMG: Proporción de Madurez Gonádica  
 pr: próstata  
 rs: receptáculo seminal  
 S: células de Sertoli  
 tg: tegumento  
 va: vagina

**LISTADO DE ESPECIES MENCIONADAS DURANTE EL DESARROLLO DE  
LA PRESENTE TESIS DOCTORAL**

*Lissachatina fulica* (Bowdich, 1822)  
*Arion ater* (Linnaeus, 1758)  
*Arion circumscriptus* Johnston, 1828  
*Berendtia taylori* (Pfeiffer, 1861)  
*Bostryx conspersus* (Sowerby, 1833)  
*Bostryx cordillerae* (Strobel, 1874)  
*Bostryx cuyanus* (Pfeiffer, 1867)  
*Bostryx famatinus* (Doering, 1879)  
*Bostryx martinezi* (Hylton Scott, 1965)  
*Bostryx modestus* (Broderip, 1832)  
*Bostryx pastorei* (Holmberg, 1912)  
*Bostryx peristomatus* (Doering, 1879)  
*Bostryx planissimus* Pilsbry y Olsson, 1949  
*Bostryx reedi* (Parodiz, 1947)  
*Bostryx roselleus* Miranda y Cuezco, 2014  
*Bostryx rudisculpus* (Parodiz, 1956)  
*Bostryx scaber* (Parodiz, 1948)  
*Bostryx stelzneri* (Dohrn, 1875)  
*Bostryx strobili* (Parodiz, 1956)  
*Bostryx torallyi* (d'Orbigny, 1835)  
*Bostryx tortoranus* (Doering, 1879)  
*Bradybaena similaris* (Férussac, 1822)  
*Buccinanops cochlidium* (Dillwyn, 1817)  
*Bulimulus apodemetes* (d'Orbigny, 1835)  
*Bulimulus bonariensis* (Rafinesque, 1833)  
*Bulimulus bonariensis sporadicus* (d'Orbigny, 1837)  
*Bulimulus corumbaensis* (Pilsbry, 1857)  
*Bulimulus durus* Spix, 1847  
*Bulimulus elatior* Hylton Scott, 1952  
*Bulimulus felipponei* Marshall, 1930

---

*Bulimulus fourmiersi* (d'Orbigny, 1835)  
*Bulimulus gracilis* Hylton Scott, 1948  
*Bulimulus guadalupensis* (Bruguière, 1789)  
*Bulimulus limnoides* (Férussac, 1832)  
*Bulimulus montevidensis* (Pfeiffer, 1846)  
*Bulimulus oreades* (d'Orbigny, 1835)  
*Bulimulus prosopidis* Holmberg, 1912  
*Bulimulus reibischi* (Dall, 1895)  
*Bulimulus rushii* Pilsbry, 1897  
*Bulimulus sporadicus* (d'Orbigny, 1835)  
*Bulimulus sporadicus bonariensis* (Strobel, 1874)  
*Bulimulus sporadicus schadei* Schlesch, 1935  
*Bulimulus sula* Simone y Amaral, 2018  
*Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835)  
*Bulimulus vesicalis* (Pfeiffer, 1853)  
*Bulimulus vesicalis uruguayanus* (Pilsbry, 1897)  
*Bulimulus wiebesi* Breure, 1974  
*Busycon perversum* (Linnaeus, 1758)  
*Cepaea vindobonensis* (Férussac, 1821)  
*Cerion mumia chrysalis* Férrusac, 1837  
*Cornu aspersum* (Müller, 1774)  
*Deroceras laeve* (Müller, 1774)  
*Deroceras reticulatum* (Müller, 1774)  
*Drymaeus hygrophylaeus* (d'Orbigny, 1835)  
*Drymaeus hyltoni* Parodiz, 1957  
*Drymaeus interpunctus* (Martens, 1887)  
*Drymaeus papyraceus* (Mawe, 1823)  
*Drymaeus poecilus* (d'Orbigny, 1835)  
*Habroconus semenlini* (Moricand, 1846)  
*Helicodonta obvoluta* (O.F. Müller, 1774)  
*Helix pomatia* Linnaeus, 1758  
*Helix lutescens* Rossmässler, 1837

*Leptaxis caldeirarum* (Morelet y Drouet, 1857)  
*Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835)  
*Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948)  
*Megalobulimus maximus* (Sowerby, 1825)  
*Megalobulimus paranaguensis* (Pilsbry y Ihering, 1900)  
*Melongena corona* (Gmelin, 1791)  
*Naesiotus calchaquinus* (Doering, 1879)  
*Naesiotus deletangui* (Parodiz, 1946)  
*Naesiotus oxylabris* (Doering, 1879)  
*Neohelix major* (Binney, 1837)  
*Odontocymbiola magellanica* (Gmelin, 1791)  
*Oxychilus (Atlantoxychilus) spectabilis* (Milne-Edwards, 1885)  
*Placostylus* Beck, 1837  
*Polymita brocheri* Gutiérrez en Pfeiffer, 1864  
*Pomacea patula catemacensis* (Baker, 1922)  
*Powelliphanta augusta* Walker, Trewick y Barker, 2008  
*Rabdotus inscendens* (Binney, 1861)  
*Rhinus argentinus* (Ancey, 1901)  
*Rumina decollata* (Linnaeus, 1758)  
*Scutalus tupacii* (d'Orbigny, 1835)  
*Spartocentrum vanduzeei* (Hanna, 1923)  
*Sphaeroconcha araozi* (Weyrauch, 1956)  
*Subulina octona* (Bruguière, 1789)  
*Tegula aureotincta* (Forbes, 1852)  
*Turbinella angulata* (Lightfoot, 1786)  
*Vertigo pusilla* O.F. Müller, 1774  
*Vestia gulo* (Bielz, 1859)  
*Vestia turgida* (Rossmässler, 1836)  
*Zidona dufresnei* (Donovan, 1823)

## RESUMEN

Los gasterópodos del género *Bulimulus* Leach, 1814 poseen una distribución nativa neotropical y son considerados de tamaño grande por medir entre 20,01-40,00mm. La gran mayoría de las especies que los componen originalmente fueron descritas en base a la fuente de caracteres más ampliamente utilizada que es la morfología conquiolar. En algunos casos se aportó información en relación a la morfología de partes duras como la rádula y la mandíbula, no obstante son escasos los datos respecto de su anatomía interna. De esta manera, de las 68 especies válidas de *Bulimulus*, según la base de datos especializada en moluscos, aproximadamente el 20% cuenta con algún dato anatómico y en relación a los abordajes genéticos hasta la actualidad solo hay disponibles algunas secuencias que corresponden a alrededor del 10% de las entidades. De esta manera, en la gran mayoría de las especies los caracteres conquiológicos son la única herramienta disponible para su diagnóstico. Sin embargo, la amplitud de las descripciones, la superposición de caracteres conquiolares y la escasa información anatómica dificultó la correcta identificación de muchas entidades. En la Argentina, el género está representado por ocho especies, de las cuales tres se encuentran en la provincia de Buenos Aires.

Considerando que por un lado, de *B. bonariensis* se dispone de escasa información anatómica, presenta una amplia distribución en el país y en varias ocasiones ha experimentado explosiones demográficas con efectos negativos en cosechas. Y que, por otro lado, de *B. rushii* y *B. vesicalis* hay disponible escasa o nula información anatómica que complementa a la conquiolar sumado a que fueron incluidas dentro de la lista de especies prioritarias para su conservación. Debido a esto, los objetivos de la presente tesis están enfocados en complementar las diagnósticos de las especies realizando para este fin análisis conquiolares y anatómicos con sustento genético a los efectos de contribuir a dilucidar ciertas situaciones taxonómicamente confusas como sinonimias con otras entidades como *B. sporadicus* y problemas en la identificación de ejemplares de *B. rushii*. Por otro lado, se focalizó en *B. bonariensis* para realizar el seguimiento de una población experimental a fin de generar información en relación a la tasa y modelo de crecimiento, supervivencia, mortalidad, estimación de edad y talla de la primera reproducción, entre otros parámetros poblacionales y características del ciclo vital. Sumando al análisis del desarrollo gamético, que nos permitirá contar con información demográfica indispensable a la hora de efectuar controles a nivel poblacional o comparaciones con otros representantes del género. De esta manera, mediante el análisis conquiológico cualitativo se pudieron reconocer ejemplares correspondientes a las tres

especies. Siendo las esculturaciones de la protoconcha el carácter más conspicuo de *B. rushii*, junto con la longitud de la espira, longitud de la abertura y configuración general permitieron la asignación de ejemplares a esta especie. En cuanto a *B. vesicalis* y *B. bonariensis* la longitud de la espira, longitud de la abertura y la poca convexidad de los anfractos fueron los caracteres que permitieron su diferenciación.

En el análisis morfométrico de las tres especies, se realizó primeramente un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el fin de explorar la variación morfológica de la forma de la conchilla, luego se profundizó en las diferencias entre los grupos mediante un Análisis Discriminante (AD). De esta manera, en el ACP las variables que permitieron la discriminación de las especies fueron las asociadas a la penúltima vuelta, longitud y ancho, acompañado del diámetro menor. Sin embargo, mediante el AD el diámetro menor y la longitud de la espira fueron los de mayor aporte. Dada la variabilidad morfológica intraespecífica, se profundizó el análisis de cada especie con herramientas morfométricas. De esta manera, *B. bonariensis* presentó tres morfologías claramente diferentes entre sí; donde la longitud de la penúltima vuelta, longitud de la espira, longitud total, longitud de la abertura, el diámetro menor y diámetro mayor fueron las variables de mayor aporte que permitieron la separación. Respecto de *B. vesicalis* en comparación con *B. bonariensis* mostraron ser distinguibles entre sí desde lo cualitativo, no obstante presentaron un gran área solapada tanto mediante el ACP como los AD. En *B. rushii* la variabilidad a nivel conquiolar no se observó dentro de cada población estudiada, sino que se encontró asociada a la ubicación geográfica. De esta forma, la longitud del espacio parietal y de la abertura mostraron una diferencia sustancial en relación a la altitud.

En cuanto a la anatomía interna, se manifestaron diferencias que permitieron complementar la diagnosis de cada especie. A nivel de los órganos del manto, la ubicación del corazón y de la cavidad pericárdica respecto del riñón fue diferente en las tres especies. Además, *B. rushii* posee un vaso secundario del collar y un área pulmonar mayor. En relación al sistema digestivo las principales diferencias se apreciaron en el bulbo bucal, ya que *B. rushii* presentó un mayor número de músculos y una morfología de las placas de la mandíbula más cuadrangulares. Por otra parte, en el sistema nervioso central entre *B. bonariensis* y *B. vesicalis* sólo hubo una sutil diferencia en la longitud del conectivo cerebro-pleural. Sin embargo, en *B. rushii* se observó una amplia fusión de los ganglios pleurales y pediales. También fue sustancial la diferencia a nivel del aparato reproductor, el cual es mucho más simple en relación a las otras especies tratadas, con una estructura histológica del complejo peniano básica y sin divertículos. Al comparar *B. bonariensis* con *B. vesicalis* las diferencias se encontraron en el grosor del conducto de

la bursa copulatrix y la morfología general e histológica del complejo peniano. Por otro lado, dentro de lo que considerábamos como *B. bonariensis* se identificó la presencia de siete complejos penianos distintos en comparación con muestras provenientes de Buenos Aires. El sustento molecular por medio de distancias genéticas, reconstrucciones filogenéticas y dos métodos de delimitación de especie (ABGD y  $\kappa/\theta$ ) permitió consolidar lo observado desde la anatomía. De esta manera lo que se entendía como una sola especie es en realidad un complejo de especies formado por al menos ocho, las cuales se consideran crípticas desde el análisis de la morfología conquiolar.

En relación a la segunda parte de la tesis, se realizó el estudio en laboratorio tomando a *B. bonariensis* como especie modelo. De esta manera, fue posible realizar el seguimiento de un ciclo de vida completo. Se calculó el promedio de huevos por puesta en 44 y un tiempo de desarrollo embrionario de 14 días. La tasa de natalidad fue de casi un 42% y de ese porcentaje durante los primeros 50 días se observó la mortalidad del 50% de los individuos nacidos. De esta manera, presentaron una curva de supervivencia tipo III, con alta mortalidad temprana y una esperanza de vida de entre dos y tres años. El modelo de crecimiento con mejor ajuste fue el logístico. Mediante el estudio histológico de la gónada en una población natural y durante el transcurso de dos años, se pudieron reconocer peculiaridades biológicas de *B. bonariensis* como la ubicación de los distintos tipos celulares en los folículos. Además, que en el comienzo de su desarrollo son hermafroditas protoginios y luego de alcanzar la madurez gonadal se convierten en hermafroditas simultáneos, también se pudo determinar que es una especie iterópara. Por otra parte, se identificaron tres períodos reproductivos: el de pre-reclutamiento en otoño; el de reclutamiento que inicia en invierno, sin embargo el principal evento es en primavera y el de pos-reclutamiento en verano donde se evidenció la ausencia de descanso gonadal. En el pre-reclutamiento de otoño, se observó reabsorción además de abundantes espermatoцитos primarios, secundarios y ovocitos vitelogénicos en crecimiento. Al mismo tiempo, fue posible correlacionar el grado de desarrollo del espermioviducto con el estadio de desarrollo gonadal. También, mediante una regresión logística se calculó el tamaño al cual alcanzan la madurez gonadal, el cual se estableció en 12 mm de longitud total de la conchilla. Relacionando esta longitud con el estudio en laboratorio, se pudo deducir que dicho tamaño lo consiguen después de los 200 días de vida. Por lo tanto, la primera maduración gamética se alcanza antes del año de vida, donde ocurre un primer descenso en la tasa de crecimiento. Para finalizar, se logró inferir que, como el período reproductivo sucede en la siguiente primavera, al año de vida en la época de reclutamiento, la primera reproducción es cuando alcanzan en promedio los 17 mm y existe una segunda disminución en la tasa de crecimiento.

## ABSTRACT

Gastropods of the genus *Bulimulus* Leach, 1814 have a neotropical native distribution and are considered large in size because they measure between 20.01-40.00mm. The majority of its species were originally described based on their most widely used set of characters, conchological morphology. In some cases, information about the morphology of hard parts, such as the radula and jaw, was provided; however, data regarding their internal anatomy are scarce. Thus, of the 68 valid species of *Bulimulus*, according to the specialized database on molluscs, approximately 20% of the species have some anatomical data while; in terms of genetic approaches, only a few sequences corresponding to about 10% of the entities are currently available. As a result, for the majority of species, conchological characteristics are the only diagnostic tool available. Unfortunately, the length of the descriptions, the overlapping of conchological features, and the scarcity of anatomical information made it difficult to correctly identify numerous entities. The genus is represented in Argentina by eight species, three of which are found in the province of Buenos Aires.

Considering the on the one hand, *B. bonariensis* has little anatomical information, a wide distribution in the country, and has experienced population explosions with negative effects on crops on several occasions. And that, on the other hand, there is little or no anatomical information on *B. rushii* and *B. vesicalis* to complement the conchological data, as well as the fact that they were included on the list of priority species for conservation. Due to this, the objectives of this thesis are to conduct conchological and anatomical analyses with genetic support in order to complement the diagnosis of the species to contribute to elucidate certain confusing taxonomically situations as synonyms with other entities such as *B. sporadicus* and problems in the identification of specimens of *B. rushii*. On the other hand, this thesis focused on *B. bonariensis* to monitor an experimental population in order to gather information on its rate and pattern of growth, survival, mortality, age estimation and size at first reproduction, among other population parameters and characteristics of the life cycle. In addition to the analysis of gametic development, this study will provide us with valuable demographic information for conducting controls at the population level or comparisons with other members of the genus. Thus, using qualitative conchological analysis, we were able to identify specimens corresponding to the three species, with the sculptures of the protoconch being the most distinguishing feature of *B. rushii*, along with the length of the spire, length of the aperture, and general configuration, allowed the assignment of specimens to this species. As for *B. vesicalis* and *B. bonariensis*, the length of the spire,

length of the aperture, and the low convexity of the whorls were the features that allowed such distinction.

In the morphometric analysis of the three species, a Principal Component Analysis (PCA) was first performed in order to explore the morphological variation of the shell shape, then the differences between the groups were deepened by means of a Discriminant Analysis (DA). In this way, the variables that allowed PCA discrimination were those associated with the penultimate whorl, length and width, and the smallest diameter. However, in the DA, the smallest diameter and the length of the spire were the variables of greatest contribution. Given the intraspecific morphological variability, morphometric tools were used to further analyze each species. Therefore, *B. bonariensis* displayed three distinct morphologies, with length penultimate whorl, the length spire, length total shell, length apertural, minor diameter and the largest diameter being the variables that contributed the most. *B. vesicalis* and *B. bonariensis* were qualitatively distinguishable from one another; yet, PCA and DA revealed a wide overlapping area. In *B. rushii*, variability at the conchological level was not observed within each population studied, but was found to be associated with geographic location. As a result, the length of the parietal space and aperture showed a significant difference in relation to altitude.

In terms of internal anatomy, differences that allowed complementing the diagnosis of each species were shown. At the level of the mantle organs, the location of the heart and pericardial cavity in relation to the kidney differed between the three species. In addition, *B. rushii* has a secondary collar vessel and a larger lung area. Regarding the digestive system, the main differences were observed in the buccal bulb, since *B. rushii* presented a greater number of muscles and a more quadrangular morphology of the jaw plates. On the other hand, there was only a subtle difference in the length of the cerebro-pleural connective tissue in the central nervous system between *B. bonariensis* and *B. vesicalis*, while in *B. rushii* there was extensive fusion of the pleural and pedial ganglia. There was also a significant difference at the reproductive level, which was considerably simpler compared to the other treated species, with a basic histological structure of the penial complex and no diverticula. When *B. bonariensis* and *B. vesicalis* were compared, differences in the thickness of the bursa copulatrix duct and the general and histological morphology of the penial complex were found. Moreover, when compared to samples from Buenos Aires, seven different penial complexes were present within the nominal species *B. bonariensis*. The molecular information through genetic distances, phylogenetic reconstructions and two species delimitation methods (ABGD and  $\kappa/\theta$ ) allowed to consolidate what was observed from the anatomical point of view. So that, what was understood as a single species, is actually a complex of species formed

by at least eight, which are considered cryptic based on the analysis of the conchological morphology.

Concerning the second part of the thesis, the laboratory study was carried out using *B. bonariensis* as the model species. In this way, it was possible to monitor a complete life cycle. The average number of eggs per clutch was calculated at 44, with a 14-day embryonic development time. The birth rate was nearly 42% and of this percentage, during the first 50 days mortality of 50% of the individuals born was observed. Thus, they presented a type III survival curve, with a high early mortality rate and a life expectancy of two to three years. The logistic growth model was the best fit. Through the histological study of the gonad, in a natural population and over the course of two years, biological peculiarities such as the location of the different cell types in the follicles could be identified. Furthermore, at the beginning of their development they are protogynous hermaphrodites and after reaching gonadal maturity, they become simultaneous hermaphrodites. It has also been determined that it is an iteroparous species. On the other hand, three reproductive periods were identified: pre-recruitment in the fall; recruitment, which begins in winter, but the main event occurs in spring; post-recruitment in summer, where the absence of gonadal rest was observed. In pre-recruitment resorption was observed in addition to abundant primary and secondary spermatocytes and growing vitellogenic oocytes. At the same time, it was possible to correlate the degree of spermoviduct development with the stage of gonadal development. By means of logistic regression, the size at which they reach gonadal maturity was calculated, which was established at 12 mm of total shell length. By relating this length with the laboratory study, it was possible to deduce that this size is reached after 200 days of life. Therefore, the first gametic maturation is achieved before one year of life, where a first decrease in the growth rate occurs. Finally, it was inferred that, since the reproductive period occurs the following spring, at one year of life during the recruitment period, the first reproduction takes place when they reach an average of 17 mm and there is a second decrease in the growth rate.

## INTRODUCCION GENERAL

Los moluscos pertenecen al segundo phylum animal más llamativo, mejor conocido y diverso, se estima que comprende alrededor de 117.000 especies (Zhang, 2011). Cerca del 80% corresponde a la Clase Gastropoda con 62.000 especies vivientes (Lindberg et al., 2004). Aunque es un grupo que se originó en el medio marino, colonizó ambientes dulceacuícolas y terrestres. De esta manera, la clase incluye desde las formas marinas de linajes más antiguos hasta los caracoles terrestres de respiración aérea más derivados. Se caracterizan por ser organismos bilaterales que han adquirido una asimetría secundaria y que deriva del fenómeno de torsión en los estadios embrionarios, lo cual representa una de las sinapomorfias del grupo (Camacho y del Río, 2008).

Particularmente, el Orden Stylommatophora reúne alrededor de 20.500 especies (Rosenberg, 2014) cuyos representantes se caracterizan por: ser hermafroditas; con la gónada ubicada en el lóbulo superior de la glándula digestiva; la próstata asociada al gonoducto; con bursa copulatrix de ubicación adyacente al pericardio. Son de condición en su mayoría semi-diaulicos convergiendo distalmente en un orificio genital común del lado derecho; el complejo peniano está formado por pene, epifalo y flagelo. Tienen un pneumostoma contráctil, capacidad de estivar y formar un epifragma. Desarrollaron un sistema de vasos a nivel del manto formando de esta manera un pulmón a nivel del cual realizan el intercambio gaseoso. Por otra parte, la rádula es un carácter importante en sistemática a nivel de género y en muchos casos de especie. La superficie del tegumento es rugosa, poseen dos pares de tentáculos con un ojo en el ápice de cada uno de los tentáculos cefálicos. A nivel de la protoconcha y teleoconcha poseen microesculturas elaboradas. El número de cromosomas haploides varían entre 20-34. Y producen una cascara del huevo calcárea (Barker, 2001).

Dentro de las especies terrestres hay aproximadamente 24.000 descripciones válidas. Sin embargo, se calcula que entre 11.000 a 40.000 especies aún no se conocen (Lydeard et al., 2004); incluso se estima que la diversidad no descrita del phylum excede a la conocida (Rosenberg, 2014).

En el Infraorden Orthalicoidei, la superfamilia Orthalicoidea está conformada por alrededor de 1.500 (Breure et al., 2010) a 1700 especies (Richardson, 1995) que se encuentran distribuidas en América del Sur, América Central, sur de los Estados Unidos, las islas del Caribe con radiaciones más pequeñas en Melanesia, sur de Australia, África y Nueva Zelanda, siendo una de las más diversas en especies dentro de los gasterópodos terrestres neotropicales (Breure et al., 2010).

En relación a la macrosistemática, dentro de la superfamilia, hubo variaciones según el autor que trató al grupo y los caracteres considerados. Iniciando por Tryon (1867), en base a características morfológicas de la conchilla y considerando la longitud total de la misma, reunió en la familia Orthalicidae Martens, 1860 a tres subfamilias (Achatininae Swainson, 1840; Orthalicinae Albers, 1850 y Bulimulinae Tryon, 1867). En este trabajo, caracterizó a los Bulimulinae como aquellos de conchilla oblonga-turriteliforme; moderadamente ancha; de abertura oval pequeña; con labio externo generalmente expandido o reflejado; labio interno reflejado; con ombligo perforado, angosto y a veces cubierto; de coloración blanquecino o amarronado y de talla pequeña en relación a las otras dos subfamilias.

Desde ese entonces de a poco Bulimulidae comenzó a tomar ímpetu y a ser tratada en el nivel de familia de manera separada a Orthalicidae (Fischer y Crosse, 1878; Fischer, 1887). Posteriormente hubo cambios a este nivel ya que los Bulimulidae y Orthalicidae fueron considerados como familias diferentes, luego se unificaron y actualmente recuperaron su estatus de familia (Pilsbry, 1902; Breure et al., 2010; Bouchet et al., 2017). De esta manera, durante el siglo XX se dieron una serie de modificaciones, en asociación a los caracteres estudiados. Comenzando por Pilsbry (1902), él consideró a la familia Bulimulidae conformada por cuatro subfamilias (Bulimulinae, Odontostominae, Orthalicinae y Amphibuliminae). La caracterizó por tener una conchilla oblonga u ovalada, helicoidal. Desde el punto de vista anatómico mencionó el riñón el cual es triangular tan corto como el pericardio; uréter reflejado y cerrado o raramente abierto; pulmón extenso con vena pulmonar no ramificada bien desarrollada, vasos principalmente en la región cercana al pneumostoma; mandíbula formada por placas verticales imbricadas; rádula común o especializada e intestino habitual.

Luego, Zilch (1960 a; b) considerando información conquiolar, incluyó dentro de la superfamilia Bulimulacea a las familias Bulimulidae Tryon, 1867; Odontostomidae Pilsbry y Vanatta, 1898; Amphibulimidae Fischer, 1873; Orthalicidae Martens, 1860; Cerionidae Pilsbry, 1901 y Urocoptidae Pilsbry, 1898; mantuvo de esta manera a Bulimulidae separada de Orthalicidae. Sin embargo, dos décadas más tarde Breure (1979), con caracteres anatómicos y conquiolares, consideró a Bulimulidae como una única familia que contenía cinco subfamilias (Bulimulinae, Placostylinae, Odontostominae, Amphibuliminae y Orthalicinae).

Posteriormente, Schileyko (1999), al estudiar la morfología conquiolar y la anatomía del sistema reproductor, trató como Bulimuloidea a las familias Bulimulidae (incluyendo a Bulimulinae, Placostylinae, Peltellinae); Orthalicidae; Megaspiridae Pilsbry, 1904 y Urocoptidae. Luego, Bouchet et al. (2005), basándose en el trabajo de

Neubert y Janssen (2004) subieron a nivel de familia a Placostylidae Pilsbry, 1946; incorporaron a Coelociontidae Iredale, 1937 y reincorporaron a Cerionidae; además, mantuvieron en esa categoría a Megaspiridae, Urocoptidae y Orthalicidae (donde se reúne a Orthalicinae, Amphibuliminae y Bulimulinae, que a su vez comprende las Tribus Bulimulini, Odontostomini y Simpulopsini), la superfamilia pasó a ser por lo tanto Orthalicoidea.

Más recientemente, Breure et al. (2010), considerando datos moleculares, nuevamente reincorporaron al nivel de familia a Bulimulidae, Odontostomidae, Amphibulimidae y sostuvieron en esa categoría a Orthalicidae y Placostylidae. Aunque sin información molecular que lo sustente, mantuvieron a Megaspiridae y consideraron que Coelociontidae no está relacionada con estos grupos. Luego, Breure y Romero (2012), en base a tres marcadores moleculares pudieron reafirmar sus resultados, además de confirmar el status de Megaspiridae como familia y elevar Simpulopsini a Simpulopsidae Schileyko, 1999. Conjuntamente, dentro de Bulimulidae reconocieron tres clados, a cada uno de los cuales le asignaron el nivel de subfamilia (Bulimulinae; Bostrycinae Breure, 2012 y Peltellinae Gray, 1855).

En la actualidad, la sistemática utilizada es la propuesta por Bouchet et al. (2017) donde dentro de la superfamilia Orthalicoidea se encuentran Orthalicidae, Amphibulimidae, Bothriembryontidae (con las subfamilias Bothriembryontinae Iredale, 1937, Placostylinae y Prestonellinae van Bruggen, Herbert y Breure, 2016), Bulimulidae (con las subfamilias Bulimulinae, Bostrycinae y Peltellinae), Megaspiridae, Odontostomidae y Simpulopsidae.

La familia Bulimulidae está conformada por 23 géneros vivientes y alrededor de 543 especies válidas (MolluscaBase eds., 2021). Se los encuentra asociados a vegetación herbácea, carpeta de hojas secas, paredes rocosas e incluso muchas especies son de hábitos arborícolas, siendo el rango de distribución altitudinal desde el nivel del mar hasta los 5200 m (Breure, 1979). Poseen una gran capacidad de adaptación a una amplia variedad de condiciones climáticas y hábitat ya que hay representantes en zonas cercanas a desiertos y especies que se encuentran sólo en climas más templados de bosques húmedos (Coppo, 1995). Al mismo tiempo, pueden colonizar áreas nuevas y una amplia variedad de nichos ecológicos con distinto tipo de vegetación, condiciones de temperatura y humedad (Cabrera et al., 2021). En las Islas Galápagos, los bulimulidos colonizaron las principales islas del archipiélago demostrando de esta manera el potencial colonizador del grupo. Además, todas las especies que se encuentran allí son endémicas, denotando que también poseen capacidad para especiar en el lugar que colonizan (Parent, 2012).

Los representantes de esta familia son nativos de los trópicos y subtrópicos de América del Sur, Australia, Nueva Zelanda, Tasmania y en África con las enigmáticas especies de *Prestonella* Connolly, 1929. Para las cuales, Herbert y Mitchell (2009) demostraron mediante análisis anatómico y molecular la pertenencia de las mismas a la familia Bulimulidae y manifestaron de esta manera un origen de la familia pre-Gondwánico e incluso posiblemente anterior.

Particularmente en la República Argentina, esta familia es la más rica y filogenéticamente diversa (Cuezzo et al., 2013). En el catálogo de los Orthalicoidea argentinos, Cuezzo et al. (2013) reconocieron los géneros *Bostryx* Troschel, 1847; *Bulimulus* Leach, 1814; *Drymaeus* Albers, 1850; *Naesiotus* Albers, 1850 y *Scutalus* Albers, 1850.

Con respecto a las especies de *Bulimulus* poseen una distribución nativa neotropical (Breure, 1979) y son consideradas de tamaño grande por tener una longitud total entre 20,01- 40,00mm (Emberton, 1995). Originalmente fueron descritas en base a la fuente de caracteres más ampliamente utilizada que es la morfología conquiolar. Las entidades consideradas actualmente dentro de este género inicialmente se incluyeron en otros géneros pertenecientes incluso a otras familias, por ejemplo dentro de la familia Helicidae Rafinesque, 1815 y bajo el nombre genérico de *Bulimus* Scopoli, 1777 (Parravicini, 1894; Formica Corsi, 1900, entre otros) se describieron numerosos subgéneros y especies de Bulimulidae y Strophocheilidae. A lo largo de los últimos 150 años, la ubicación de especies a nivel de género así como los sistemas de clasificación infragenéricos y el reordenamiento de los géneros en las familias fue modificándose. De esta manera, comenzando por Albers (1850) podemos mencionar que dentro de *Bulimus* describió sobre la base de la conchilla subgéneros indicando qué especies incluyen y comentarios de distribución. Luego, Pfeiffer (1854) mantuvo el nombre genérico de *Bulimus*. Sin embargo, Adams y Adams (1858) reconocieron la existencia tanto de *Bulimus* como de *Bulimulus*, aunque dentro de este último no hicieron mención de especies argentinas. Por otra parte, Fischer y Crosse (1878) estudiaron exclusivamente especies de México y América Central, separando a los representantes de *Bulimulus* en categorías de secciones y subsecciones.

A fines del siglo XIX, Doering (1875; 1879) con respecto a los representantes argentinos de *Bulimulus* reunió una serie de especies y reconoció que las subdivisiones fueron defectuosas por carecer de material suficiente y de datos anatómicos. Mantuvo dentro de *Bulimulus* la existencia de grupos. También Fischer (1887) dividió a este género pero en subgéneros y a su vez en secciones. Recién Pilsbry, sobre la base de conchillas, esbozó un sistema de clasificación para *Bulimulus* que finalizó en 1902; lo

separó en tres divisiones y estos a su vez en secciones. Atribuyó que las clasificaciones anteriores se basaron en limitados materiales y escaso conocimiento de las áreas de dispersión. De esta manera, la ambigüedad de los caracteres conquiolares fue suplantada por el autor, en 1902, al considerar a la protoconcha como un carácter taxonómico importante para diferenciar entidades naturales.

En 1946, Parodiz remarcó que los criterios de clasificación han sido tan diversos como los autores que trataron el tema, resultando en una gran confusión en el conocimiento de la sistemática. Adoptó la clasificación de Pilsbry de 1902 y la ajustó al considerar no sólo la protoconcha, sino también otras características a nivel conquiolar. Además de información anatómica como la configuración de la mandíbula, rádula y en algunos casos de la genitalia, también consideró la distribución geográfica. Si bien mantuvo la existencia de subgéneros, destacó que se deberían destinar colecciones para estudios anatómicos internos. Hylton Scott (1967) también denotó que, por carecer de partes blandas en el material de colección, se debió realizar una clasificación basada en conchilla y que, extremando ese examen, se hizo necesario analizar la ultraestructura de la protoconcha.

Si bien Schander y Sundberg (2001) apoyan el estudio conquiolar para la reconstrucción filogenética, o en cualquier discusión sobre la sistemática de gasterópodo *a priori*, uno de los problemas recurrentes en la discriminación de especies es que la mayoría de sus descripciones se basan sólo en las características de las conchillas. Aunque existen casos en los que la diferenciación por caracteres conquiológicos es eficiente, se considera que estos caracteres son afectados por evolución paralela o convergente en diferentes taxa (Suvorov, 2002); en estos casos, la información dada por partes blandas es de máxima necesidad para la diferenciación específica.

Actualmente, además de analizar la morfología de las partes duras (conchilla, rádula y mandíbula) y la conformación anatómica (principalmente de sistema reproductor, anillo neural periesofágico y sistema digestivo) se están llevando a cabo análisis moleculares complementarios e integrativos para delimitar y diferenciar unidades taxonómicas (López Soriano, 2004) y establecer relaciones filogenéticas (Breure y Romero, 2012). Además, se puso a prueba el potencial de la ultraestructura espermática, la anatomía y la combinación de ambas fuentes de caracteres en el establecimiento de sistemas clasificatorios (Cuezzo, 2011). No obstante, la información conquiolar y anatómica, además de ser puntos de partida importantes para la determinación específica (Miranda y Cuezzo, 2014), son una combinación de caracteres necesarios para resolver hipótesis filogenéticas (Miranda, 2016).

Actualmente el número de especies válidas de *Bulimulus* es de 68 (MolluscaBase eds., 2021), de las cuales sólo alrededor del 20%, considerando las especies presentes en Argentina (Cuezzo et al., 2013), cuenta con alguna información en relación a la anatomía de sus partes blandas (Schlesch, 1935; Parodiz, 1946; Lanzieri y Rezende, 1965; Van Mol, 1971; Breure, 1974; Breure, 1978; Coppo, 1985; Miquel, 1991; Miranda, 2016; Simone y Amaral, 2018). Sumado a que, desde el punto de vista molecular, sólo se encuentran disponibles en GenBank® unas pocas secuencias completas, que correspondería a un 10% aproximadamente del total de *Bulimulus*, se pone de manifiesto que aún queda mucha información por generar para tener una visión completa e integradora de las entidades que constituyen el género. Particularmente en Argentina, las especies descritas se encuentran distribuidas ocupando desde los 22° a 38° de extensión latitudinal y desde los 54° a 67° de longitud (Miquel, 1991). Enmarcado en ese rango hay ocho especies: *B. apodemetes*, *B. bonariensis*, *B. elatior*, *B. fourmiersi*, *B. gracilis*, *B. prosopidis*, *B. rushii* y *B. vesicalis* (Cuezzo et al., 2013) para las cuales existe escasa información anatómica. Sólo *B. apodemetes* (Breure, 1978; Miquel, 1991; Miranda, 2016; Parodiz, 1946) y *B. prosopidis* (Breure, 1978) cuentan con descripciones y esquemas del sistema reproductor. Recién en 2013 Díaz y Martín realizaron una primera contribución al conocimiento morfo-histológico de *B. bonariensis*, especie que hasta el momento sólo contaba con información radular (Miquel, 1991), al igual que *B. rushii* (Miquel, 1991). Para *B. gracilis* no hay una descripción específica de la especie, sino que sus caracteres están aplicados en un análisis cladístico (Miranda, 2016) y hasta el momento es la única especie argentina del género que cuenta con una secuencia del marcador molecular COI (Citocromo Oxidasa I) (Breure, 2016 b).

Por otro lado, con respecto a los estudios poblacionales, en América del Sur hay pocos análisis sobre ciclos de vida, crecimiento y reproducción de especies de *Bulimulus*, aunque en Brasil hay varios trabajos en torno a *Bulimulus tenuissimus* (Meireles et al., 2008, 2010; Silva et al., 2008, 2009, 2013). En la Argentina no existen estudios similares, con excepción de una primera experiencia y aproximación al modelo de crecimiento de *B. bonariensis* (Díaz y Martín, 2012). Por este motivo y particularmente en Argentina, las investigaciones actuales sobre Bulimulidae pueden calificarse de esporádicas y en su mayoría referente a la taxonomía conquiolar del grupo.

Una cuestión importante que merece ser mencionada es que se informó la presencia de *B. bonariensis* en cultivos de soja de Santa Fe y se declaró a la especie como dominante en los sembradíos de la región (Frana y Massoni, 2007; 2011). Si bien, no ocasionaban una defoliación que comprometiera el crecimiento y rendimiento del cultivo, tuvieron un impacto negativo en la recolección mecánica de los granos, debido a

la obstrucción de rejillas y zarandas en la cosechadora. Esta problemática se repitió en cultivos de garbanzo de la Provincia de Córdoba, no sólo durante la cosecha sino que incluso generó efectos negativos en el aspecto del grano; por esta razón, Peralta (2016) catalogó a esta especie como plaga con daño indirecto. También fue hallada durante las campañas de 2015-2016 en cultivos de maíz en Cañada de Luque, Córdoba, en este caso sobre las hojas más basales del cultivo en estado fenológico V4 (Rumi, com. pers.). Incluso un tiempo antes, productores yerbateros de Apóstoles, Misiones, denunciaron que una población invadió plantaciones dejando la hoja inviable para su uso (Noticias La Región, 2013). Por lo tanto, es de máxima necesidad comprender mejor la biología estudiando especialmente el modo de crecimiento y períodos reproductivos, para poder contribuir a aplacar los impactos negativos con un manejo adecuado de estos gasterópodos.

Por su parte, una problemática a tener en cuenta es que el 99% de las extinciones en moluscos corresponden a especies no marinas (Lydeard et al., 2004), en gran medida por el deterioro del hábitat. Considerando por un lado, que en la lista de especies amenazadas de la UICN de 2002, 1.222 especies terrestres fueron incluidas y teniendo en cuenta la gran cantidad que aún no se han descrito (Lydeard et al., 2004). Sumado a que Clavijo y Scarabino (2013) incluyeron a *B. rushii* y a *B. vesicalis* dentro de la lista de moluscos continentales prioritarios para la conservación en Uruguay, queda entonces por cuestionar, además de las especies mencionadas, cuál será el número de entidades que debieran ser protegidas y que aún carecen de revisión.

Por lo antes expuesto, el presente trabajo de tesis doctoral tiene como objetivo abordar un análisis integrativo de las tres entidades, citadas principalmente para la provincia de Buenos Aires. De esta manera, se busca generar un aporte desde lo conquiolar y anatómico complementada con información genética que permita primeramente enriquecer la diagnosis y descripción de *B. bonariensis*, *B. rushii* y *B. vesicalis*, al mismo tiempo que colaborar en la diferenciación de especies y que de esta forma se contribuya a ampliar el conocimiento de *Bulimulus*. Para el desarrollo de la segunda parte de la tesis se eligió a *B. bonariensis* como especie modelo de estudio debido a que es la más ampliamente distribuida en la región este de nuestro país (Miquel, 1991; Cuezco et al., 2013), por lo cual puede constituir una especie referente dentro de los *Bulimulus* de Argentina. De esta manera, la información obtenida de estudios poblacionales tales como tasa y modelo de crecimiento, mortalidad, tiempo de vida, sumado al análisis del desarrollo gamético y edad de la primera madurez sexual, nos permitirá contar con información fundamental a la hora de efectuar posibles controles a nivel poblacional o futuras comparaciones con otros representantes del género.

## OBJETIVOS

### Objetivos generales:

1. Contribuir a la descripción y diferenciación de especies de *Bulimulus*.
2. Delinear patrones poblacionales básicos y períodos reproductivos en *Bulimulus bonariensis*.

### Objetivos Específicos:

1. Realizar estudios conquiolares, radulares, mandibulares, anatómicos e histológicos (genitalia) y moleculares en *Bulimulus bonariensis* (Rafinesque, 1833), *Bulimulus rushii* Pilsbry, 1897 y *Bulimulus vesicalis* (Pfeiffer, 1853) que contribuyan a la diferenciación específica.
2. En *Bulimulus bonariensis*:
  - a. Realizar el seguimiento de una población experimental que permita estudiar aspectos poblacionales tales como crecimiento, supervivencia, mortalidad, estimación de edad y talla de la primera reproducción.
  - b. Interpretar el desarrollo gamético en las diferentes tallas e identificar las etapas de maduración gonádica a lo largo de un año.

## HIPOTESIS

- Las diferencias interespecíficas observadas en caracteres morfológicos externos y anatómicos revalidan las entidades catalogadas por Cuezco et al. (2013) sobre la base de conchillas.
- Las diferencias moleculares observadas en: COI y 16S ARNr, acompañan las variaciones morfo-anatómicas interespecíficas.
- La primera maduración gamética se alcanza antes del año de vida.

**PARTE 1.-**  
**ESTUDIOS MORFO-ANATÓMICOS**  
**CAPÍTULO 1.1.-**  
**CARACTERES CONQUIOLARES**



### 1.1.A. INTRODUCCION

Leach (1814) caracterizó al género *Bulimulus* por tener una conchilla de aspecto cónico cuyo tamaño aumenta gradualmente en diámetro desde el ápice hasta la última vuelta, de espira alta, con la última vuelta muy amplia, de abertura entera y extensa, labio externo delgado y labio interno reflejado dejando un espacio. Posteriormente, casi un siglo más tarde, en sucesivos y exhaustivos manuales descriptivos, Pilsbry (1901-1902) comenzó a considerar al ápex como un carácter importante para diferenciar entidades, debido a que hasta el momento la descripción conquiolar era demasiado amplia. De este modo, definió al género por poseer arrugas subverticales onduladas, irregulares en zigzag o con presencia de un patrón en red. Esta característica Parodiz (1946) la retomó y afianzó para delimitar a los géneros de Bulimulinae; en este sentido definió a *Bulimulus* por poseer una ultraestructura de la protoconcha conformada por delgadas costillas dispuestas en zigzag con formas desde sinuosas hasta angulosas.

Unas décadas más tarde, Breure (1974; 1979) amplió la descripción desde lo conquiolar al describir el peristoma que puede ser simple, estar ligeramente expandido o no y añadió la coloración del periostraco el cual es uniforme desde marrón a tonos amarillos, en ocasiones con presencia de bandas más oscuras. También denotó la existencia de líneas relacionadas al crecimiento y estrías en espiral. En cuanto a la protoconcha mencionó la presencia de arrugas, granulación o un reticulado.

En sucesivas obras, Breure es el autor contemporáneo con mayor cantidad de revisiones exhaustivas y aportes importantes para el género *Bulimulus* (Breure, 1974; 1978; 1979) y la familia Bulimulidae (Breure, 1975; 1976; 1977; 2012; 2019; Breure y Coppo, 1978; Breure y Eskens, 1981; Breure y Schouten, 1985; entre otros). No sólo reunió descripciones conquiolares, sino que también re-describió muchas especies reconociendo lo difícil que es, considerando la gran variabilidad en la forma de la conchilla (Breure, 1974). Al mismo tiempo, incorporó datos anatómicos e histológicos, ecológicos, de sistemática, distribución y filogenia. Su producción científica en relación al grupo es una guía de base importante para comprender la gran diversidad genérica y los caracteres a observar en un nivel específico; no obstante, dada la escasa o nula disponibilidad de ejemplares con partes blandas, condicionó que el incursionar en el conocimiento de algunas especies incorporando ambas fuentes de caracteres haya quedado reducido.

En cuanto a las especies de *Bulimulus* presentes en la Argentina y específicamente en la provincia de Buenos Aires, se reconocieron hasta el momento tres

especies válidas: *B. bonariensis*, *B. rushii* y *B. vesicalis* (Cuezzo et al., 2013). De las cuales sólo se han tomado algunas medidas lineales (Miquel, 1991) sin realizar un estudio morfométrico que busque analizar la variabilidad intra o interespecífica. Por otro lado, las descripciones de las especies mencionadas están basadas en material conquiológico depositado en diferentes museos y en este sentido cada una tiene, en mayor o menor medida, literatura enfocada en la discusión sobre esta fuente de caracteres.

En relación a *B. bonariensis*, desde hace más de 150 años se fueron tomando distintas posturas en cuanto no sólo a su identidad sino también a la de *B. sporadicus*, información que reunieron y resumieron Díaz et al. (2019). Para comenzar debemos indicar que *B. bonariensis* fue descrita por Rafinesque (1833) a partir de material conquiolar procedente de la provincia de Buenos Aires. Dos años más tarde, en 1835, d'Orbigny colectó material y describió a *B. sporadicus* originalmente para las provincias de Corrientes (Argentina) y Chiquitos (Bolivia). Luego, en 1838 en su viaje por América del Sur amplió el rango de distribución desde las llanuras de la Patagonia hasta Bolivia, siendo de esta manera declarada la especie más ampliamente extendida. Posteriormente, Strobel (1874) clasificó a *bonariensis* como una variedad de *B. sporadicus* diferenciándolas por su ubicación geográfica encontrándose *B. sporadicus* en Patagonia, Santa Fé, Entre Ríos y Corrientes en lugares arbolados de manera muy dispersa en suelos diluviales arcillosos, arenosos y de roca mixta; mientras que la variedad *bonariensis* la describió como típica de los jardines y campos de Buenos Aires dispersa pero no en abundancia en suelos aluviales de roca mixta y húmedos, de coloración uniforme y afín a *B. tenuissimus* y *B. oreades*. Tiempo después, Doering (1874) citó a la especie de d'Orbigny para Buenos Aires y Corrientes, pero Pfeiffer (1877) la mencionó para Bolivia y República Argentina restringiéndola a ejemplares de conchilla color marrón o blanquecina con rayas longitudinales marrones. Aunque Hidalgo (1869) defendió la posibilidad de que *B. sporadicus* y *B. montevidensis* correspondan a la misma especie, Pilsbry (1897-1898) mantuvo a *B. montevidensis* como una variedad para Montevideo (Uruguay), amplió la descripción de *B. sporadicus* y modificó la distribución en Argentina a las provincias de Corrientes, Entre Ríos, Buenos Aires y sur de Río Negro y en Uruguay para Montevideo e interpretó que el típico *B. sporadicus* se encontraba en Chiquitos (Bolivia) y la variedad *B. sporadicus bonariensis* de Strobel estaba presente en Buenos Aires. Luego, Parravicini (1894) declaró que *B. sporadicus* es una especie variable en forma pero constante en la coloración y en el número de anfractos. Pocos años más tarde, Formica Corsi (1900) añadió al rango de distribución de Pilsbry (1897-1898) a Santa Fe y planteó la duda de que sean *B. sporadicus* y *B. montevidensis* la misma especie, a la vez que propone que el *B. montevidensis* de Hidalgo (1869) pertenece a una especie diferente. Medio siglo después, Parodiz (1946) citó a *B. sporadicus* en

Bolivia, Paraguay, Uruguay y Argentina (Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero, y Tucumán). En el mismo período, Hylton Scott (1948) destacó que *B. sporadicus* es una de las especies más comunes en el territorio argentino y una de las más difíciles de reconocer por examen conquiolar, señaló que para aclarar su verdadera identidad se requiere del examen anatómico. Ya que la distribución dada por d'Orbigny es amplia abarcando desde Río Negro en la Patagonia hasta Chiquitos en Bolivia, incluyendo Buenos Aires, Santa Fe, Entre Ríos, Corrientes y Banda Oriental del Uruguay, la autora consideró que muestras procedentes de diversos lugares en este rango de extensión, manifiestan diferencias que corresponden a más que variaciones y justamente siguiendo este criterio, describió para el Cerro Colorado, Salta, a *B. sporadicus gracilis*, hoy considerada *B. gracilis*.

Por otra parte, Parodiz (1962) manifestó que la diagnosis de *B. bonariensis* es acotada y ambigua, pero que antecede a la descripción de d'Orbigny por dos años por lo cual reconoció la existencia de dos subespecies; *B. bonariensis bonariensis* para Buenos Aires y *B. bonariensis sporadicus* para el norte, este y centro de la Argentina y Bolivia. Unos años más tarde, Fernández (1973) estableció una posible sinonimia entre *B. b. bonariensis* y *B. b. sporadicus*. Sin embargo, Miquel (1991) por análisis conquiológicos continuó reconociendo a *B. bonariensis* como una especie politípica con variaciones subespecíficas, con lo cual sostuvo la existencia de dos subespecies. Por un lado, *B. b. bonariensis* en Buenos Aires, Entre Ríos, Chaco, Corrientes, Santa Fe y ciertas zonas de Formosa, Jujuy y Misiones y por otro *B. b. sporadicus* para parte de Córdoba, Chaco, Jujuy, Salta, Santa Fe y Formosa y ocupando casi todo el territorio de Santiago del Estero y Tucumán. En un intento de analizar las dos subespecies Díaz et al. (2012), llevaron adelante un estudio de morfometría geométrica entre ejemplares colectados a campo y depositados en el Museo de La Plata, con el fin de evaluar la variación conquiológica de ambas. Cuyos resultados mostraron un grupo de ejemplares, identificados como *B. b. sporadicus*, de conchilla ovalada, con un diámetro mayor más ancho y otro grupo, identificados como *B. b. bonariensis*, más estilizado, aguzado, con un diámetro mayor más angosto y de mayor longitud de la espira. Sin embargo, también arrojó un área con solapamiento de individuos cuya asignación a una subespecie era incierta.

Posteriormente, Cuezco et al. (2013) sobre la base de material conquiológico, señalaron que los nombres de *sporadicus* y *bonariensis* se utilizaron de manera alternativa en la identificación de ejemplares recogidos principalmente en Buenos Aires y el noreste de Argentina. Las autoras sostuvieron además, que son muy difíciles de distinguir debido a la similitud no sólo a nivel conquiolar, sino también en relación a la morfología externa, la variabilidad en la coloración y por tener áreas de distribución

superpuestas. Reconocieron que hay una necesidad urgente de identificar y diferenciar especies, dicha motivación está dada no sólo con el fin de ampliar nuestro conocimiento de la biodiversidad continental, sino también para poder desarrollar e implementar estrategias de conservación o manejo específicos.

Cabe destacar que Breure y Ablett (2014) seleccionaron un ejemplar depositado en el Museo de Historia Natural de Londres, como lectotipo de *B. bonariensis sporadicus*, mencionaron la existencia de sintipos e indicaron que el sintipo de *Bulimus montevidensis* corresponde a *B. b. bonariensis*, sinonimia que ya había manifestado Miquel (1991). No obstante, dentro de los lotes colectados por d'Orbigny queda aún una gran variación morfológica para dar ubicación. Por este motivo, en los últimos años, Breure (2016 a; b) comenzó a considerarlos como un complejo de especies que comparten una gran área de distribución. Y, por otra parte, de manera informal, un especialista sudamericano manifestó la posible existencia de híbridos entre especies de *Bulimulus* de Brasil (Agudo, 2019).

En resumen, desde las descripciones originales de *B. bonariensis* y *B. sporadicus* los autores que los estudiaron tuvieron distintas posturas en cuanto a si son especies distintas, subespecies o sinónimos, al igual que sus áreas de distribución, lo cual varió en consideración del criterio de cada autor que trató el tema. De esta manera, podemos afirmar que se encuentran estrechamente relacionadas y es necesario continuar analizándolas para definir su status.

Con respecto a *B. rushii* Pilsbry (1897; 1897-1898) describió y citó a esta especie para Maldonado (Uruguay). Sumado a que la relacionó de manera estrecha con *B. sporadicus* y sobre todo con *B. vesicalis*, respecto de la cual la diferenció por tener una espira más corta, forma general globosa, abertura amplia y ombligo profundo. A mediados del siglo XX, Parodiz (1944) re-describió a la especie conquiolarmente y puso de manifiesto la similitud de *B. rushii* con *B. durus* Spix, 1847, aunque la diferenció por algunos aspectos de la conchilla como tamaño y coloración, sumado a que la distribución de la última especie mencionada habita en Brasil. Aún Cuzzo et al. (2013), denotaron la similitud de la conchilla, protoconcha y destacaron la importancia de realizar futuros estudios de partes blandas. Parodiz (1944) también, destacó que la protoconcha de *B. rushii* posee líneas con cierta distancia entre sí, no rectas como en *Protoglyptus* Pilsbry, 1897, sino en zigzag aunque con ángulos menos agudos en relación a otros *Bulimulus*. Comparable a lo que sucede en *Rhinus* Martens, 1860; aunque este último mencionado posee cerdas y una distribución geográfica diferente, en Venezuela y norte de Brasil de esta manera, sinonimizó a *B. rushii* con *Rhinus argentinus*. Destacó que la amplitud de dispersión de *B. rushii* no había sido dada, hasta ese momento; por lo cual, la delimitó

abarcando el extremo noreste argentino, Córdoba, La Pampa y Buenos Aires, aunque dio una distribución general para Corrientes y Entre Ríos en Argentina y la República Oriental del Uruguay. Parodiz (1946) también mencionó la presencia de ejemplares fósiles en la región post- pampeana de Buenos Aires. En 1962 añadió a *B. felipponei* como sinónimo aludiendo que corresponde a una variación de *B. rushii* y mencionó el hallazgo de sub-fósiles en La Plata, luego reafirmado por Miquel (1991).

Respecto de *B. vesicalis* Pfeiffer (1853) la describió para Brasilia, unos años más tarde, Pilsbry (1897-1898) la re-describió, amplió la distribución para Brasil en general y creó la variedad *uruguayanus* para ejemplares colectados en Montevideo, Uruguay. Aunque menciona que recuerda a *B. apodemetes*, la relacionó estrechamente con *B. sporadicus*. En 1957, Parodiz mencionó la presencia de subfósiles de *B. vesicalis uruguayanus* en Buenos Aires. Por otro lado, *B. vesicalis* en ocasiones fue comparada y relacionada con *B. rushii* por tener una espira corta, por lo cual Parodiz (1962) la diferenció de ésta por ser en general más alargada y delgada y por la protoconcha que es en zigzag bien marcada, además la diferenció de *B. bonariensis* por el área umbilical. Posteriormente, Breure (1978) designó un ejemplar con una morfología muy peculiar como lectotipo y planteó una posible sinonimia con *B. bonariensis*. Una distribución más amplia para la provincia de Buenos Aires, Entre Ríos y Santa Fe fue dada en la revisión del género realizada por Miquel (1991), aunque el material asociado a la última provincia mencionada se extravió y no pudo ser revisado por Cuezco et al. (2013) para el catálogo de los Orthalicoidea de Argentina. A su vez, Miquel (1991) caracterizó a la especie de hábitat selvático y planteó que por reducción del mismo está siendo sustituida por *B. bonariensis*. Incluso Clavijo y Scarabino (2013) la incluyen en el listado de especies prioritarias para la conservación en Uruguay.

Si bien la comparación de las características conquiológicas sigue siendo una herramienta indispensable (Barrientos, 2003). Es incluso importante en estudios de reconstrucción filogenética y en cualquier discusión sobre la sistemática de gasterópodos *a priori* (Schander y Sundberg, 2001), ya que existen casos donde la diferenciación por caracteres conquiológicos es eficiente. Sin embargo, en otros taxa, estos caracteres pueden ser afectados por evolución paralela o convergente (Suvorov, 2002) o por plasticidad fenotípica, como en el caso de los bulimulidos que presentan un alto grado de variabilidad intraespecífica (Cabrera et al., 2021). En estos casos, la información dada por partes blandas y estudios de base genética es de máxima necesidad para la diferenciación específica.

Las descripciones existentes de las especies mencionadas están basadas únicamente en la morfología conquiolar y por lo tanto es la única fuente de caracteres de

la que se dispone la mayor parte de la información, así como sucedió en la gran mayoría de los *Bulimulus*. Tal como se continúa realizando en descripciones de especies nuevas (por ejemplo, Simone y Amaral, 2018) y que es fundamental como elemento para dar inicio a la diferenciación de entidades, no obstante es de suma importancia complementar tales descripciones con información dada por otras fuentes de caracteres como lo es la morfología de sus partes blandas e incluso la ofrecida por análisis genéticos.

Por lo antes expuesto, el objetivo de este capítulo es iniciar con estudios conquiolares a nivel cualitativo y morfométrico en *Bulimulus bonariensis*, *B. rushii* y *B. vesicalis* con el fin de comenzar la diferenciación desde los caracteres clásicos, en las especies principalmente presentes en la provincia de Buenos Aires.

## 1.1.B. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1.B.1. Material estudiado

El material analizado en esta primera parte del trabajo de tesis fue, en su mayoría, colectado durante el transcurso del período 2016 hasta 2020 principalmente en la provincia de Buenos Aires. Sin embargo, también se contó con material proveniente de diversas provincias del territorio argentino enriqueciendo de esta manera al desarrollo de los tres primeros capítulos (**Parte 1.-**) de esta tesis. Además de las colectas propias, se incluyeron muestras procedentes de campañas previas realizadas en el marco de becas de formación de grado y vinculados a otros proyectos de investigación, sumado a que se contó con tres lotes en préstamo de la Colección Malacológica del Instituto de Biología Subtropical (IBS, CONICET, UNaM).

Los muestreos se realizaron de forma cualitativa siguiendo la metodología empleada por Barrientos (2003) y Miranda y Cuezco (2010), en períodos principalmente nocturnos posteriores a lluvias, pero también diurnos. El material colectado se acondicionó y depositó en la Colección de Malacología perteneciente a la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata (MLP-Ma).

Para el desarrollo de esta primera parte de la tesis se contó con 72 lotes procedentes de ocho provincias argentinas, dando un total de 451 ejemplares de los cuales 186 contaban con partes blandas (**Tabla 1.1.1**) (**Fig. 1.1.1**; **Fig. 1.1.2**).

**Tabla 1.1.1**

*Material estudiado en la Parte 1.- de la presente tesis doctoral*

PROVINCIA	LOCALIDAD/ PARTIDO. SITIO	R	COORDENADAS	ID DEL LOTE	n	PB
BUENOS AIRES	9 de Julio	1	36°9'21,498''S 60°57'16,793''O	MLP-Ma 15156	3	
	Atalaya	2	35°1'30,388''S 57°32'28,708''O	MLP-Ma 15157	3	3
	Azul. Cerca del "Río del Azul"	3	36°29'33,942''S 59°35'32,978''O	MLP-Ma 15158	7	
	Cabildo. Dique Paso de las Piedras	4	38°39'22,056''S 62°16'0,454''O	MLP-Ma 15159	16	16
	Chascomús. Av. Pedro Urruty	5	35°33'9,805''S 58°3'1,805''O	MLP-Ma 15160	19	2
	Chivilcoy	6	34°54'56,461''S 60°8'50,275''O	MLP-Ma 15161	1	
	Coronel Pringles. Al borde del camino que costea el Río "El Divisorio"	7	38°20'12,972''S 61°38'49,416''O	MLP-Ma 15162	12	

Continuación **Tabla 1.1.1**

Ensenada. Punta Lara	8	34°49'40,144''S 57°58'28,653''O	MLP-Ma 15163	1	
Ensenada. Reserva Natural Punta Lara	9	34°47'30,940''S 58°1'14,422''O	MLP-Ma 15164	1	
Ensenada. Reserva Natural Punta Lara	10	34°47'30,940''S 58°1'14,422''O	MLP-Ma 14686	11	1
Ensenada. Reserva Natural Punta Lara	11	34°47'30,940''S 58°1'14,422''O	MLP-Ma 15165	3	
Florencio Varela. Villa San Luis. Av. Los Inmigrantes (Campo privado Policastro)	12	34°51'7,617''S 58°15'53,932''O	MLP-Ma 14541	2	
Florencio Varela. Villa San Luis. Av. Los Inmigrantes	13	34°51'7,617''S 58°15'53,932''O	MLP-Ma 15166	1	1
Florencio Varela. Villa San Luis. Av. Los Inmigrantes	14	34°51'7,617''S 58°15'53,932''O	MLP-Ma 15167	1	1
Florencio Varela. Villa San Luis. Av. Los Inmigrantes	15	34°51'7,617''S 58°15'53,932''O	MLP-Ma 15168	4	4
Florencio Varela. Villa San Luis. Av. Los Inmigrantes	16	34°51'7,617''S 58°15'53,932''O	MLP-Ma 15169	6	6
Florencio Varela. Villa San Luis. Calle 1355 ("Quinta Natalio")	17	34°50'58,2''S 58°15'38''O	MLP-Ma 14533	32	
Florencio Varela. Villa San Luis. Calle 1355	18	34°50'58,2''S 58°15'38''O	MLP-Ma 14534	14	
Florencio Varela. Villa San Luis. Calle 1355	19	34°50'58,2''S 58°15'38''O	MLP-Ma 14535	1	
Florencio Varela. Villa San Luis. Calle 1355	20	34°50'58,2''S 58°15'38''O	MLP-Ma 14536	4	
Florencio Varela. Villa San Luis. Calle 1355	21	34°50'58,2''S 58°15'38''O	MLP-Ma 14537	15	
Florencio Varela. Villa San Luis. Calle 1355	22	34°50'58,2''S 58°15'38''O	MLP-Ma 14538	10	
Florencio Varela. Villa San Luis. Calle 1355	23	34°50'58,2''S 58°15'38''O	MLP-Ma 14539	15	
Florencio Varela. Villa San Luis. Calle 1355	24	34°50'58,2''S 58°15'38''O	MLP-Ma 14540	18	
Florencio Varela. Reserva Natural de Uso Multiple Guillermo Enrique Hudson	25	34°51'16,771''S 58°13'56,323''O	MLP-Ma 14532	2	
General Viamonte. Los Toldos	26	35°35'36,564''S 61°18'14,036''O	MLP-Ma 14630	3	3
La Plata. Paseo del Bosque René G. Favaloro	27	34°54'39,574''S 57°56'24,960''O	MLP-Ma 15170	1	
La Plata. Los Hornos "Vivero Ferrari Hnos. S.A."	28	34°56'55,981''S 57°57'44,880''O	MLP-Ma 14629	26	25
La Plata. Melchor Romero "Vivero Ferrari Hnos. S.A."	29	34°57'8,488''S 58°5'31,847''O	MLP-Ma 14542	1	
La Plata. Villa Elisa. Vivero "El Parque"	30	34°50'54,880''S 58°5'53,803''O	MLP-Ma 14628	22	4
La Plata. Jardín Zoológico y Botánico de La Plata	31	34°54'37,029''S 57°56'29,986''O	MLP-Ma 14643	1	1
Las Flores. A pocos metros de la Ruta Nacional 3	32	36°0'37,404''S 59°3'59,414''O	MLP-Ma 15171	4	

Continuación **Tabla 1.1.1**

	Quilmes, Alrededores de Parque Natural y Reserva Ecológica Municipal "Selva Marginal Quilmeña"	33	34°41'26,339''S 58°15'37,263''O	MLP-Ma 14439	17	17
	Quilmes, Alrededores de Parque Natural y Reserva Ecológica Municipal	34	34°41'26,339''S 58°15'37,263''O	MLP-Ma 14445	2	2
	Quilmes, Alrededores de Parque Natural y Reserva Ecológica Municipal	35	34°41'26,339''S 58°15'37,263''O	MLP-Ma 14455	2	2
	Ramallo	36	33°35'15,6012''S 60°17'30,677''O	MLP-Ma 15172	4	
	San Nicolás. San Nicolás de los Arroyos	37	33°35'14,456''S 61°10'45,882''O	MLP-Ma 15173	1	1
	San Vicente. Reserva Natural San Vicente	38	35°0'56,169''S 58°25'35,221''O	MLP-Ma 15174	1	
	Saldungaray (cerca de la Ruta Prov. 72)	39	38°12'1,558''S 61°45'29,289''O	MLP-Ma 15175	6	
	San Pedro. Vivero "Sin Apuro"	40	33°41'53,779''S 59°47'30,868''O	MLP-Ma 14631	1	1
	Sierra de la Ventana	41	38°7'50,213''S 61°48'46,569''O	MLP-Ma 14546	1	
	Sierra de la Ventana. Sauce Grande	42	38°7'39,784''S 61°48'25,92''O	MLP-Ma 15176	9	
	Vicente Lopez. Olivos	43	34°32'20,641''S 58°30'29,051''O	MLP-Ma 12486	2	2
	Villa Ventania. Calle Belisario	44	38°5'24,957''S 61°56'0,736''O	MLP-Ma 15177	7	
<b>CHACO</b>	Resistencia	45	27°27'37,770''S 59°3'55,389''O	MLP-Ma 15178	10	4
<b>CÓRDOBA</b>	Cabana	46	31°12'53''S 64°21'52''O	MLP-Ma 15179	2	2
	Capilla del Monte	47	30°51'03,9''S 64°32'34,9''O	MLP-Ma 15180	1	
	Jesús Maria	48	30°58'54,1''S 64°6'8,9''O	MLP-Ma 15181	17	17
	La Cumbre	49	31°3'5,9''S 64°27'53,9''O	MLP-Ma 15182	1	1
	Miramar	50	30°55'13,34''S 62°40'33''O	MLP-Ma 15183	9	9
	Villa Carlos Paz	51	31°24'35,5644''S 64°30'1,17''O	MLP-Ma 14854	9	
	Villa del Dique. Calle Paso	52	32°10'21,690''S 64°26'32,369''O	MLP-Ma 15184	7	6
	Villa General Belgrano	53	31°58'59,1''S 64°33'51,2''O	MLP-Ma 14522	2	2
<b>CORRIENTES</b>	Corrientes capital.	54	27°30'9,3''S 58°49'6,9''O	MLP-Ma 15185	5	1
	Bella Vista	55	28°30'55,3''S 59°1'23,8''O	MLP-Ma 14691	4	4
	Ituzaingó	56	27°35'58,9''S 56°41'53,4''O	MLP-Ma 14825	18	15
	Mercedes. Vías del tren acceso a la ciudad	57	29°10'26,835''S 58°5'23,888''O	MLP-Ma 15186	3	3

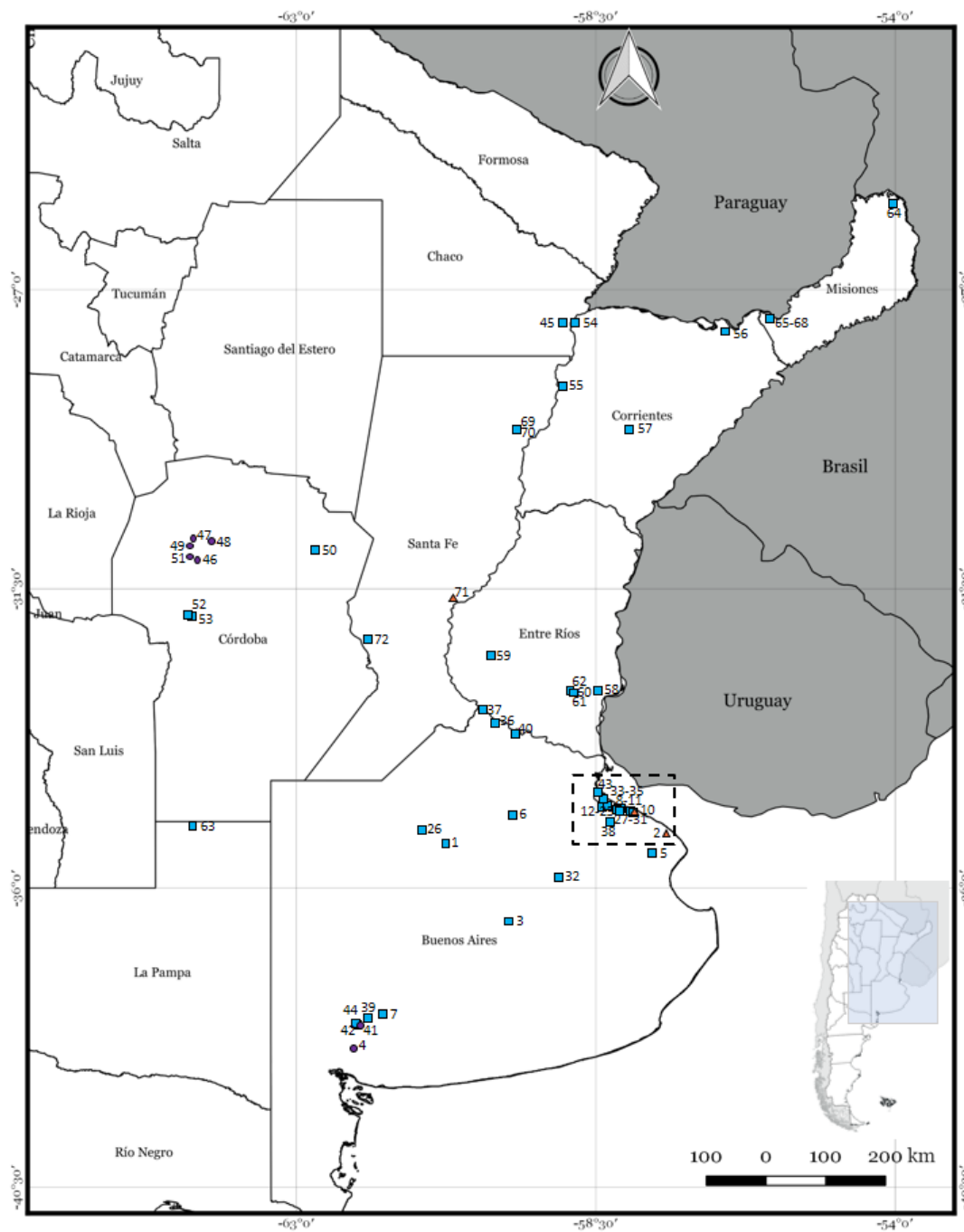
Continuación **Tabla 1.1.1**

<b>ENTRE RIOS</b>	Gualeguaychú. Reserva Senderos del Monte	58	33°2'25,85''S 58°27'21,42''O	MLP-Ma 14545	3	
	Ruta Provincial N°11. Al borde del "Arroyo sin nombre"	59	31°59'49,458''S 60°35'49,948''O	MLP-Ma 15187	1	
	Villa Larroque. Calle Hipólito Irigoyen (jardín de una casa familiar)	60	33°2'22,059''S 58°59'59,131''O	MLP-Ma 15188	6	6
	Villa Larroque. Cuchilla redonda. "Estancia lo de Alberto", RP16 Km 23,5	61	33°3'49,156''S 59°3'10,196''O	MLP-Ma 14543	8	
	Villa Larroque. Cuchilla redonda. "Estancia lo de Alberto", RP16 Km 23,5	62	33°3'49,156''S 59°3'10,196''O	MLP-Ma 14544	5	5
<b>LA PAMPA</b>	Damian Maisonaveo o Estación Simson	63	35°02'32,53''S 64°23'01,52''O	MLP-Ma 14642	3	
<b>MISIONES</b>	Comandante Andresito	64	25°39'45,8''S 54°02'42,7''O	MLP-Ma 15189	2	
	Posadas. Calle Tripoli entre Av. Almirante Brown y Av. Martin Fierro	65	27°22'56''S 55°54'33,58''O	IBS-Ma 363	1	1
	Posadas. Calle Tripoli	66	27°22'56''S 55°54'33,58''O	IBS-Ma 393	1	1
	Posadas. Calle Tripoli	67	27°22'56''S 55°54'33,58''O	IBS-Ma 486	1	1
	Posadas. Calle Tripoli	68	27°22'56''S 55°54'33,58''O	IBS-Ma 185	1	1
<b>SANTA FÉ</b>	Avellaneda (casa de campo)	69	29°2'25,44''S 59°41'29,04''O	IBS-Ma 362- 2	1	1
	Avellaneda (casa de campo)	70	29°2'25,44''S 59°41'29,04''O	IBS-Ma 362- 3	1	1
	Colastiné	71	31°37'48,21''S 60°37'7,23''O	MLP-Ma 14685	15	13
	Maria Susana	72	32°15'56,833''S 61°54'32,832''O	MLP-Ma 15190	1	
<b>TOTALES (N)</b>				<b>72</b>	<b>451</b>	<b>186</b>

MLP-Ma (Colección Malacológica del Museo de La Plata). IBS-Ma (Colección Malacológica del Instituto de Biología Subtropical). R= número de referencia en el mapa (**Fig. 1.1.1**; **Fig. 1.1.2**). n= número total de ejemplares que compone cada lote. PB= número de ejemplares del correspondiente lote que cuenta con partes blandas.

**Figura 1.1.1**

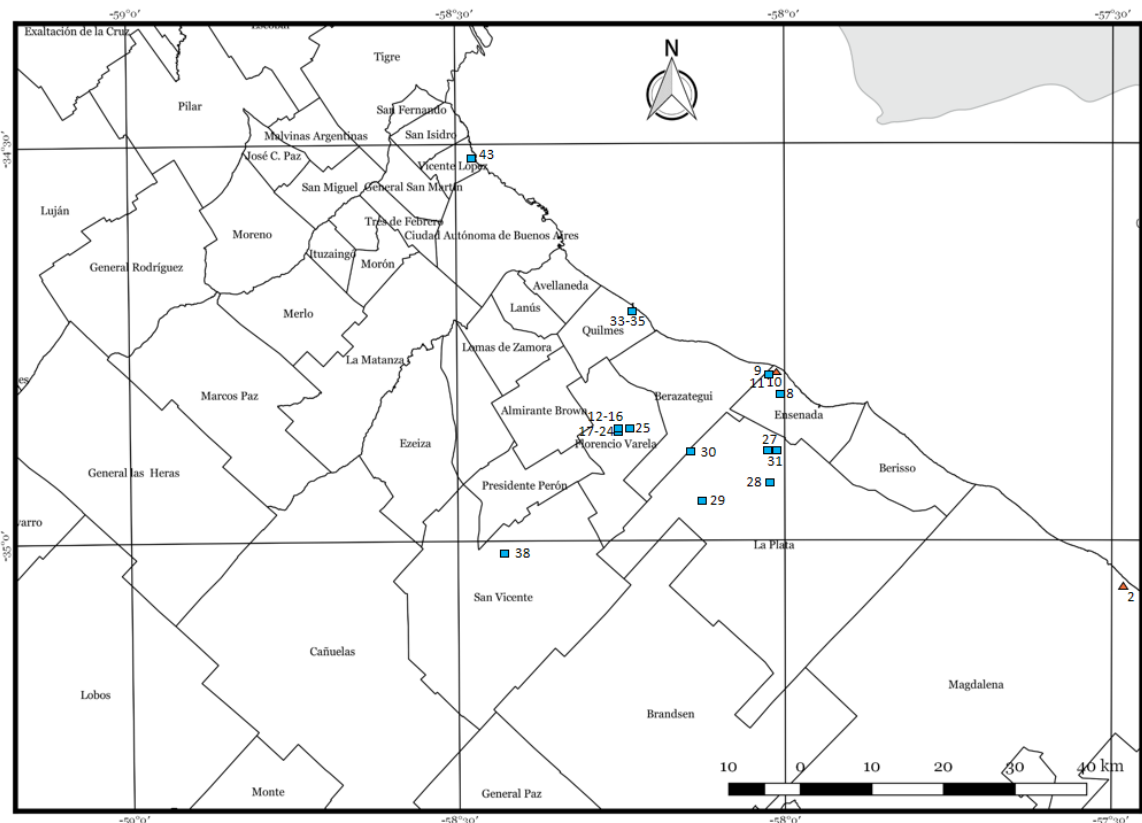
Distribución geográfica de los lotes de *Bulimulus* (Leach, 1814) estudiados



La identificación de los lotes corresponde al número “R” dado como referencia en la **Tabla 1.1.1**  
 Referencias: ■ *B. bonariensis*, ● *B. rushii*, ▲ *B. vesicalis*

**Figura 1.1.2**

*Distribución geográfica de lotes estudiados procedentes del área metropolitana de Buenos Aires*



La identificación de los lotes corresponde al número “R” dado como referencia en la **Tabla 1.1.1**  
Referencias: ■ *B. bonariensis*, ▲ *B. vesicalis*

### 1.1.B.2. Procesamiento de las muestras

Las muestras que contaban con partes blandas se transportaron al laboratorio siguiendo las recomendaciones de Barrientos (2003), en recipiente rígido con sustrato y hojarasca del lugar debidamente etiquetado; el procesamiento de este tipo de material se describe en el **Capítulo 1.2.-** de la presente tesis. Las muestras que sólo estaban conformadas por material conquiolar se transportaron en recipiente con una base de algodón para absorber los golpes durante el traslado.

### 1.1.B.3. Acondicionamiento de material conquiolar

Las conchillas se limpiaron internamente con agua a presión mediante pipeta de bulbo y externamente con cepillo de cerdas de fibras sintéticas suaves, se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel tissue. Luego, se guardaron de forma individual

debidamente etiquetados en viales de vidrio con base de algodón. Para la observación de las esculturaciones de la protoconcha y de la conchilla se hizo uso del Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (JEOL 6360) del Museo de La Plata. En las muestras estudiadas, se realizó una limpieza más exhaustiva que consistió en la inmersión de la misma durante 1 minuto en una solución de limpiador líquido de uso doméstico (agua, etilenglicol-n-hexil éter, monoisopropanolamina, agua amoniacal, tensioactivo aniónico y agentes humectantes). Posteriormente, se procedió a realizar un cuidadoso cepillado bajo microscopio estereoscópico marca Leica modelo EZ4; en caso de ser necesario, se repitió el procedimiento.

#### **1.1.B.4. Discriminación morfológica**

##### **1.1.B.4.a. Análisis cualitativo**

La identificación de las muestras se realizó siguiendo las descripciones y re-descripciones de las especies, en función de la bibliografía en la cual cada una de las mismas es tratada (ver Introducción). También se compararon con el material tipo disponible y los lotes depositados en las colecciones científicas del Museo de la Plata (MLP), Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN), Academy of Natural Sciences Philadelphia (ANSP) y The Natural History Museum United Kingdom (NHMUK).

La descripción conquiolar se realizó siguiendo la terminología propuesta por Breure (1979) y que es concordante con la utilizada por Pilsbry (1895-1896; 1901-1902). Se acompañó cada descripción con una lista sinonímica, datos de localidad y material tipo, al cual se incorporó información al respecto en función de lo disponible en colecciones de Museos. Al mismo tiempo que se reunió la información en relación a la distribución.

##### **1.1.B.4.b. Análisis morfométrico**

Con la finalidad de realizar una diferenciación estadística que aporte información adicional a la caracterización cualitativa, se realizó un análisis multivariado de ejemplares correspondientes a las tres especies de *Bulimulus*. Para lo cual, se seleccionaron individuos que abarquen el rango de extensión de cada especie y cuya conchilla se encontrara en buen estado general. También se incorporaron al análisis las medidas correspondientes al material tipo disponible.

Para el desarrollo del estudio morfométrico se seleccionaron un total de 131 conchillas, 60 correspondientes a *B. bonariensis*, 43 a *B. rushii* y 28 a *B. vesicalis*. La gran mayoría de los ejemplares seleccionados e incluidos en este análisis cuentan con partes blandas, por lo tanto fueron también analizados en el siguiente capítulo y, siempre que se pudo, en el análisis genético.

Las medidas se tomaron con calibre digital (Mitutoyo Corporation®, Modelo N°CD-6' C, con rango de medición de 0 a 150 mm y precisión de dos decimales) y se expresaron en milímetros (mm). Con la finalidad de incluir material tipo en el análisis, se solicitaron imágenes digitales correspondientes a lectotipos, paralectotipos y sintipos disponibles de las especies, sobre las cuales se tomaron las medidas utilizando el programa FIJI (versión 1.51). Dos de las variables continuas de la conchilla se midieron siguiendo a Parodiz (1951) (longitud de la espira -LE- y anfracto basal o longitud del último anfracto -LUA-); además, se contaron el número de vueltas según lo indicó el autor mencionado. No obstante, la longitud de la abertura -LA- se midió de acuerdo a Borda y Ramirez (2014) y la mayoría de las variables continuas aquí consideradas se obtuvieron siguiendo a Miranda y Cuezco (2014) y Miranda (2015) (longitud total de la conchilla -LT-, altura o longitud de la penúltima vuelta -LPV-, diámetro apertural o ancho de la abertura -AA-, ancho de la penúltima vuelta -APV-, longitud del espacio parietal -LEP-, diámetro mayor de la conchilla -DMA- y diámetro menor -DME-)

De cada individuo se consideraron las diez variables continuas de distancia antes mencionadas, las que son definidas y explicadas a continuación; se indica también el criterio con el cual se realizó la medición:

- Longitud total de la conchilla (**Fig. 1.1.3: LT**): es la longitud medida desde el ápex hasta la porción basal de la abertura.
- Longitud de la espira (**Fig. 1.1.3 A: LE**): es una porción de la longitud total, medida desde el ápex hasta la última línea de sutura completa en línea recta, en vista apertural.
- Longitud de la penúltima vuelta (**Fig. 1.1.3 A: LPV**): porción de la longitud total medida desde la penúltima a la última sutura que conforma la espira.
- Longitud del último anfracto (**Fig. 1.1.3 A: LUA**): es una porción de la longitud total, medida desde la última línea de sutura completa o, dicho de otro modo, desde la sutura inferior de la penúltima vuelta hasta la porción basal del peristoma.
- Longitud de la abertura (**Fig. 1.1.3 A: LA**): medida desde la parte superior de la abertura, que corresponde al último punto de sutura, hasta la base de la abertura.

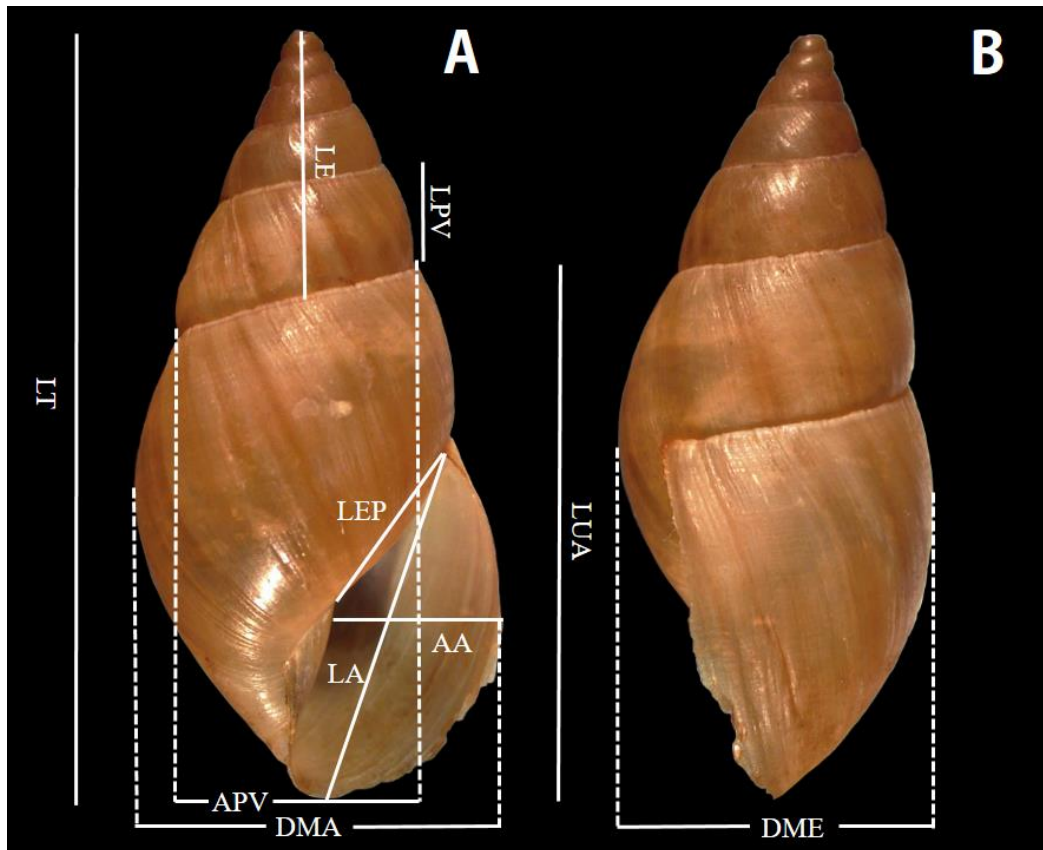
- Ancho de la abertura (**Fig. 1.1.3 A: AA**): es una porción del diámetro mayor, medida desde la zona más interna donde se refleja el labio interno hasta el borde del peristoma.
- Ancho de la penúltima vuelta (**Fig. 1.1.3 A: APV**): medida en ángulo recto a la longitud total de la conchilla y a la altura de la sutura que separa la penúltima de la última vuelta.
- Longitud del espacio parietal (**Fig. 1.1.3 A: LEP**): Medida desde el punto más interno donde se refleja el labio interno hasta la parte superior de la abertura, donde el labio externo conforma el último punto de sutura.
- Diámetro mayor (**Fig. 1.1.3 A: DMA**): Medida perpendicular a la longitud total de la conchilla, es el ancho total de la misma incluyendo el peristoma.
- Diámetro menor (**Fig. 1.1.3 B: DME**): es una medida perpendicular al diámetro mayor y a la longitud total de la conchilla, medida en vista lateral derecha.

Posteriormente, se calculó el promedio ( $\bar{x}$ ), desvío estándar (DE), valor mínimo y máximo para cada variable correspondiente a cada especie.

Previo al análisis de los datos, se realizó la transformación de las medidas a logaritmo a los fines de su normalización. Luego, a fin de visualizar la dispersión general y qué variables influyen en mayor medida a dicha dispersión se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) en el cual se utilizaron matrices de varianza-covarianza ya que todas las variables fueron medidas en las mismas unidades (mm). También se evaluó la significancia de las variables normalizadas mediante MANOVA. Posteriormente, a las variables se les aplicó un Análisis Discriminante (AD) con el fin de obtener una mejor separación de los grupos. Los estadísticos fueron aplicados mediante el programa PAST (versión 3.25) (Hammer et al., 2001).

**Figura 1.1.3**

*Representación de las variables continuas medidas en ejemplares de Bulimulus.*



**A-** Vista ventral. **B-** Vista lateral derecha.

*Abreviaturas:* ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

## 1.1.C. RESULTADOS

### 1.1.C.1. Discriminación morfológica

#### 1.1.C.1.a. Análisis cualitativo

El material disponible para la realización de la presente tesis doctoral (**Tabla 1.1.1**), se organizó y separó en tres especies las cuales se presentan siguiendo la sistemática actualizada de Bouchet et al. (2017).

Clase Gastropoda Cuvier, 1798

Subclase Heterobranchia Gray, 1840

Infraclase Euthyneura Spengel, 1881

Cohorte Tectipleura Schrödl, Jörger, Klussmann-Kolb y Wilson, 2011

Subcohorte Panpulmonata Jörger, Stöger, Kano, Fukuda, Knebelsberger y Schrödl, 2010

Superorden Eupulmonata Haszprunar y Huber, 1990

Clado Geophila Férussac, 1812

Orden Stylommatophora Schmidt, 1855

Suborden Helicina Rafinesque, 1815

Infraorden Orthalicoidei Martens, 1860

Superfamilia Orthalicoidea Martens, 1860

Familia Bulimulidae Tryon, 1867

Subfamilia Bulimulinae Tryon, 1867

Género *Bulimulus* Leach, 1814

*Bulimulus bonariensis* (Rafinesque, 1833)

*Bulimulus rushii* Pilsbry, 1897

*Bulimulus vesicalis* (Pfeiffer, 1853)

**Bulimulus bonariensis (Rafinesque, 1833)**

**Sinonimia**

*Siphalomphix bonariensis* Rafinesque, 1833: 165.

*Helix sporadica* d'Orbigny, 1835: 12.

*Bulimus sporadicus* d'Orbigny, 1837 [1834-1847]: 271, pl. 32, fig. 12-15; Parravicini, 1894: 6; Formica Corsi, 1900: 408.

*Bulimus montevidensis* Pfeiffer, 1846: 33; Formica Corsi, 1900: 407.

*Bulimus gelidus* Reeve, 1849: 317, pl. 76, fig. 553.

*Bulimulus heloicus* var. *fusca* Ancey, 1901 a: 82.

*Bulimulus (Drymaeus) morenoi* Preston, 1907: 494, fig. 7.

*Adzharia renschi* Hesse, 1933; Hausdorf, 2015, fig. 1-2.

*Bulimulus (Bulimulus) sporadicus schadei* Schlesch, 1935: 86, pl. 6, fig. 4-5.

*Bulimulus (Thaumastus) sporadicus* var. *bonariensis*: Strobel, 1874: 24.

*Bulimulus sporadicus*: Ancey, 1897: 5; Hylton Scott, 1948: 236.

*Bulimulus (Bulimulus) sporadicus* var. *bonariensis*: Pilsbry, 1897-1898: 67, pl. 11, fig. 12-18.

*Bulimulus (Bulimulus) sporadicus*: Parodiz, 1946: 315.

*Bulimulus bonariensis*: Parodiz, 1957: 133; Cuezco et al., 2013: 150; Breure y Araujo, 2017 fig. 28 B.

*Bulimulus bonariensis morenoi*: Parodiz, 1957: 133. Parodiz, 1962: 432, pl. 1, fig. 3.

*Bulimulus bonariensis sporadicus*: Parodiz, 1957: 133; Parodiz, 1962: 433; Miquel, 1991: 101, fig. 39-42.

*Bulimulus bonariensis bonariensis*: Parodiz, 1962: 433; Miquel, 1991: 98, fig. 30-31. Scarabino, 2003: 208.

*Bulimulus (Bulimulus) bonariensis montevidensis*: Figueiras, 1963: 88.

*Bulimulus (Bulimulus) bonariensis sporadicus*: Figueiras, 1963: 89; Fernández, 1973: 76; Fernández y Castellanos, 1973: 278; Breure, 1975: 1145; Quintana, 1982: 87.

*Bulimulus (Bulimulus) bonariensis*: Fernández, 1973: 75.

*Bulimulus (Bulimulus) bonariensis morenoi*: Fernández, 1973: 78; Fernández y Castellanos, 1973: 278

*Bulimulus bonaerensis sporadicus*: Breure, 1978: 142.

*Bulimulus (Thaumastus) sporadicus bonariensis*: Breure, 1979: 62.

*Bulimulus gelidus*: Breure, 2008: 242, fig. 6-7.

### **Localidad tipo**

Buenos Aires, Argentina (Rafinesque, 1833).

### **Material tipo**

*B. b. bonariensis* NHMUK 1975401 sintipo de *B. montevidensis*, The Natural History Museum United Kingdom (NHMUK), Londres, Reino Unido.

Lectotipo *B. b. sporadicus* NHMUK 1854.12.4.160 (1 ejemplar y 6 paralectotipos).

Paralectotipo *B. b. sporadicus* NHMUK 1854.12.4.159 (6 ejemplares).

Sintipo *B. b. sporadicus* NHMUK 1854.12.4.158 (7 ejemplares).

### **Distribución**

Uruguay y Argentina: Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, Tucumán (Cuezco et al., 2013).

### **Ecorregiones**

Pampa húmeda, Alto Paraná, Bosque húmedo de araucarias, Chaco seco, Espinal, Chaco húmedo, Sabana inundada de Paraná, Yungas andinas del sur y Sabana del cono sur mesopotámico (Ovando et al., 2019).

### **Lotes identificados**

IBS-Ma 185, IBS-Ma 362-2, IBS-Ma 362-3, IBS-Ma363, IBS-Ma 393, IBS-Ma 486, MLP-Ma 12486, MLP-Ma 14439, MLP-Ma 14445, MLP-Ma 14455, MLP-Ma 14522, MLP-Ma 14532, MLP-Ma 14533, MLP-Ma 14535, MLP-Ma 14536, MLP-Ma 14537, MLP-Ma 14538, MLP-Ma 14539, MLP-Ma 14540, MLP-Ma 14541, MLP-Ma 14542, MLP-Ma 14543, MLP-Ma 14544, MLP-Ma 14545, MLP-Ma 14628, MLP-Ma 14629, MLP-Ma 14630, MLP-Ma 14631, MLP-Ma 14642, MLP-Ma 14643, MLP-Ma 14691, MLP-Ma 14825, MLP-Ma 15156, MLP-Ma 15158, MLP-Ma 15160, MLP-Ma 15161, MLP-Ma 15162,

MLP-Ma 15163, MLP-Ma 15164, MLP-Ma 15165, MLP-Ma 15166, MLP-Ma 15167, MLP-Ma 15168, MLP-Ma 15169, MLP-Ma 15170, MLP-Ma 15171, MLP-Ma 15172, MLP-Ma 15173, MLP-Ma 15174, MLP-Ma 15175, MLP-Ma 15176, MLP-Ma 15177, MLP-Ma 15178, MLP-Ma 15183, MLP-Ma 15184, MLP-Ma 15185, MLP-Ma 15186, MLP-Ma 15187, MLP-Ma 15188, MLP-Ma 15189, MLP-Ma 15190.

### Descripción

Respecto del material colectado se encontraron tres configuraciones relacionadas a la presente especie de estudio (**Fig. 1.1.4-1.1.6**), la correspondencia a la misma entidad se sustentará al estudiar la anatomía interna y posteriormente mediante el análisis genético. No obstante, las tres morfologías presentadas fueron encontradas a lo largo del rango de distribución dado por Miquel (1991) para *B. b. bonariensis*. En observaciones personales del material estudiado y ajustando la terminología a la propuesta por Breure (1979) se describe a continuación las tres morfologías encontradas:

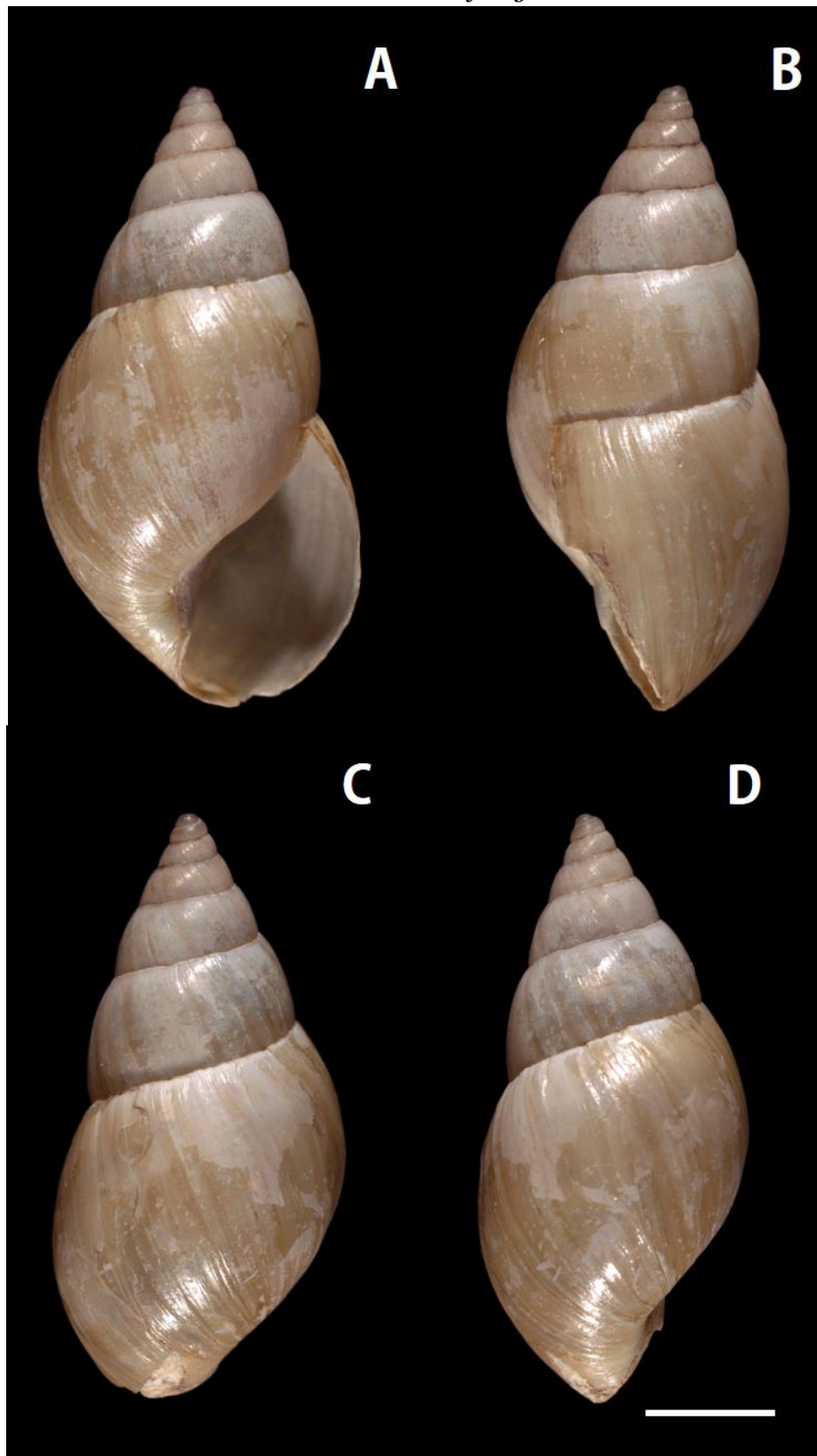
- Morfología “A” (**Fig. 1.1.4**): conchilla oval-elongada; espira de mediano desarrollo; suturas poco profundas; ~6 anfractos ligeramente convexos, último ocupa ~70% de la longitud total; pared columelar reflejada, ombligo angosto (término aquí utilizado como sinónimo de la tercera morfología del orificio umbilical presentada por Breure, 1979); abertura sub-ovalada, ocupa ~45 % de la longitud total; peristoma simple y cortante; callo visible; periostraco brillante, coloración marrón con bandas ligeramente más oscuras.
- Morfología “B” (**Fig. 1.1.5**): conchilla oval-elongada; espira de gran desarrollo; suturas poco profundas; ~7 <sup>3</sup>/<sub>4</sub> anfractos ligeramente convexos, último ocupa ~70% de la longitud total; pared columelar reflejada, ombligo angosto; abertura oval-elongada, ocupa ~45 % de la longitud total; peristoma simple y cortante; callo visible; periostraco brillante, color beige con bandas bien marcadas más oscuras o rojizas.
- Morfología “C” (**Fig. 1.1.6**): conchilla oval-elongada; espira de mediano desarrollo; suturas poco profundas; ~6 anfractos ligeramente convexos, último ocupa ~70% de la longitud total; pared columelar reflejada, ombligo angosto; abertura sub-ovalada ocupa ~50 % de la longitud total; peristoma simple y cortante; callo no definido; periostraco brillante, coloración marrón con bandas ligeramente más oscuras.

Comentario: Aquellas conchillas que se encontraron vacías adquieren, luego de transcurrido un tiempo, tonos blanquecinos. Las líneas de crecimiento en todos los casos se aprecian a simple vista con mayor o menor grado de notoriedad. También es posible visualizar bajo lupa a gran aumento y en MEB líneas espirales que recorren toda la teleoconcha (**Fig. 1.1.7 B**).

La protoconcha (**Fig. 1.1.7, Fig. 1.1.8**) consiste, en las tres morfologías, en una vuelta y media aproximadamente, de esculturaciones constituidas por pequeñas depresiones y líneas que conforman un patrón en zigzag cuyo recorrido va de sutura a sutura. El límite entre la protoconcha y la teleoconcha, a mitad de la segunda vuelta de la espira, está bien definido por la presencia de líneas de crecimiento verticales que van de una línea de sutura a la siguiente lo cual se manifiesta a lo largo de toda la teleoconcha que corresponde a las  $\sim 4,5-6 \frac{1}{4}$  vueltas restantes.

**Figura 1.1.4**

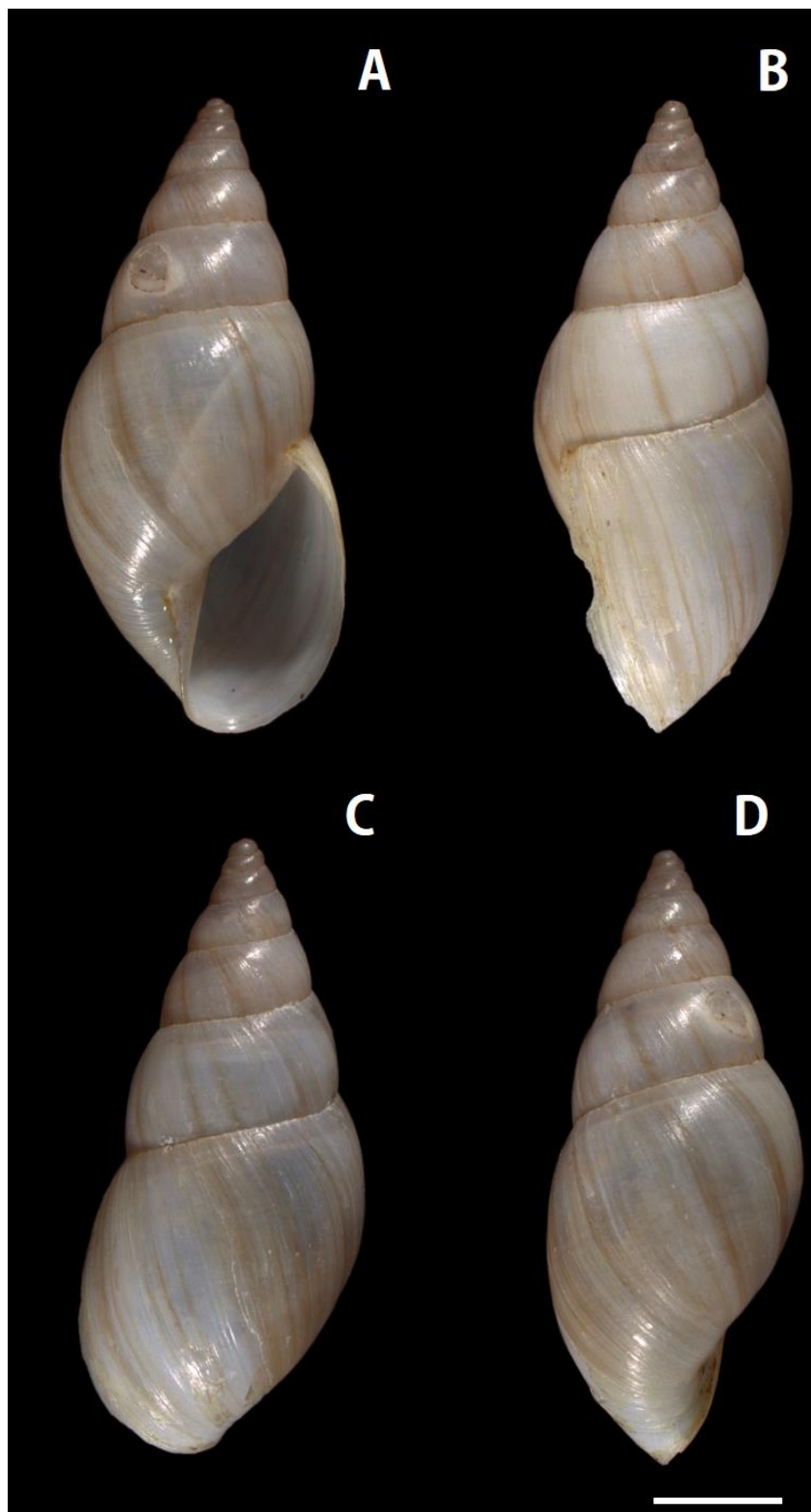
Conchilla adulta de *Bulimulus bonariensis*. Morfología "A"



A-vista ventral. B- vista lateral derecha. C- vista dorsal. D- vista lateral izquierda. (MLP-Ma 15167). Escala: 5 mm.

**Figura 1.1.5**

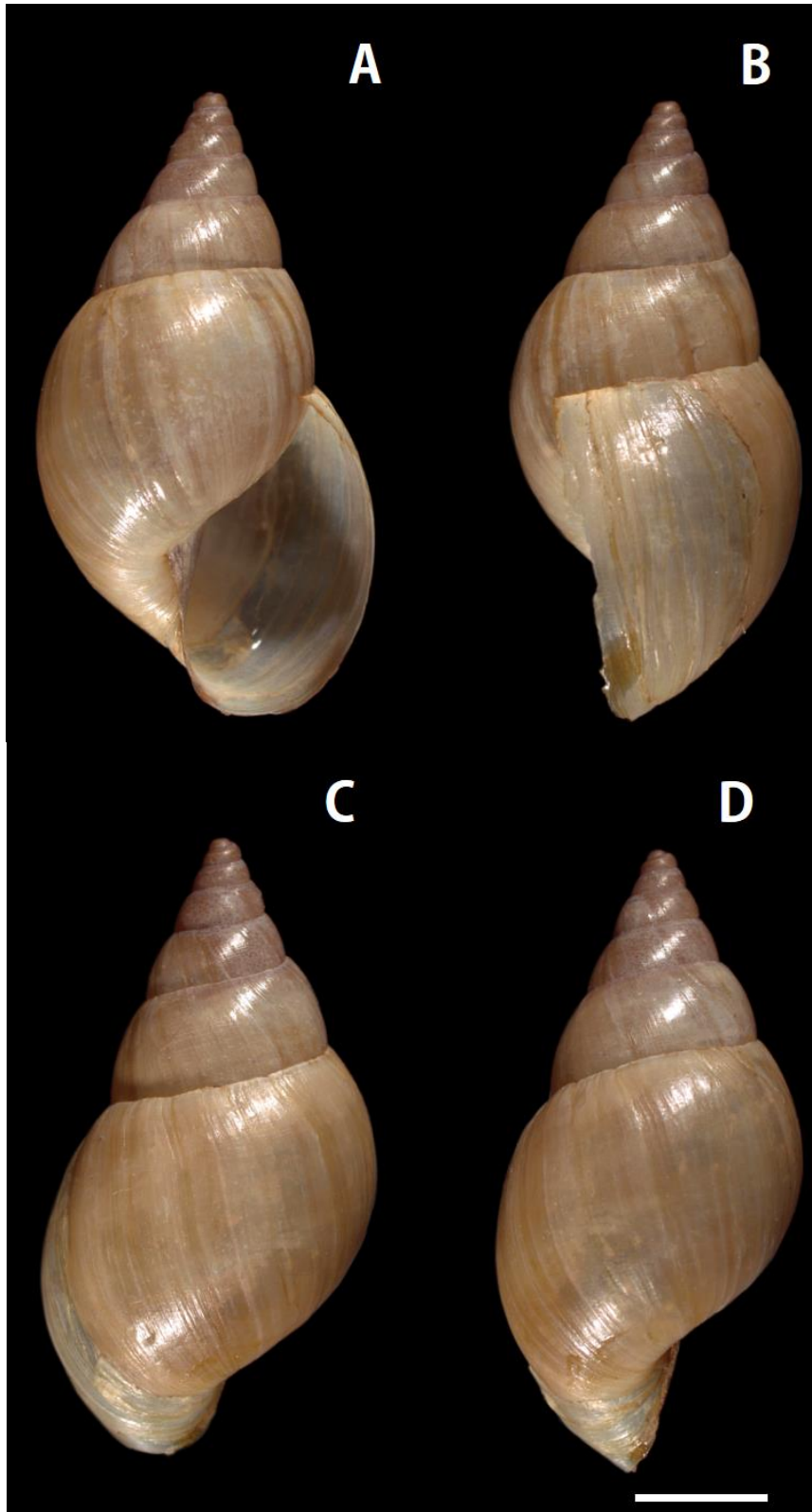
Conchilla adulta de *Bulimulus bonariensis*. Morfología "B"



A-vista ventral. B- vista lateral derecha. C- vista dorsal. D- vista lateral izquierda. (MLP-Ma 15168/b). Escala: 5 mm.

**Figura 1.1.6**

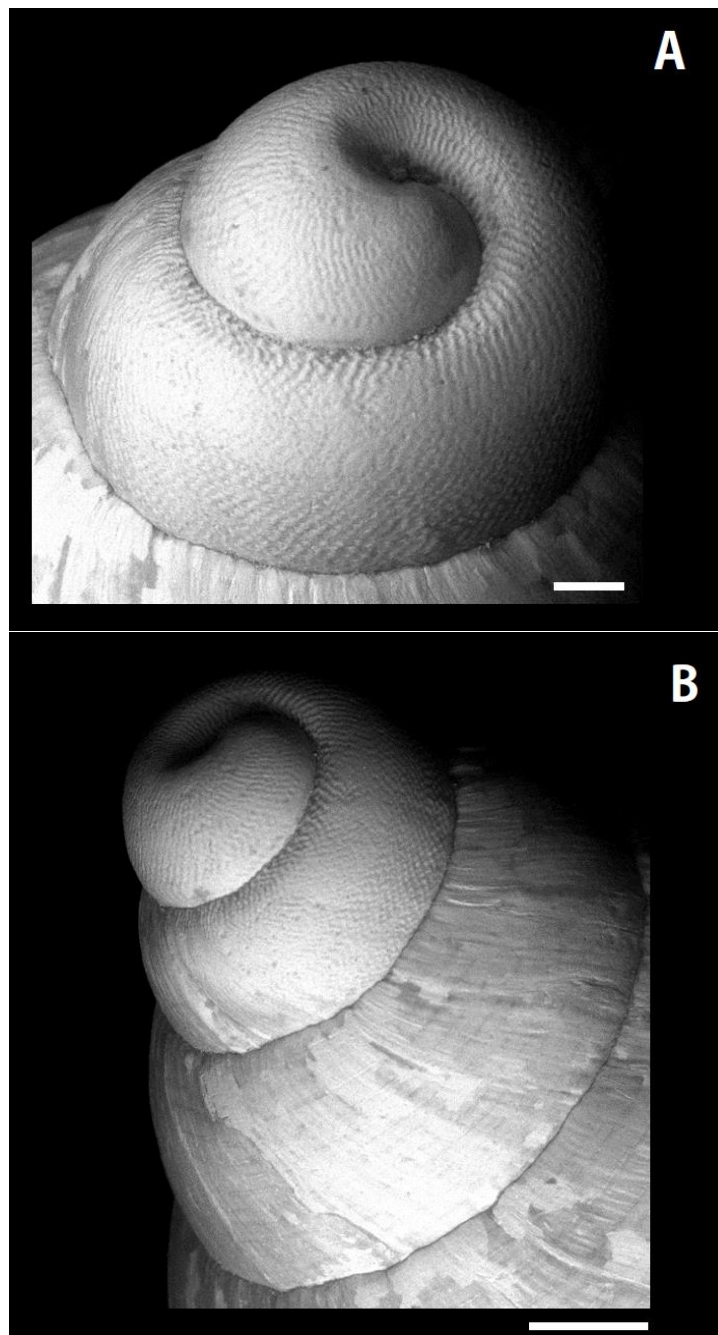
Conchilla adulta de *Bulimulus bonariensis*. Morfología "C"



**A-**vista ventral. **B-** vista lateral derecha. **C-** vista dorsal. **D-** vista lateral izquierda. (MLP-Ma 15168/c). Escala: 5 mm.

**Figura 1.1.7**

*Protoconcha de Bulimulus bonariensis adulto*



**A**-vista apical. **B**- vista lateral. (MLP-Ma 15168/b). Escala: A= 200  $\mu\text{m}$ , B= 500  $\mu\text{m}$ .

**Figura 1.1.8**

Protoconcha de *Bulimulus bonariensis* juvenil



Vista lateral izquierda de un ejemplar proveniente del desarrollo del **Capítulo 2.1.**- Escala: 200  $\mu$ m.

***Bulimulus rushii* Pilsbry, 1897**

**Sinonimia**

*Bulimulus rushii* Pilsbry, 1897: 18; Pilsbry 1897-1898: 70, pl. 12, fig. 47; Formica Corsi, 1900: 409; Parodiz, 1944: 3, fig. 2; Parodiz, 1957: 133; Parodiz, 1962: 433; Fernández, 1973: 80; Miquel, 1991: 103, fig. 3-5; Scarabino, 2003: 208; Cuezco et al., 2013: 152.

*Bulimulus (Rhinus) argentinus* Ancey, 1901 b: 92.

*Bulimulus ? bonaërensis* Holmberg, 1909: 10.

*Bulimulus (Bulimulus) rushi* Parodiz 1946: 315.

*Peronaeus (Lissoacme) bonaerensis*: Parodiz, 1947: 22.

*Peronaeus (Lissoacme) curamalalensis* Parodiz, 1957: 23.

*Bulimulus (Bulimulus) rushii*: Figueiras, 1963: 89; Fernández y Castellanos, 1973: 278.

**Localidad tipo**

Maldonado, Uruguay (Pilsbry, 1897).

### **Material tipo**

Lectotipo ANSP 70382 (1 ejemplar), Academy of Natural Sciences Philadelphia (ANSP), Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos.

Comentario: En el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (MACN), Buenos Aires, Argentina se encontró un lote, MACN-Ma 31422 (2 ejemplares), cuyos especímenes estaban identificados como holotipo y que de esta manera figuran en las bases de datos del MACN; colectado en Salto (Uruguay) por Duarte Eliseo en diciembre de 1965. Sin embargo, en relación a este lote no se encontró ninguna mención en la bibliografía consultada y, por lo tanto, no constituye material tipo con validez.

### **Distribución**

Uruguay y Argentina: Buenos Aires, Corrientes y Entre Ríos. El material colectado e identificado por la Dra. Hylton Scott para la provincia de Córdoba, fue encontrado con la colaboración del personal técnico en la colección de Malacología del Museo de La Plata (MLP) sin número de catálogo. Luego de este hallazgo fueron ingresados a dicha Colección bajo los números MLP-Ma 15179, MLP-Ma 15180, MLP-Ma 15181, MLP-Ma 15182.

### **Ecorregiones**

Espinal y Pampa húmeda (Ovando et al., 2019).

### **Lotes identificados**

MLP-Ma 14546, MLP-Ma 14854, MLP-Ma 15159, MLP-Ma 15179, MLP-Ma 15180, MLP-Ma 15181, MLP-Ma 15182.

### **Descripción**

- Población de Córdoba (**Fig. 1.1.9**): conchilla oval-elongada (Breure, 1979), contorno notoriamente más globoso; espira corta, cónica de ápice obtuso; suturas poco profundas bien marcadas; ~6-7 anfractos ligeramente convexos, último ocupa ~60 % de la longitud total y se encuentra atravesado por una línea espiral más clara y notoria que se dirige desde el último punto de la sutura hasta el borde

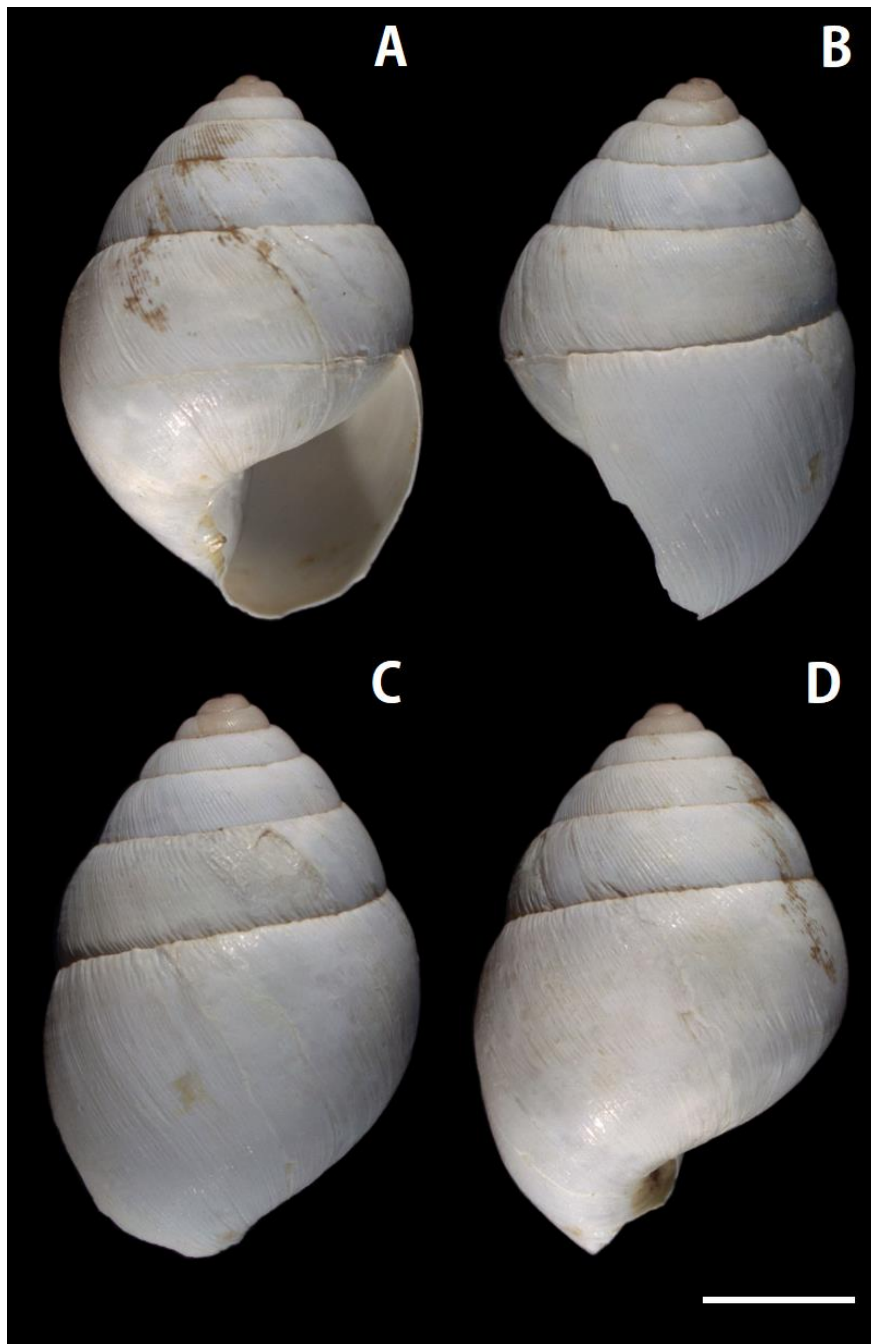
- izquierdo del anfracto; pared columelar reflejada, ombligo abierto y estrecho (**Fig. 1.1.9 A, D**); abertura sub-ovalada, amplia, ligeramente oblicua, ocupa ~50-55 % de la longitud total de la conchilla (**Fig. 1.1.9 A**); peristoma simple, cortante; callo de unión parietal, definido en algunos ejemplares; periostraco ligeramente amarillento a blanquecino; bandas de crecimiento finas pero visibles.
- Población de Buenos Aires (**Fig. 1.1.10**): conchilla oval-elongada, aspecto general sólido; espira y configuración general más elongada; suturas poco profundas bien marcadas; ~6-7 anfractos ligeramente convexos, último ocupa ~55 % de la longitud total, atravesado por una línea espiral más clara que se dirige desde el último punto de la sutura hasta el borde izquierdo del anfracto; pared columelar reflejada, ombligo abierto y estrecho (**Fig. 1.1.10 A, D**); abertura sub-ovalada, amplia, ligeramente oblicua, ocupa ~45-50 % de la longitud total de la conchilla (**Fig. 1.1.10 A**); peristoma simple, cortante; callo de unión parietal, definido en algunos ejemplares; periostraco ligeramente amarillento a blanquecino; bandas de crecimiento finas pero visibles así como las líneas espirales que recorren la teleoconcha (**Fig. 1.1.12**).

Comentario: se observó ombligo ancho en un único ejemplar (MACN-Ma 31422/a). Peristoma en ejemplares de mayor tamaño estrechamente expandido.

La protoconcha (**Fig. 1.1.11 A-B**) consiste en una vuelta y media aproximadamente, con esculturaciones representadas por líneas gruesas a modo de costillas axiales, que discurren de una sutura a la siguiente formando el dibujo en zigzag característico del género. Con la excepción de que dichas líneas se disponen a mayor distancia entre sí (**Fig. 1.1.11 A**) y los ángulos que forman son menos agudos (**Fig. 1.1.11 B**), respecto de las otras especies tratadas. También se aprecia cómo las líneas espirales discurren no sólo a lo largo de la protoconcha (**Fig. 1.1.11**) sino también de la teleoconcha (**Fig. 1.1.12**). El límite entre la protoconcha y la teleoconcha, ubicada a mitad de la segunda vuelta de la espira, está bien marcada por el fin de líneas zigzagueantes y el inicio de líneas de crecimiento rectas y verticales que van de una línea de sutura a la siguiente, a lo largo de ~4<sup>1</sup>/<sub>2</sub>-5<sup>1</sup>/<sub>2</sub> vueltas restantes. Así como también se observan bajo MEB y a lo largo de toda la teleoconcha, las líneas espirales.

**Figura 1.1.9**

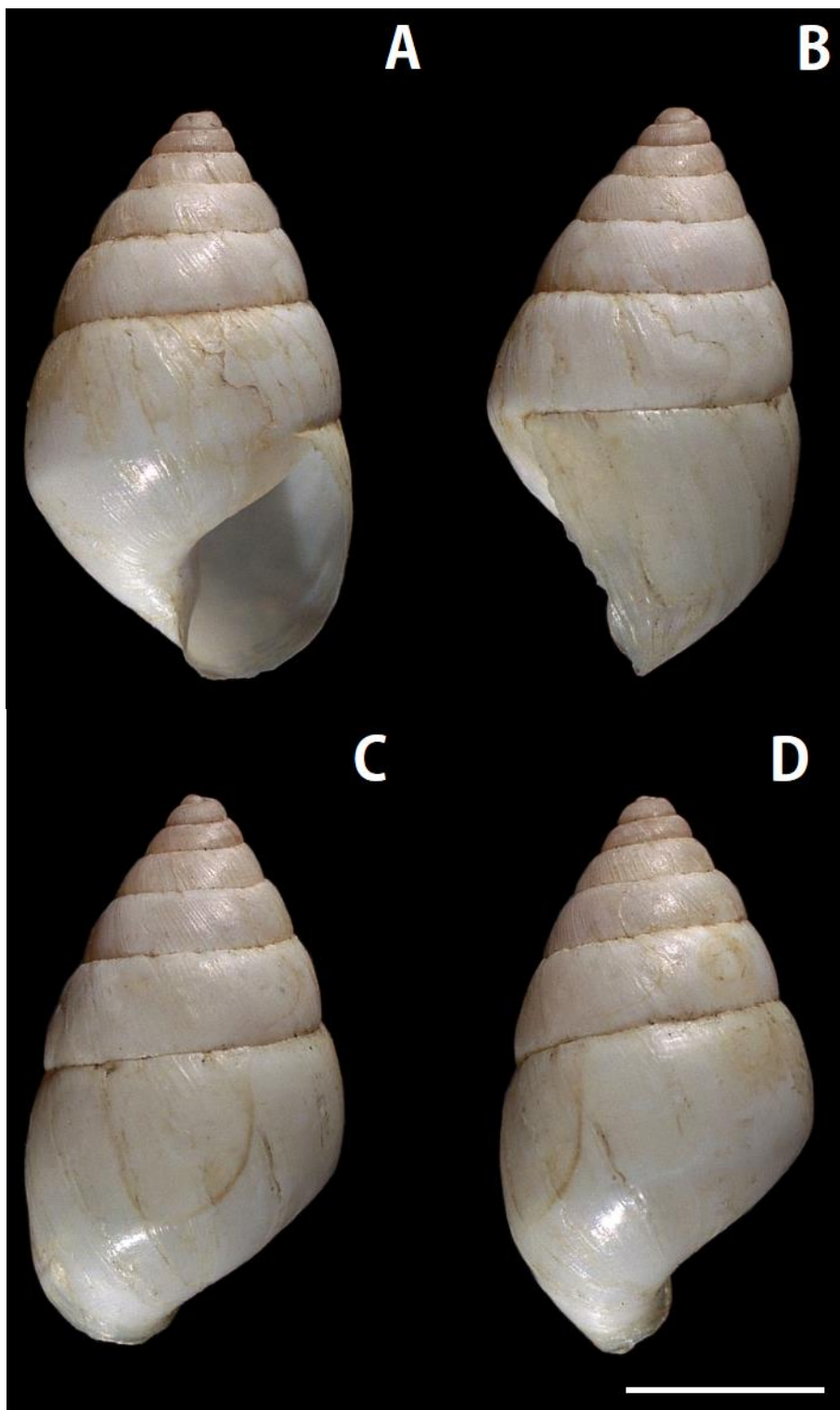
Conchilla adulta de *Bulimulus rushii* procedente de la provincia de Córdoba



A-vista ventral. B- vista lateral derecha. C- vista dorsal. D- vista lateral izquierda. (MLP-Ma 15181/d). Escala: 5 mm.

**Figura 1.1.10**

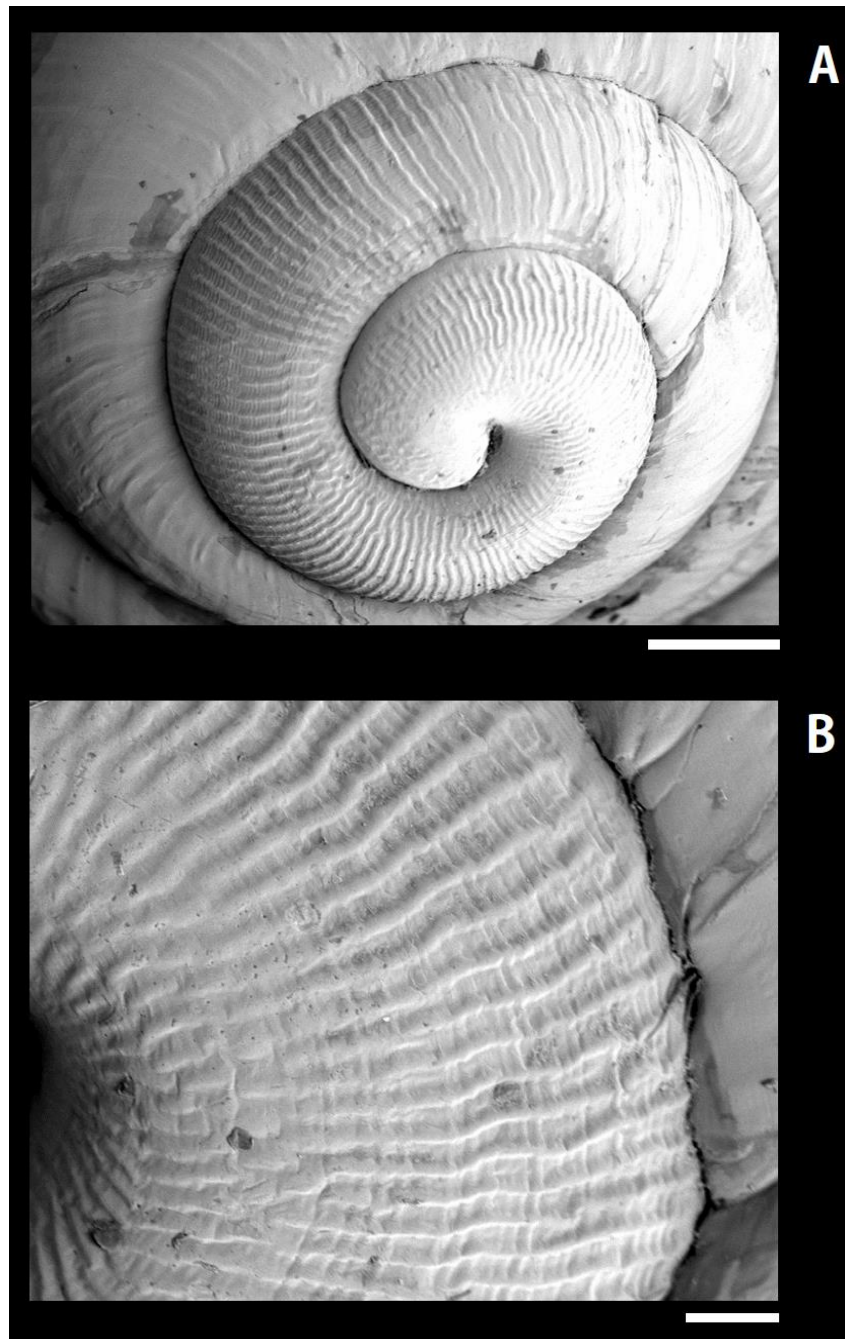
Conchilla adulta de *Bulimulus rushii* procedente de la provincia de Buenos Aires



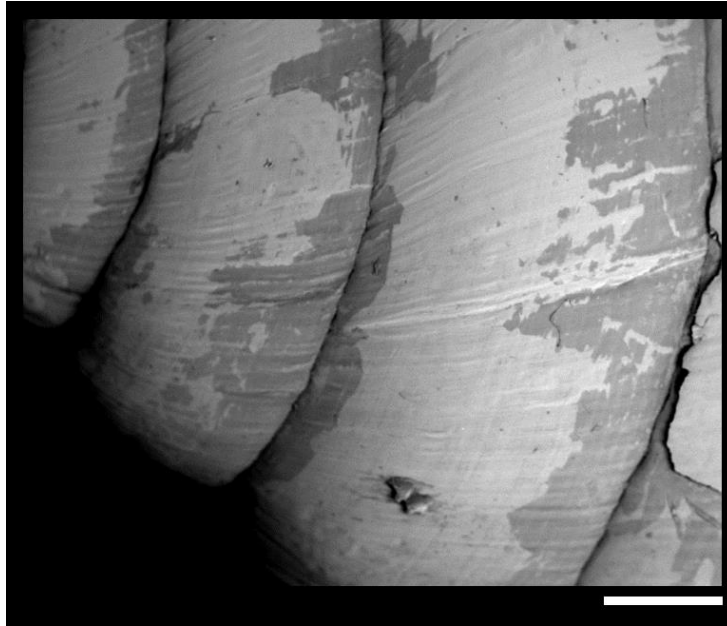
A-vista ventral. B- vista lateral derecha. C- vista dorsal. D- vista lateral izquierda. (MLP-Ma 15159/e). Escala: 5 mm.

**Figura 1.1.11**

*Protoconcha de Bulimulus rushii*



**A**-vista apical. **B**- detalle de la primera vuelta embrionaria. (MLP-Ma 14546).  
Escala: A= 500  $\mu$ m, B= 100  $\mu$ m

**Figura 1.1.12***Conchilla de Bulimulus rushii*

Detalle de la segunda, tercer y cuarta vuelta mostrando las bandas de crecimiento y líneas en espiral. (MLP-Ma 14546). Escala: 1 mm.

**Bulimulus vesicalis (Pfeiffer, 1853)****Sinonimia**

*Bulimus vesicalis* Pfeiffer, 1853: 654; Küster y Pfeiffer, 1840-1865: 261, pl. 70, fig. 23-24.

*Bulimulus (Bulimulus) vesicalis* Pilsbry, 1897-1898: 69, pl. 12, fig. 42; Parodiz, 1946: 315.

*Bulimulus vesicalis*: Breure, 1978: 149; Cuezso et al., 2013: 153; Simone, 2006: 121.

*Bulimulus vesicalis vesicalis*: Miquel, 1991: 97, fig. 6.

**Localidad tipo**

Brasilia, Brasil (Pfeiffer, 1853).

**Material tipo**

Lectotipo NHMUK 1975395 (1 ejemplar), The Natural History Museum (NHMUK), London, United Kingdom.

Paralectotipo NHMUK 1975392 (2 ejemplares), The Natural History Museum (NHMUK), London, United Kingdom.

### **Distribución**

Brasil, Uruguay y Argentina: Buenos Aires, Entre Ríos y Santa Fe. Miquel (1991) la cita en Argentina también para la provincia de Santa Fe; no obstante, dicho material colectado e identificado por la Dra. Hylton Scott no figuraba en los números de ninguna Colección. Sin embargo, fue hallado junto al personal encargado de la Colección Malacológica en el MLP y se ingresó a la misma bajo el número MLP-Ma 14685.

### **Ecorregiones**

Espinal y Pampa húmeda (Ovando et al., 2019).

### **Lotes identificados**

MLP-Ma 14685, MLP-Ma 14686, MLP-Ma 15157.

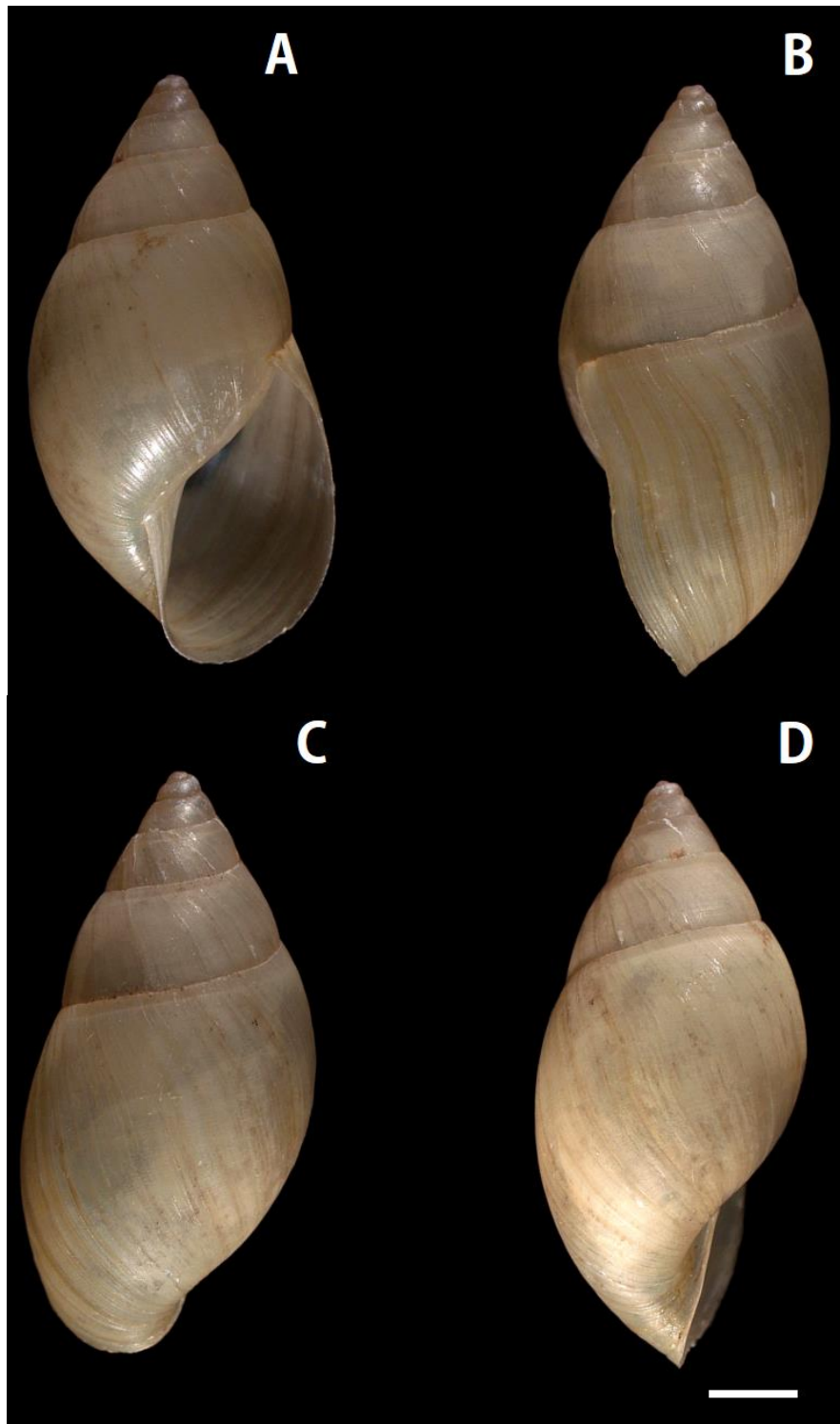
### **Descripción**

Conchilla oval-elongada (**Fig. 1.1.13**); espira cónica de mediano desarrollo ocupando menos de  $1/3$  de la longitud total; sutura bien marcada pero de poca profundidad;  $\sim 5$  a 7 anfractos planos a ligeramente convexos, el último ocupa más del 60 % de la longitud total; borde columelar reflejado cubriendo el ombligo en vista ventral, ombligo angosto (**Fig. 1.1.13 A**) pero visible en vista lateral izquierda (**Fig. 1.1.13 D**); abertura oval-elongada, amplia, ocupa el 50 % de la longitud total de la conchilla; peristoma simple, en algunos ejemplares estrechamente expandido; callo claro y visible en la mayoría de los casos (**Fig. 1.1.13 A**). En cuanto a la coloración de la conchilla es castaño claro con suaves bandas de crecimiento más oscuras apreciables a simple vista (**Fig. 1.1.13**) y líneas que la recorren en espirales (**Fig. 1.1.14 B**).

La protoconcha (**Fig. 1.1.14 A-B**) también consiste en una vuelta y media aproximadamente, con esculturaciones típicas constituidas por pequeñas depresiones dando un aspecto reticulado y líneas que conforman un patrón en zigzag siguiendo un recorrido que va de sutura a sutura. El límite entre la protoconcha y la teleoconcha, ubicado a mitad de la segunda vuelta de la espira, se presenta bien definido por la presencia de líneas de crecimiento verticales que van de una línea de sutura a la siguiente lo cual se manifiesta a lo largo de toda la teleoconcha, en las  $\sim 3^{1/2}$ - $5^{1/2}$  vueltas restantes.

**Figura 1.1.13**

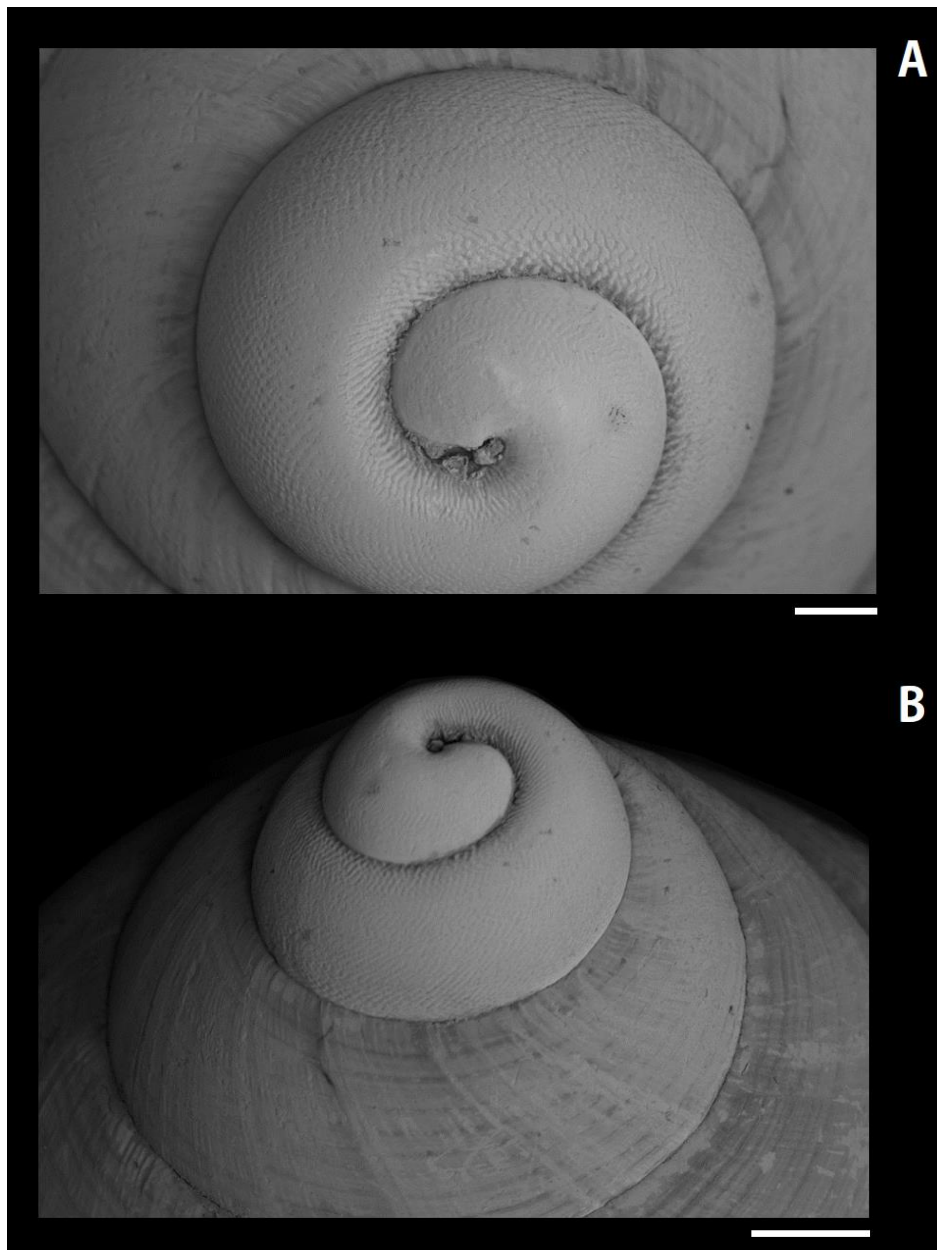
Conchilla adulta de *Bulimulus vesicalis*



A-vista ventral. B- vista lateral derecha. C- vista dorsal. D- vista lateral izquierda. (MLP-Ma 15157). Escala: 5 mm.

**Figura 1.1.14**

*Protoconcha de Bulimulus vesicalis*



**A**-vista apical. **B**- vista lateral. (MLP-Ma 14685/l). Escala: A= 200  $\mu$ m, B= 500  $\mu$ m

### 1.1.C.1.b. Análisis morfométrico

Con el objetivo de continuar la diferenciación de las tres entidades identificadas mediante el análisis cualitativo, se realizó un abordaje morfométrico de la conchilla debido a que es la fuente de caracteres más clásicamente utilizada para la identificación. En la **Tabla 1.1.2** se indica el lote y ejemplar de cada entidad seleccionado para el desarrollo del análisis morfométrico, a cada uno de los cuales se le asignó un número arábigo para facilitar la visualización en la representación del ACP y AD. El número de ejemplares estudiados e identificados como *B. bonariensis* fue de 60, *B. rushii* 43 y 28 ejemplares fueron identificados como *B. vesicalis*. En la **Tabla 1.1.3** se dan los valores promedios, desvío estándar, valores mínimos y máximos para cada variable cuantitativa continua medida en las tres entidades identificadas.

**Tabla 1.1.2**

*Lotes y ejemplares seleccionados para el análisis morfométrico*

Nº	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	Nº	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	Nº	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR
	<b><i>B. bonariensis</i></b>	46	MLP-Ma 15184/f	89	MLP-Ma 14854/g
1	MLP-Ma 14630/a	47	MLP-Ma 15184/g	90	MLP-Ma 15159/a
2	MLP-Ma 15167	48	MLP-Ma 14643	91	MLP-Ma 15159/b
3	MLP-Ma 15169/f	49	MLP-Ma 14445/b	92	MLP-Ma 15159/c
4	MLP-Ma 15166	50	MLP-Ma 14455/a	93	MLP-Ma 15159/d
5	MLP-Ma 15168/b <sup>Ⓟ</sup>	51	MLP-Ma 14544/e	94	MLP-Ma 15159/e
6	MLP-Ma 15168/c	52	MLP-Ma 15188/a	95	MLP-Ma 15159/f
7	MLP-Ma 15168/d <sup>Ⓟ</sup>	53	MLP-Ma 15188/b	96	MLP-Ma 15159/g
8	MLP-Ma 15169/a	54	MLP-Ma 15188/d <sup>Ⓟ</sup>	97	MLP-Ma 15159/h
9	MLP-Ma 15169/b	55	MLP-Ma 15188/e	98	MLP-Ma 15159/i
10	MLP-Ma 15169/c	56	MLP-Ma 15188/c	99	MLP-Ma 15159/j
11	MLP-Ma 15169/d	57	MLP-Ma 14522/a	100	MLP-Ma 15159/k
12	MLP-Ma 15169/e	58	NHMUK 1975401	101	MLP-Ma 14546 <sup>Ⓟ</sup>
13	MLP-Ma 15160/a	59	NHMUK1854.12.4.160	102	MACN-In 31422/a
14	MLP-Ma 15160/b	60	NHMUK 1854.12.4.158	103	MACN-In 31422/b
15	MLP-Ma 14629/a				
16	MLP-Ma 14629/b	Nº	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	Nº	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR
17	MLP-Ma 14629/d		<b><i>B. rushii</i></b>		<b><i>B. vesicalis</i></b>
18	MLP-Ma 14629/e	61	ANSP 70382	104	MLP-Ma 14685/a
19	MLP-Ma 14629/f	62	MLP-Ma 15179/a	105	MLP-Ma 14685/b
20	MLP-Ma 15178/a	63	MLP-Ma 15182	106	MLP-Ma 14685/c
21	MLP-Ma 15178/b	64	MLP-Ma 15180	107	MLP-Ma 14685/d
22	MLP-Ma 15178/c	65	MLP-Ma 15181/a <sup>Ⓟ</sup>	108	MLP-Ma 14685/e
23	MLP-Ma 15178/d	66	MLP-Ma 15181/b	109	MLP-Ma 14685/f
24	MLP-Ma 15178/e	67	MLP-Ma 15181/c	110	MLP-Ma 14685/g
25	MLP-Ma 15183/a	68	MLP-Ma 15181/d	111	MLP-Ma 14685/h
26	MLP-Ma 15183/b	69	MLP-Ma 15181/e	112	MLP-Ma 14685/i
27	MLP-Ma 15183/c	70	MLP-Ma 15181/f	113	MLP-Ma 14685/j
28	MLP-Ma 15186/a	71	MLP-Ma 15181/g	114	MLP-Ma 14685/k
29	MLP-Ma 15186/b	72	MLP-Ma 15181/h	115	MLP-Ma 14685/l <sup>Ⓟ</sup>
30	MLP-Ma 15186/c	73	MLP-Ma 15181/i	116	MLP-Ma 14685/m

Continuación **Tabla 1.1.2**

31	MLP-Ma 14825/b	74	MLP-Ma 15181/j	117	MLP-Ma 14685/n
32	MLP-Ma 14825/c	75	MLP-Ma 15181/k	118	MLP-Ma 14685/ñ
33	MLP-Ma 14825/d	76	MLP-Ma 15181/l	119	MLP-Ma 14686/a
34	MLP-Ma 14825/e	77	MLP-Ma 15181/m	120	MLP-Ma 14686/b
35	MLP-Ma 14825/f	78	MLP-Ma 15181/n	121	MLP-Ma 14686/c
36	MLP-Ma 14825/g	79	MLP-Ma 15181/ñ	122	MLP-Ma 14686/d
37	IBS-Ma 486	80	MLP-Ma 15181/o	123	MLP-Ma 14686/e
38	IBS-Ma 362-2	81	MLP-Ma 15181/p	124	MLP-Ma 14686/f
39	IBS-Ma 362-3	82	MLP-Ma 15181/q	125	MLP-Ma 14686/g
40	IBS-Ma 393	83	MLP-Ma 14854/a	126	MLP-Ma 14686/h
41	MLP-Ma 15184/a <sup>Ⓟ</sup>	84	MLP-Ma 14854/c	127	MLP-Ma 14686/i
42	MLP-Ma 15184/b	85	MLP-Ma 14854/b	128	NHMUK 1975395
43	MLP-Ma 15184/c	86	MLP-Ma 14854/d	129	NHMUK 1975396/a
44	MLP-Ma 15184/d	87	MLP-Ma 14854/e	130	NHMUK 1975396/b
45	MLP-Ma 15184/e	88	MLP-Ma 14854/f	131	MLP-Ma 15157/a

Bajo el símbolo <sup>Ⓟ</sup> se denotan aquellos ejemplares que fueron fotografiados bajo MEB para caracterizar la protoconcha.

**Tabla 1.1.3***Resumen de valores de cada variable en las especies estudiadas*

VARIABLE	<i>B. bonariensis</i>	<i>B. rushii</i>	<i>B. vesicalis</i>
<b>LT</b>	22,93±4,87 (13,03-38,74)	16,38±2,91 (10,89-28,26)	21,63±3,75 (13,72-28,7)
<b>LE</b>	8,1±2 (3,89-14,47)	6,24±0,92 (4,3-9,05)	6,71±1,34 (4,02-9,53)
<b>LPV</b>	2,89±0,72 (1,37-5,15)	2,17±0,65 (1,54-5,49)	2,58±0,54 (1,51-3,56)
<b>LUA</b>	16,34±3,26 (9,97-25,53)	12,12±2,41 (7,89-21,73)	16,46±2,59 (11,01-20,6)
<b>LA</b>	11,6±2,08 (7,31-16,6)	9,35±1,62 (6,47-14,89)	12,07±1,56 (8,73-14,41)
<b>AA</b>	5,95±0,97 (3,85-7,78)	5,22±0,8 (4,08-8,48)	6,06±0,61 (4,92-6,89)
<b>APV</b>	7,29±1,42 (4,22-10,7)	7,85±0,95 (5,56-9,54)	7,11±1,22 (4,63-9,31)
<b>LEP</b>	5,79±0,92 (3,7-7,88)	5,64±0,95 (3,77-7,05)	5,77±0,85 (4,23-7,86)
<b>DMA</b>	11,27±1,88 (7,45-15,14)	11,2±1,41 (8,4-15,74)	11,37±1,28 (8,93-13,14)
<b>DME</b>	10,16±1,71 (6,68-14,24)	10,62±1,42 (7,91-15,03)	10,24±1,27 (7,61-12,43)

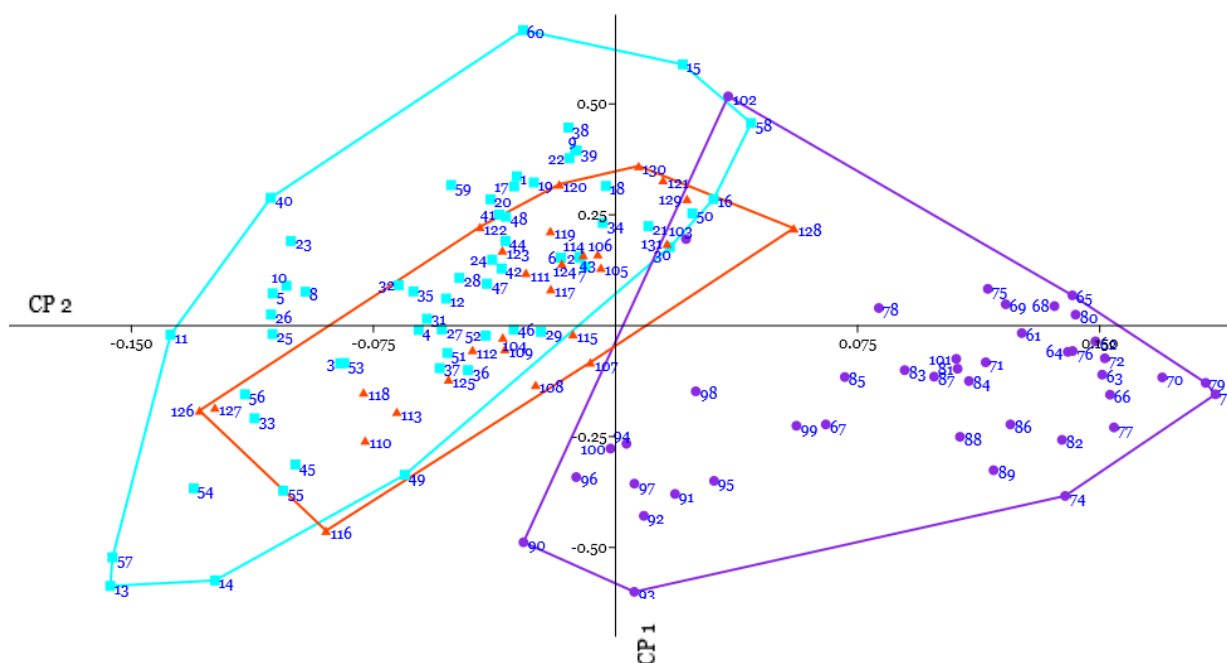
Se indica el promedio de cada variable seguida del desvío estandar junto al valor mínimo y máximo tomado. Los valores estan expresados en mm.

*Abreviaturas:* ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

En la **Figura 1.1.15** se ilustra como se disponen los ejemplares de las tres entidades, en el plano de las dos primeras componentes principales (1 y 2), que fueron las que explicaron el 89,9 % de la varianza total. El primer componente (CP1) acumuló el 81,17 % de la variación y la variable que mejor la explicó fue la longitud de la penúltima vuelta (LPV) (**Tabla 1.1.4**) aunque también mostraron un gran aporte las variables, longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA), y la longitud de la espira (LE). Respecto del segundo componente (CP2), acumuló el 8,73 % de la variación total y las variables que mejor la explicaron fue en primer lugar el ancho de la penúltima vuelta (APV) y el diámetro menor (DME) (**Tabla 1.1.4**), también fueron importantes los aportes de las variables longitud del espacio parietal (LEP) y diámetro mayor (DMA). (Las variables con mayor aporte de aquí en adelante se indican en cada tabla resaltadas en formato de letra negra).

**Figura 1.1.15**

*Representación gráfica de los componentes principales 1 y 2 en B. bonariensis, B. rushii y B. vesicalis*



Referencias: ■ *B. bonariensis* (ejemplares 1-60), ● *B. rushii* (ejemplares 61-103), ▲ *B. vesicalis* (ejemplares 104-131). Componente principal 1 (CP1); Componente Principal 2 (CP2).

**Tabla 1.1.4**

*Aporte de las variables al ACP de B. bonariensis, B. rushii y B. vesicalis*

Variable	CP1	CP2
<b>LT</b>	<b>0,4034</b>	-0,3047
<b>LE</b>	<b>0,3733</b>	-0,1148
<b>LPV</b>	<b>0,4406</b>	-0,2046
<b>LUA</b>	<b>0,3866</b>	-0,2619
<b>LA</b>	0,3244	-0,111
<b>AA</b>	0,249	0,0823
<b>APV</b>	0,2296	<b>0,5528</b>
<b>LEP</b>	0,2071	<b>0,3873</b>
<b>DMA</b>	0,2170	<b>0,3375</b>
<b>DME</b>	0,2092	<b>0,4412</b>

Se indica el aporte de cada variable a los componentes principales 1 y 2 (CP1-CP2).

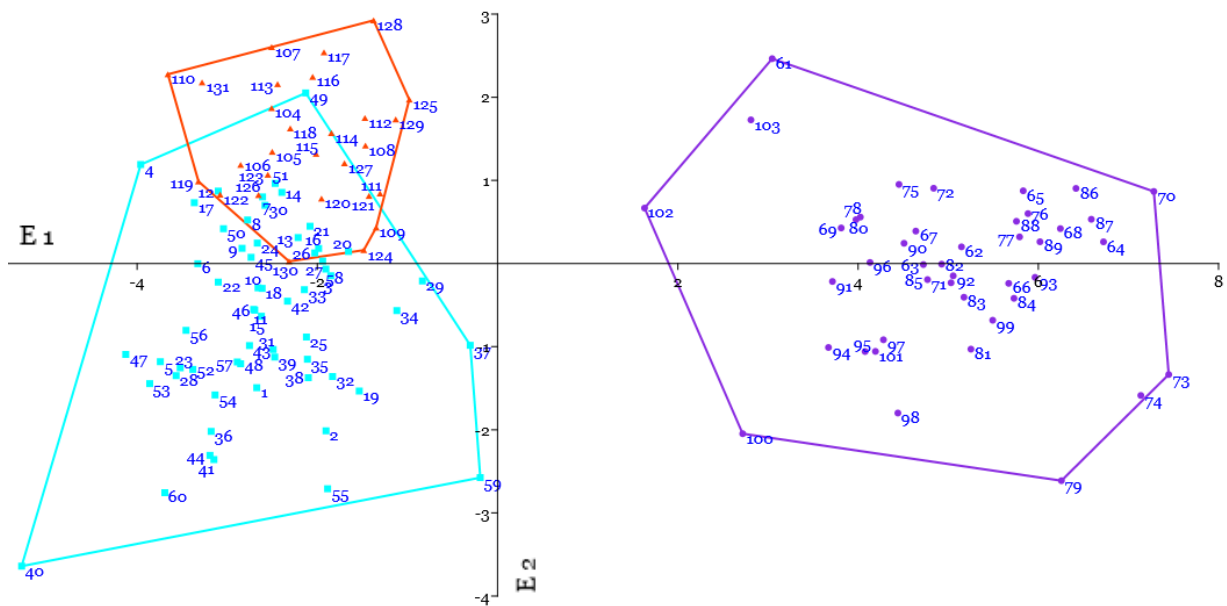
*Abreviaturas:* ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

El MANOVA para poner a prueba la separación de las tres especies fue significativo ( $\lambda$  de Wilks=0,0424;  $F_{(20,228)}=43,97$ ;  $p<0,001$ ). Posteriormente, para maximizar la separación de los grupos se realizó un análisis discriminante (AD), la representación gráfica del mismo corresponde a la **Figura 1.1.16**. El eje 1 (E1) resultó en la acumulación del 95,06 % de la variación total, donde las variables que más aportaron fueron la longitud total (LT), el diámetro menor (DME) y el ancho de la penúltima vuelta (APV) respectivamente (**Tabla 1.1.5**). En relación al eje 2 (E2), acumuló el 4,935 % de la variación, las variables que más contribuyeron fueron la longitud de la abertura (LA) y la longitud total (LT) (**Tabla 1.1.5**).

Del AD, el 90,84 % de los individuos fueron correctamente asignados a una especie. *B. bonariensis* obtuvo un 83,33 % (50 ejemplares) de asignación correcta, pudiendo ser identificado erróneamente como *B. vesicalis* (10 ejemplares). *B. vesicalis* obtuvo un 92,86 % (26 ejemplares) de asignación correcta, pudiendo ser identificado erróneamente como *B. bonariensis* (2 ejemplares). Sin embargo, *B. rushii* obtuvo el 100 % de asignación correcta de sus ejemplares.

**Figura 1.1.16**

Representación del análisis discriminante en *B. bonariensis*, *B. rushii* y *B. vesicalis*



Referencias: ■ *B. bonariensis* (ejemplares 1-60), ● *B. rushii* (ejemplares 61-103), ▲ *B. vesicalis* (ejemplares 104-131). Eje 1 (E1); Eje 2 (E2).

**Tabla 1.1.5**

Aporte de las variables al AD de *B. bonariensis*, *B. rushii* y *B. vesicalis*

Variable	E1	E2
<b>LT</b>	<b>-46,611</b>	<b>21,911</b>
LE	-1,6519	12,81
LPV	7,3758	-1,6188
LUA	5,9512	9,9771
<b>LA</b>	-1,6376	<b>32,098</b>
AA	-10,599	8,5919
<b>APV</b>	<b>23,315</b>	16,456
LEP	-3,3117	-8,5139
<b>DMA</b>	-4,8495	-17,069
<b>DME</b>	<b>34,348</b>	-3,673

Se indica el aporte de cada variable a los ejes 1 y 2 (E1-E2).

Abreviaturas: ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

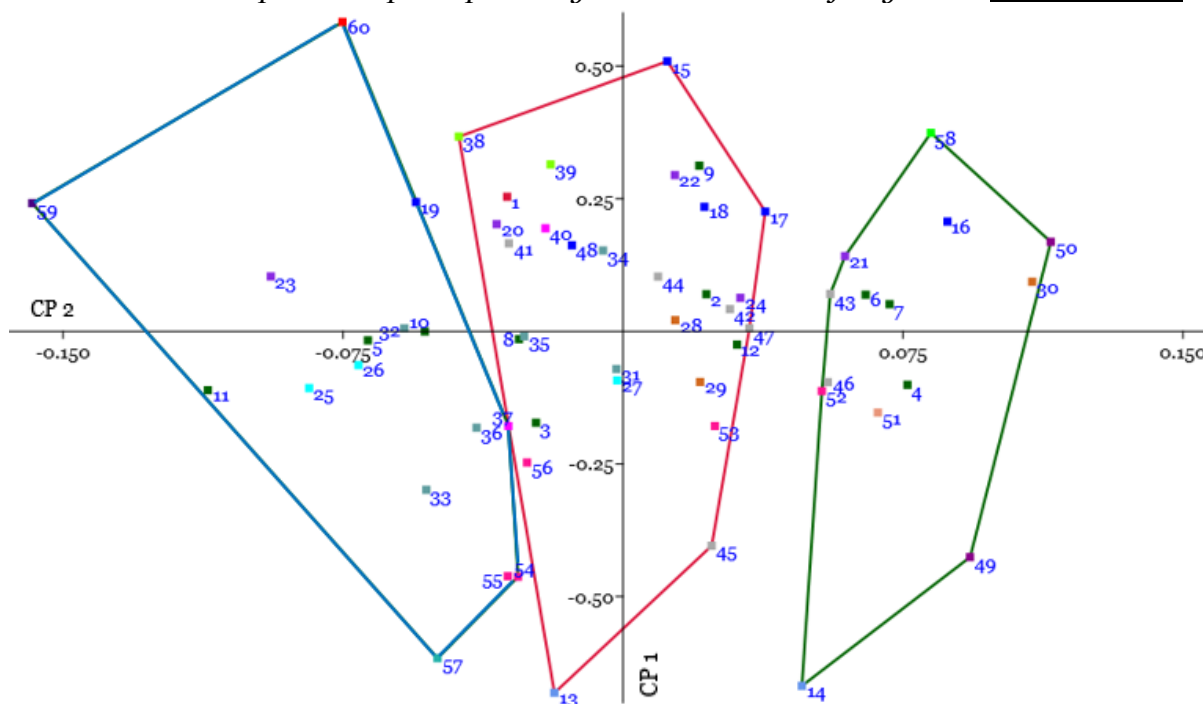
Dada la variabilidad intraespecífica observada en *B. bonariensis* y *B. rushii* y que se ven representadas en las **Figuras 1.1.4, 1.1.5, 1.1.6** y **Figuras 1.1.9, 1.1.10** respectivamente. Fue necesario realizar un análisis de componentes principales y discriminante en *B. bonariensis* para poder demostrar las diferencias observadas en las tres morfologías de conchilla encontradas. Por otro lado, también se realizó un ACP y un AD entre *B. vesicalis* y *B. bonariensis* para poner en manifiesto ciertas semejanzas conquiolares. Respecto de *B. rushii* se llevó adelante un ACP para analizar la variabilidad intraespecífica considerando a la población de Córdoba y la distribuida en Buenos Aires. Además, los ACP y AD permitieron, en cada caso, identificar las variables que más aportan a la variación, apreciable desde lo cualitativo.

Por lo antes expuesto continuamos con el ACP en *B. bonariensis*, considerando la localidad de cada lote, la **Figura 1.1.17** ilustra que quedan bien representadas las tres morfologías encontradas “A”, “B” y “C” (**Fig. 1.1.4, Fig. 1.1.5 y Fig. 1.1.6**). En este caso el primer componente (CP1) acumuló el 90,53 % de la variación total y las variables que más contribuyeron fueron la longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud de la espira (LE), la longitud total (LT), longitud de la abertura (LA), diámetro menor (DME) y diámetro mayor (DMA) (**Tabla 1.1.6**). En el segundo componente (CP2) con el 4,06 % de la variación, las variables que más aportaron fueron la longitud de la espira (LE) seguida de la longitud de la penúltima vuelta (LPV) y longitud de la abertura (LA) (**Tabla 1.1.6**). Con el fin de maximizar la separación observada en el ACP se presenta en la **Figura 1.1.18** el AD de *B. bonariensis*, donde se presentan las tres morfologías y las localidades de procedencia; el eje 1 (E1) resultó en la acumulación del 95,91 % de la variación total, donde las variables que más aportaron fueron el ancho de la abertura (AA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP) y diámetro mayor (DMA) (**Tabla 1.1.7**). En relación al eje 2 (E2), acumuló el 4,094 % de la variación y las variables que más contribuyeron fueron el diámetro mayor (DMA), la longitud total (LT), diámetro menor (DME), la longitud de la espira (LE) y la longitud del último anfracto (LUA) (**Tabla 1.1.7**). En el AD, el 100 % de los individuos clasificados bajo la morfología conquiolar “B” y “C” fueron correctamente asignados. Sin embargo, de los 30 ejemplares identificados con la morfología “A” el porcentaje de asignación correcta fue del 86,6 %, pudiendo ser identificado erróneamente como “B” (1 ejemplar), o como “C” (3 ejemplares).

En la **Tabla 1.1.8** se presenta un resumen de las morfologías conquiolares encontradas en *B. bonariensis*, las cuales fueron definidas mediante comparación con las morfologías encontradas **Figuras 1.1.2, 1.1.3 y 1.1.4** y en función de la ubicación en la representación del ACP.

**Figura 1.1.17**

*Análisis de componentes principales 1 y 2 en las tres morfologías de B. bonariensis*



*Referencias:* *B. bonariensis* morfologías “A”, línea roja; “B”, línea azul y “C”, línea verde. Localidades ■ Los Toldos/Bs. As. (1), ■ Florencio Varela/Bs. As. (2-12), ■ Chascomús/ Bs. As. (13-14), ■ La Plata/ Bs. As. (15-19), ■ Resistencia/Chaco (20-24), ■ Miramar/Córdoba (25-27), ■ Mercedes/Corrientes (28-30), ■ Ituzaingo/Corrientes (31-36), ■ Posadas/Misiones (37/40), ■ Avellaneda/Santa Fé (38-39), ■ Villa del Dique /Córdoba (41-47), ■ La Plata/Bs. As. (48), ■ Quilmes/Bs. As. (49-50), ■ Larroque/Entre Ríos (49-50), ■ Larroque/ Entre Ríos (52-56), ■ V. General Belgrano/Córdoba (57), ■ NHMUK 1975401 (58), ■ NHMUK1854.12.4.160 (59), ■ NHMUK 1854.12.4.158 (60). Componente principal 1 (CP1); Componente Principal 2 (CP2).

**Tabla 1.1.6**

*Aporte de las variables al ACP en las tres morfologías de B. bonariensis*

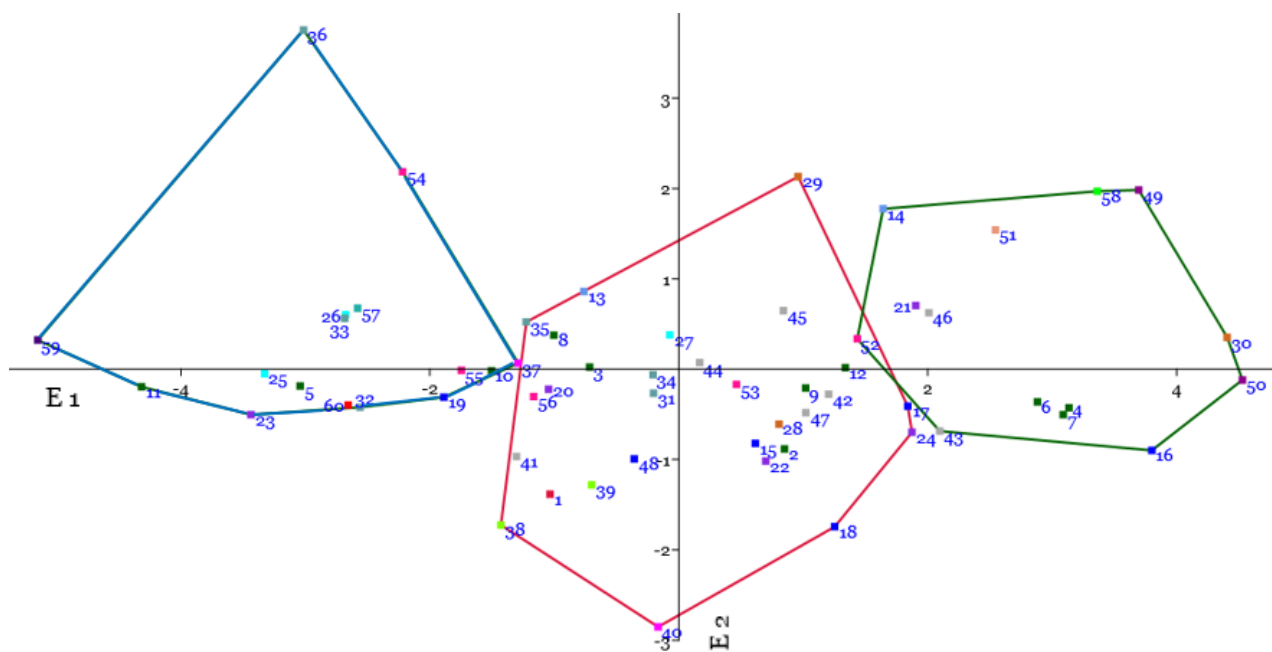
Variable	CP1	CP2
LT	<b>0,3506</b>	-0,1191
LE	<b>0,4025</b>	<b>-0,4709</b>
LPV	<b>0,4098</b>	<b>-0,3554</b>
LUA	<b>0,3285</b>	0,0726
LA	<b>0,2878</b>	<b>0,2308</b>
AA	0,1562	0,1389
APV	0,1208	-0,0806
LEP	0,0005	0,0711
DMA	<b>0,2691</b>	0,1992
DME	<b>0,2717</b>	0,1180

Se indica el aporte de cada variable a los componentes principales 1 y 2 (CP1-CP2).

*Abreviaturas:* ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

**Figura 1.1.18**

*Análisis discriminante en las tres morfologías de B. bonariensis*



Referencias: *B. bonariensis* morfologías “A”, línea roja; “B”, línea azul y “C”, línea verde. Localidades ■ Los Toldos/Bs. As. (1), ■ Florencio Varela/Bs. As. (2-12), ■ Chascomús/ Bs. As. (13-14), ■ La Plata/ Bs. As. (15-19), ■ Resistencia/Chaco (20-24), ■ Miramar/Córdoba (25-27), ■ Mercedes/Corrientes (28-30), ■ Ituzaingo/Corrientes (31-36), ■ Posadas/Misiones (37/40), ■ Avellaneda/Santa Fé (38-39), ■ Villa del Dique/Córdoba (41-47), ■ La Plata/Bs. As. (48), ■ Quilmes/Bs. As. (49-50), ■ Larroque/Entre Ríos (49-50), ■ Larroque/ Entre Ríos (52-56), ■ V. General Belgrano/Córdoba (57), ■ NHMUK 1975401 (58), ■ NHMUK1854.12.4.160 (59), ■ NHMUK 1854.12.4.158 (60). Eje 1 (E1); Eje 2 (E2).

**Tabla 1.1.7**

*Aporte de las variables al AD en las tres morfologías de B. bonariensis*

Variable	E1	EP2
LT	-12,619	<b>37,527</b>
LE	<b>-19,112</b>	<b>-30,785</b>
LPV	-10,167	5,0903
LUA	11,263	<b>-29,174</b>
LA	3,674	7,7193
AA	<b>22,807</b>	-6,2808
APV	-5,7013	13,966
LEP	<b>16,739</b>	3,0031
DMA	<b>12,802</b>	<b>-39,961</b>
DME	5,6532	<b>35,264</b>

Se indica el aporte de cada variable a los ejes 1 y 2 (E1-E2).

Abreviaturas: ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

**Tabla 1.1.8**

Resumen de las morfologías conquiolares encontradas en *B. bonariensis*

Nº	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	M	LOCALIDAD/ PROVINCIA	Nº	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	M	LOCALIDAD/ PROVINCIA
1	MLP-Ma 14630/a	A	Los Toldos/Bs. As.	31	MLP-Ma 14825/b	A	Ituzaingó/Corrientes
2	MLP-Ma 15167	A	Fcio. Varela/Bs. As	32	MLP-Ma 14825/c	B	Ituzaingó/Corrientes
3	MLP-Ma 15169/f	A	Fcio. Varela/Bs. As	33	MLP-Ma 14825/d	B	Ituzaingó/Corrientes
4	MLP-Ma 15166	C	Fcio. Varela/Bs. As	34	MLP-Ma 14825/e	A	Ituzaingó/Corrientes
5	MLP-Ma 15168/b	B	Fcio. Varela/Bs. As	35	MLP-Ma 14825/f	A	Ituzaingó/Corrientes
6	MLP-Ma 15168/c	C	Fcio. Varela/Bs. As	36	MLP-Ma 14825/g	B	Ituzaingó/Corrientes
7	MLP-Ma 15168/d	C	Fcio. Varela/Bs. As	37	IBS-Ma 486	B	Posadas/Misiones
8	MLP-Ma 15169/a	A	Fcio. Varela/Bs. As	38	IBS-Ma 362-2	A	Avellaneda/Santa Fé
9	MLP-Ma 15169/b	A	Fcio. Varela/Bs. As	39	IBS-Ma 362-3	A	Avellaneda/Santa Fé
10	MLP-Ma 15169/c	B	Fcio. Varela/Bs. As	40	IBS-Ma 393	A	Posadas/Misiones
11	MLP-Ma 15169/d	B	Fcio. Varela/Bs. As	41	MLP-Ma 15184/a	A	V. del Dique/Córdoba
12	MLP-Ma 15169/e	A	Fcio. Varela/Bs. As	42	MLP-Ma 15184/b	A	V. del Dique/Córdoba
13	MLP-Ma 15160/a	A	Chascomús/Bs. As.	43	MLP-Ma 15184/c	C	V. del Dique/Córdoba
14	MLP-Ma 15160/b	C	Chascomús/Bs. As.	44	MLP-Ma 15184/d	A	V. del Dique/Córdoba
15	MLP-Ma 14629/a	A	La Plata/Bs. As.	45	MLP-Ma 15184/e	A	V. del Dique/Córdoba
16	MLP-Ma 14629/b	C	La Plata/Bs. As.	46	MLP-Ma 15184/f	C	V. del Dique/Córdoba
17	MLP-Ma 14629/d	A	La Plata/Bs. As.	47	MLP-Ma 15184/g	A	V. del Dique/Córdoba
18	MLP-Ma 14629/e	A	La Plata/Bs. As.	48	MLP-Ma 14643	A	La Plata/Bs. As.
19	MLP-Ma 14629/f	B	La Plata/Bs. As.	49	MLP-Ma 14445/b	C	Quilmes /Bs. As.
20	MLP-Ma 15178/a	A	Resistencia/Chaco	50	MLP-Ma 14455/a	C	Quilmes /Bs. As.
21	MLP-Ma 15178/b	C	Resistencia/Chaco	51	MLP-Ma 14544/e	C	Larroque/Entre Ríos
22	MLP-Ma 15178/c	A	Resistencia/Chaco	52	MLP-Ma 15188/a	C	Larroque/Entre Ríos
23	MLP-Ma 15178/d	B	Resistencia/Chaco	53	MLP-Ma 15188/b	A	Larroque/Entre Ríos
24	MLP-Ma 15178/e	A	Resistencia/Chaco	54	MLP-Ma 15188/d	B	Larroque/Entre Ríos
25	MLP-Ma 15183/a	B	Miramar/Córdoba	55	MLP-Ma 15188/e	B	Larroque/Entre Ríos
26	MLP-Ma 15183/b	B	Miramar/Córdoba	56	MLP-Ma 15188/c	A	Larroque/Entre Ríos
27	MLP-Ma 15183/c	A	Miramar/Córdoba	57	MLP-Ma 14522/a	B	V. Gral. Belgrano/Córdoba
28	MLP-Ma 15186/a	A	Mercedes/Corrientes	58	NHMUK 1975401	C	
29	MLP-Ma 15186/b	A	Mercedes/Corrientes	59	NHMUK 1854.12.4.160	B	
30	MLP-Ma 15186/c	C	Mercedes/Corrientes	60	NHMUK 1854.12.4.158	B	

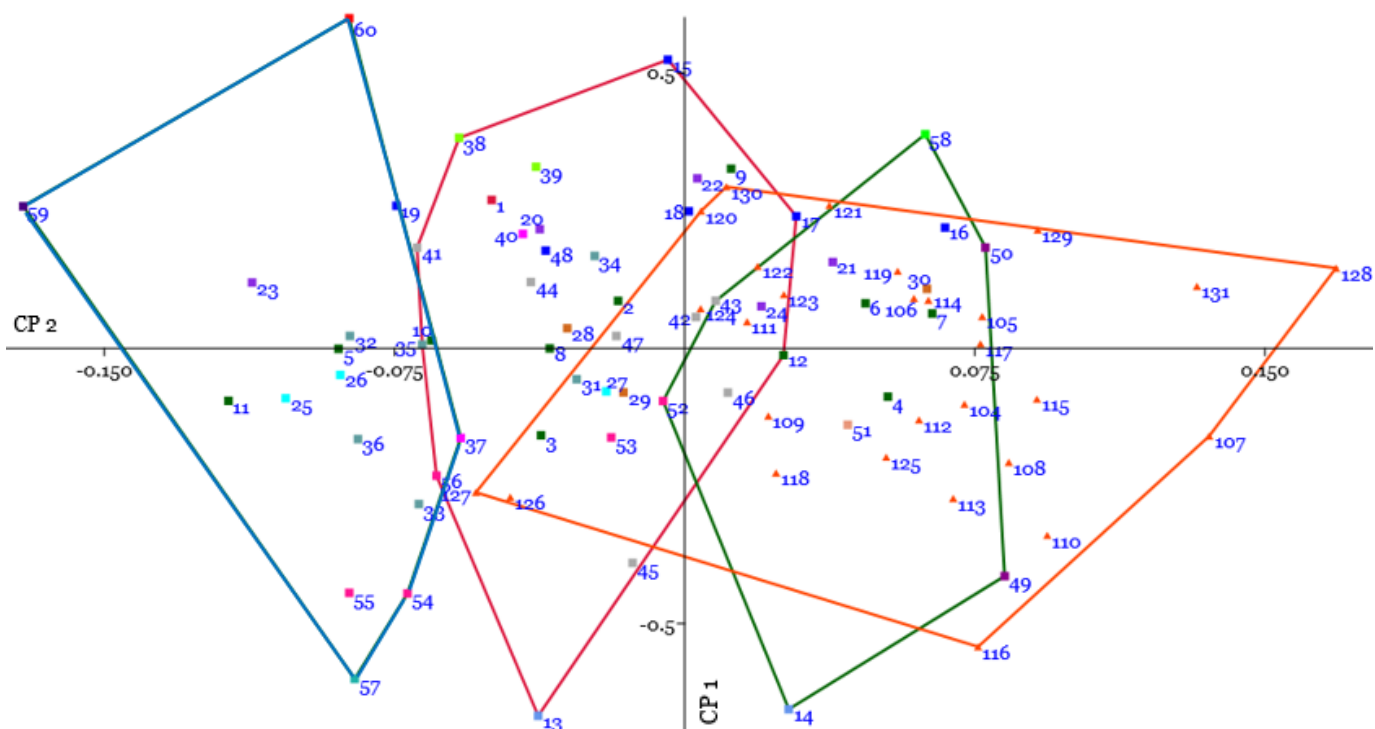
Con la letra “M” se indica el tipo de morfología conquiolar “A”, “B” o “C” asignada a cada ejemplar en comparación con los individuos de las **Figuras 1.1.2, 1.1.3 y 1.1.4** y mediante el ACP de la **Figura 1.1.17**.

A continuación y a los fines de comprender la semejanza en la forma conquiolar de *B. vesicalis* y *B. bonariensis* se añadió al ACP de *B. bonariensis* la dispersión de los ejemplares pertenecientes a *B. vesicalis*. En la **Figura 1.1.19** se observa que algunos ejemplares de *B. vesicalis* tienen una configuración semejante a la morfología “A” de *B. bonariensis* y otros son semejantes a la morfología “C”. En este ACP, el componente principal 1 (CP1) acumuló el 88,42 % y las variables que más aportaron fueron la longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud de la espira (LE), longitud total (LT), longitud del último anfracto (LUA), longitud de la abertura (LA), diámetro menor (DME) y diámetro

mayor (DMA) (**Tabla 1.1.9**). El segundo componente (CP2), acumuló el 6 % de la variación total y en este caso las variables con mayor aporte fueron la longitud de la espira (LE), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud de la abertura (LA), diámetro mayor (DMA) y diámetro menor (DME) (**Tabla 1.1.9**).

**Figura 1.1.19**

*Análisis de componentes principales 1 y 2 de B. bonariensis con sus tres morfologías y B. vesicalis*



Referencias: *B. bonariensis* morfologías “A”, línea roja; “B”, línea azul y “C”, línea verde; ▲ *B. vesicalis* línea naranja. Localidades ■ Los Toldos/Bs. As. (1), ■ Florencio Varela/Bs. As. (2-12), ■ Chascomús/ Bs. As. (13-14), ■ La Plata/ Bs. As. (15-19), ■ Resistencia/Chaco (20-24), ■ Miramar/Córdoba (25-27), ■ Mercedes/Corrientes (28-30), ■ Ituzaingo/Corrientes (31-36), ■ Posadas/Misiones (37/40), ■ Avellaneda/Santa Fé (38-39), ■ Villa del Dique /Córdoba (41-47), ■ La Plata/Bs. As. (48), ■ Quilmes/Bs. As. (49-50), ■ Larroque/Entre Ríos (49-50), ■ Larroque/ Entre Ríos (52-56), ■ V. General Belgrano/Córdoba (57), ■ NHMUK 1975401 (58), ■ NHMUK1854.12.4.160 (59), ■ NHMUK 1854.12.4.158 (60). Componente principal 1 (CP1); Componente Principal 2 (CP2).

**Tabla 1.1.9**

*Aporte de las variables al ACP de B. bonariensis con sus tres morfologías y B. vesicalis*

Variable	CP1	CP2
<b>LT</b>	<b>0,3565</b>	-0,0658
<b>LE</b>	<b>0,4089</b>	<b>-0,5947</b>
<b>LPV</b>	<b>0,4178</b>	<b>-0,3823</b>
<b>LUA</b>	<b>0,3254</b>	0,1867
<b>LA</b>	<b>0,2768</b>	<b>0,3397</b>
<b>AA</b>	0,1395	0,1464
<b>APV</b>	0,1295	-0,0009
<b>LEP</b>	0,1143	0,1563
<b>DMA</b>	<b>0,2577</b>	<b>0,2409</b>
<b>DME</b>	<b>0,2648</b>	<b>0,2005</b>

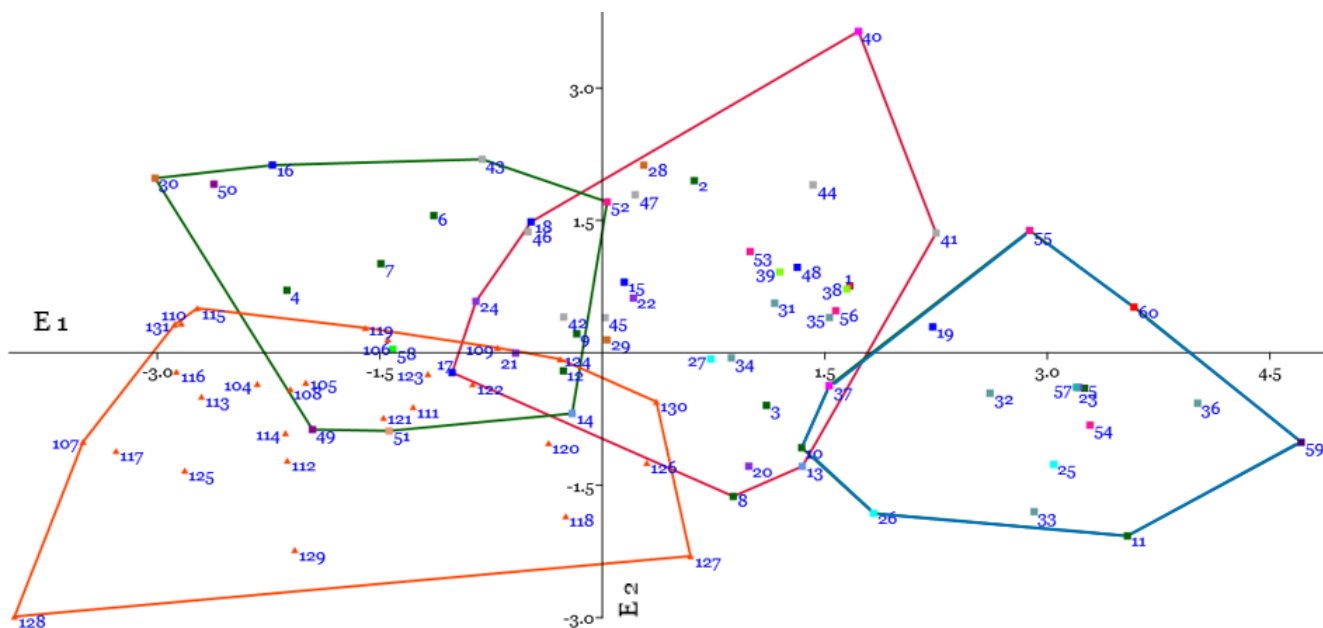
Se indica el aporte de cada variable a los componentes principales 1 y 2 (CP1-CP2).

*Abreviaturas:* ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

Posteriormente, para maximizar la separación de *B. vesicalis* y las tres morfologías encontradas en *B. bonariensis* se realizó un análisis discriminante (AD), la representación gráfica del mismo corresponde a la **Figura 1.1.20**. El eje 1 (E1) resultó en la acumulación del 84 % de la variación total, donde las variables que más aportaron fueron la longitud total (LT), ancho de la abertura (AA), longitud de la abertura (LA) y longitud del último anfracto (LUA) (**Tabla 1.1.10**). En relación al eje 2 (E2), acumuló el 13,38 % de la variación, las variables que más contribuyeron fueron el diámetro mayor (DMA), longitud de la abertura (LA), ancho de la penúltima vuelta (APV) y longitud de la espira (LE) (**Tabla 1.1.10**). Del AD, el 83,3 % de los individuos fueron correctamente asignados a la morfología “A” de *B. bonariensis* (25 ejemplares), pudiendo ser identificado erróneamente con la morfología “B” (1 ejemplar), con la morfología “C” (3 ejemplares) o con *B. vesicalis* (1 ejemplar). Respecto de la morfología “B”, el 87,5 % fueron correctamente asignados (14 ejemplares), pudiendo ser erróneamente identificados con la morfología “A” (2 ejemplares). La morfología conquiolar “C” obtuvo un 75 % de asignación correcta (12 ejemplares), pudiendo ser identificado erróneamente como *B. vesicalis* (2 ejemplares). La especie *B. vesicalis*, por su parte, obtuvo un 85,71 % de asignación correcta (24 ejemplares), pudiendo ser erróneamente identificados con la morfología conquiolar “A” de *B. bonariensis* (3 ejemplares) o con la morfología “C” de *B. bonariensis* (1 ejemplar).

**Figura 1.1.20**

*Análisis discriminante de B. bonariensis con sus tres morfologías y B. vesicalis*



Referencias: *B. bonariensis* morfologías “A”, línea roja; “B”, línea azul y “C”, línea verde; ▲ *B. vesicalis* línea naranja. Localidades ■ Los Toldos/Bs. As. (1), ■ Florencio Varela/Bs. As. (2-12), ■ Chascomús/ Bs. As. (13-14), ■ La Plata/ Bs. As. (15-19), ■ Resistencia/Chaco (20-24), ■ Miramar/Córdoba (25-27), ■ Mercedes/Corrientes (28-30), ■ Ituzaingo/Corrientes (31-36), ■ Posadas/Misiones (37/40), ■ Avellaneda/Santa Fé (38-39), ■ Villa del Dique /Córdoba (41-47), ■ La Plata/Bs. As. (48), ■ Quilmes/Bs. As. (49-50), ■ Larroque/Entre Ríos (49-50), ■ Larroque/ Entre Ríos (52-56), ■ V. General Belgrano/Córdoba (57), ■ NHMUK 1975401 (58), ■ NHMUK1854.12.4.160 (59), ■ NHMUK 1854.12.4.158 (60). Eje 1 (E1); Eje 2 (E2).

**Tabla 1.1.10**

*Aporte de las variables al AD de las tres morfologías de B. bonariensis y B. vesicalis*

Variable	E1	E2
LT	40,145	4,3628
LE	10,243	19,176
LPV	0,8334	-11,927
LUA	-17,327	-1,2018
LA	-22,076	-26,97
AA	-22,325	17,206
APV	-1,1148	-22,098
LEP	-5,7644	14,044
DMA	-1,3526	30,349
DME	0,9186	-10,857

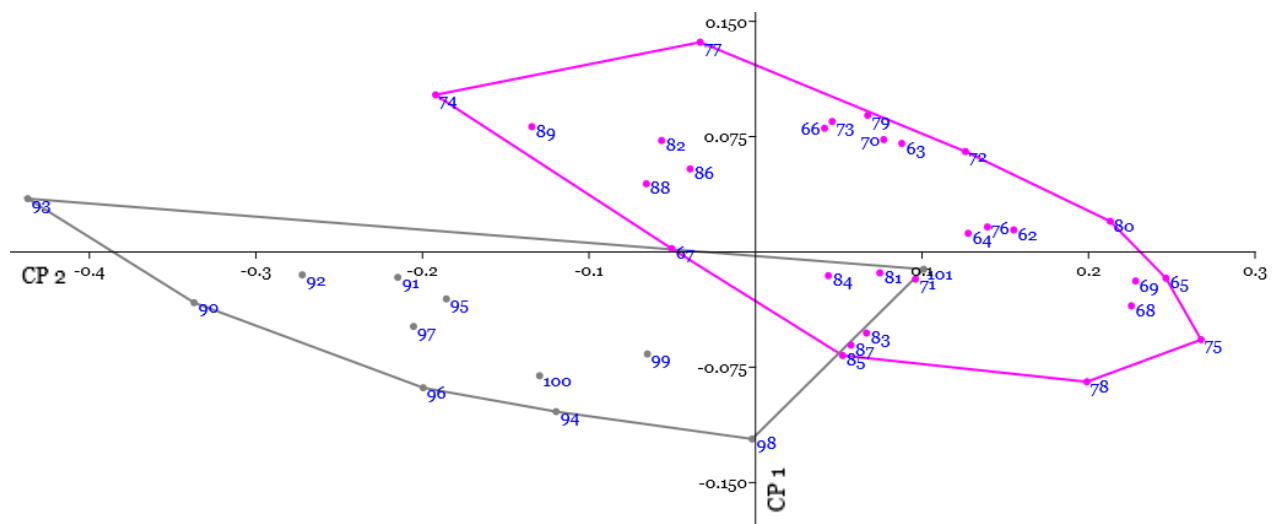
Se indica el aporte de cada variable a los ejes 1 y 2 (E1-E2).

Abreviaturas: ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

Por último, para establecer los límites de la variabilidad encontrada de forma cualitativa en ejemplares de *B. rushii*, se realizó un ACP en dicho grupo considerando por un lado a la población de Córdoba (530 msnm aprox.) y por otra parte a la procedente de Buenos Aires (170 msnm aprox.). En la **Figura 1.1.21** se muestra la dispersión obtenida de ejemplares de dicha entidad. El componente principal 1 (CP1) acumuló el 80,87 % de la variabilidad total, donde las variables que mayor aporte tuvieron fueron la longitud del espacio parietal (LEP) y la longitud de la abertura (LA) (**Tabla 1.1.10**) cuyos promedios fueron LEP=6,05 - LA=9,64 (población de Córdoba) y LEP=4,52 - LA=7,85 (población de Buenos Aires). El componente principal 2 (CP2) tuvo el 11,58 % de la variabilidad total y las variables de más aporte fueron también la longitud del espacio parietal (LEP) y la longitud de la espira (LE) (**Tabla 1.1.11**) siendo los promedios LE=6,33 con LT=16,48 (Córdoba) y LE=5,91 con LT=15,41 (Buenos Aires). No obstante, también el ancho de la abertura (AA) (**Tabla 1.1.11**) mostró un aporte significativo, siendo los promedios AA=5,35 (Córdoba) y AA=4,46 (Buenos Aires).

**Figura 1.1.21**

*Análisis de componentes principales 1 y 2 de B. rushii*



*Referencias:* ● Material procedente de la provincia de Córdoba, ● Material procedente de Buenos Aires.  
Componente Principal 1 (CP1); Componente Principal 2 (CP2).

**Tabla 1.1.11***Aporte de las variables al ACP de B. rushii*

<b>Variable</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>
<b>LT</b>	0,3232	-0,3039
<b>LE</b>	0,2753	<b>-0,4640</b>
<b>LPV</b>	0,3025	-0,3044
<b>LUA</b>	0,3516	-0,2045
<b>LA</b>	<b>0,3535</b>	-0,0645
<b>AA</b>	0,2184	<b>0,4253</b>
<b>APV</b>	0,3150	-0,0826
<b>LEP</b>	<b>0,4180</b>	<b>0,4807</b>
<b>DMA</b>	0,2662	0,27144
<b>DME</b>	0,2947	0,2469

Se indica el aporte de cada variable a los componentes principales 1 y 2 (CP1-CP2).

*Abreviaturas:* ancho de la abertura (AA), ancho de la penúltima vuelta (APV), diámetro mayor (DMA), diámetro menor (DME), longitud de la abertura (LA), longitud de la espira (LE), longitud del espacio parietal (LEP), longitud de la penúltima vuelta (LPV), longitud total de la conchilla (LT), longitud del último anfracto (LUA).

### 1.1.D. DISCUSIÓN

Desde hace unos años en los Bulimulidae se viene estudiando la evolución de la morfología, así como los patrones de colonización y especiación (Coppo, 1985; Parent y Crespi, 2006; Parent, 2008; 2012). Específicamente, en entidades de *Naesiotus* se demostró que factores bióticos por ejemplo la depredación y factores abióticos, donde la más destacable es la exposición al sol, actúan como fuerzas que impulsan la variabilidad en la coloración de la conchilla (Kraemer et al., 2019). Por otro lado, Parent y Crespi (2009) estudiaron especies de *Bulimulus* en el archipiélago de las Islas Galápagos y encontraron que en islas recientemente formadas, con una baja competencia interespecífica y un ambiente heterogéneo, se encuentra asociado a un alto grado de variabilidad morfológica intraespecífica, en cambio en islas más antiguas con una baja heterogeneidad del hábitat y una alta diversidad de caracoles la variabilidad intraespecífica era menor.

La gran variabilidad en características asociadas a la conchilla es un rasgo que se está haciendo cada vez más evidente dentro de ciertas especies de Bulimulidae, debido a que en muchos casos la morfología de la conchilla es resultado de la diferenciación genética en asociación con la plasticidad fenotípica (Miranda, 2020). Recientemente, la autora demostró que la variabilidad en la coloración y patrones de las bandas de *B. torallyi* es independiente de la localidad en la cual se colecten los ejemplares; sin embargo, planteó la posibilidad de que la altitud, como factor ambiental, también tenga implicancia en la variabilidad observada, por ejemplo, en la longitud de la espira. La variabilidad intraespecífica de la morfología conquiolar en función de la elevación y el grado de humedad fue demostrada por Parent (2008) en poblaciones de *B. reibischi*, afectando en este caso la forma general de la conchilla, siendo globosa a mayor altura y angosta con una abertura más estrecha en ambientes secos de baja altitud.

Por lo antes expuesto, podemos decir que encontrar variabilidad a nivel conquiolar en especies de *Bulimulus* no es atípico, sino que en la medida en que se realizan y continúen realizando estudios surgirán nuevos casos de este tipo, a nivel no sólo del género sino que seguramente también de la Familia.

El desarrollo de la presente tesis se inició tomando como punto de partida las descripciones, re-descripciones y comentarios respecto de la morfología conquiolar de las tres entidades de *Bulimulus* citadas para la provincia de Buenos Aires. De esta manera y por medio del análisis cualitativo se pudieron reconocer, en el material del que se disponía, ejemplares correspondientes a cada una. No obstante, en relación a la

distribución geográfica de cada entidad, ciertas peculiaridades necesitan ser mencionadas. En el caso de *B. bonariensis*, las muestras obtenidas se correspondieron con la distribución dada en la literatura. Se inició la colecta con muestras de la provincia de Buenos Aires, localidad típica de la especie pero, debido a la disponibilidad de material provenientes de distintas provincias dentro del rango de distribución dado por Miquel (1991, fig. 60), se hizo posible el análisis de un gran número de ejemplares enriqueciendo de esta manera el estudio integral del área de extensión (excepto de Jujuy y Tucumán).

En relación a *B. rushii*, lamentablemente no fue posible conseguir ejemplares provenientes del Uruguay localidad típica de la especie, por este motivo se incluyó en el ACP al lectotipo disponible. No obstante, se obtuvieron ejemplares de Córdoba colectados y determinados como tal por la Dra. Hylton Scott. Así, a partir de este trabajo, se amplía la distribución de esta especie. Además, aunque ya Parodiz (1944) incluía a dicha provincia y a Buenos Aires en su rango de extensión al igual que Ovando et al. (2019) al citar a *B. rushii* para las ecorregiones del Espinal y Pampa Húmeda, en esta contribución se incluye ahora parte de la ecorregión del Chaco Seco.

Por último y con respecto a *B. vesicalis* se contó por un lado, con material colectado e identificado por la Dra. Hylton Scott de Santa Fe. Dicho material es mencionado por Miquel (1991) pero no tenía número de ingreso a la Colección. Por otro lado, se trabajó con material previamente depositado en el MLP procedente de Punta Lara, una zona de la provincia de Buenos Aires caracterizada por ambientes de selva en galería. Asimismo, dentro del rango de distribución se pudo obtener un único ejemplar colectado en la localidad de Atalaya. Luego de no poder obtener material tras varias visitas a sitios dentro del área de distribución conocida y considerando que Clavijo y Scarabino (2013) la incluyeron como una especie prioritaria para la conservación, es necesario mencionar que hay una reducción numérica alarmante que merece ser estudiada.

El ACP realizado en las tres especies permitió identificar que las medidas, longitud y ancho, asociadas a la penúltima vuelta constituyen las de mayor aporte para la diferenciación entre ellas que hasta el momento no se habían considerado como tal. También lo fue el diámetro menor de la conchilla, variable que explicó gran parte de la varianza tanto en el ACP como en el AD. Al maximizar la varianza entre grupos en el AD también se denotó que la longitud de la abertura es una variable de gran aporte para diferenciar las especies.

Como se observó en los resultados, hay variabilidad en la forma de la conchilla de *B. bonariensis* apreciable en tres morfologías claramente definidas y que se observó no

sólo en cada localidad, de la cual se contó con material, sino que también se manifestó a lo largo del rango de distribución estudiado. En el ACP de esta especie se observó que la morfología “C” se encuentra bien diferenciada de las otras dos; sin embargo, algunos ejemplares con morfología “A” y “B” se ubicaron en el límite de ambas áreas de dispersión. En el AD los ejemplares se encuentran dispersos en un gradiente de morfologías, teniendo algunos de ellos claramente una morfología “A”, “B” o “C” y otros quedaron en los límites. Incluso, en el ACP de *B. bonariensis* y *B. vesicalis*, puede apreciarse cierta superposición de las tres morfologías encontradas en *B. bonariensis*, todo lo cual indica que existen formas de conchilla intermedias a las tres mencionadas; en las cuales la asignación a una determinada morfología es compleja de establecer *a priori* e incluso por medio de un análisis morfométrico.

Mediante la aplicación del ACP se pudo corroborar que los ejemplares pueden manifestar básicamente alguna de las tres morfologías diferenciadas desde la información cualitativa y morfométrica. Las variables que destacan tal separación fueron la longitud de la penúltima vuelta, longitud de la espira, longitud total, longitud de la abertura, diámetro menor y diámetro mayor siendo la longitud de la espira, longitud de la abertura y diámetro mayor las que se prefieren destacar como más característica de cada morfología.

A siete años de haber realizado la descripción de *B. bonariensis*, Rafinesque fallece y es posible que gran parte de su colección personal haya sido vendida o destruida, lo que sumó una complicación al momento de tomar algún ejemplar como modelo de la especie. No obstante, se tomó como punto de partida las re-descripciones dadas por diversos autores y el hecho de que la localidad tipo es la provincia de Buenos Aires (Parodiz, 1962). Dado el amplio rango de distribución (Miquel, 1991, fig. 60) surgió, en el desarrollo de la presente tesis, la necesidad de reunir varios lotes de ejemplares de la provincia mencionada que incluyera la variabilidad observada para ser comparados los ejemplares entre sí y entre lotes provenientes de diversas provincias.

Luego de realizado el análisis, la variabilidad manifiesta hizo recordar a los lotes colectados por d'Orbigny, los cuales muestran una gran diversidad de morfologías (MHMUK 1854.12.4.158, MHMUK 1854.12.4.159, MHMUK 1854.12.4.160). Aunque d'Orbigny no asignó nombres, denotó la amplia diferencia de formas observadas en campo al cual indicó un amplio rango de distribución desde Patagonia (Rio Negro) hasta Bolivia (Provincia de Chiquitos). De las cuales, en el presente capítulo se incluyeron el sintipo de *B. montevidensis* NHMUK 1975401 (N°58), reconocido por Breure y Ablett (2014) como *B. b. bonariensis* y que mostró una conchilla con morfología “C”; el lectotipo de *B. b. sporadicus* NHMUK 1854.12.4.160 (N°59) manifestó por morfometría una

morfología “B”, aunque desde lo cualitativo se asemejó a la morfología “A”, encontrándose, de esta manera, en el límite de ambas; por otra parte, la variedad “variété la plus allongée” NHMUK 1854.12.4.158 (N°60) posee una morfología de conchilla “B”, por lo tanto quedó manifiesto que las tres morfologías presentadas aquí son consistentes con las diferencias observadas por otros autores (Miquel, 1991; Breure y Ablett, 2014). La variabilidad que d’Orbigny manifestó y que también se evidenció en el presente capítulo, al igual que las distintas concepciones que se han tenido a lo largo del último siglo y medio en relación a las dos especies mencionadas, denotó que es un grupo difícil de comprender analizando únicamente la morfología a nivel conquiolar, tal como lo observó Hylton Scott (1948). Sin embargo, quedó demostrado que es de máxima necesidad acompañar a la morfología de partes duras con un análisis de la anatomía interna.

Con respecto a *B. rushii*, la diferenciación de esta especie en relación a *B. bonariensis* y *B. vesicalis* es claramente más simple de realizar por sus características conquiolares únicas a nivel de la conchilla en general, hecho que quedó bien manifestado en el ACP y AD de las tres especies. Así como también al observar la protoconcha puntualmente, lo que hace a esta especie un *Bulimulus* muy particular y cuya identidad es simple de reconocer cuando se la compara con las otras dos especies presentes en la provincia de Buenos Aires. Las características únicas de la protoconcha con líneas separadas entre sí, en zigzag formando ángulos poco agudos concuerdan con las observaciones de Parodiz (1944) y Miquel (1991, fig. 47). En cuanto a las líneas espirales que según Pilsbry (1897) recorren a la conchilla, Parodiz (1944) reconoció que no las pudo observar en los ejemplares que analizó. No obstante, durante desarrollo del análisis de este capítulo pudieron evidenciarse sólo mediante la implementación de fotografías obtenidas bajo Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

Algo que debe mencionarse es que entre las poblaciones presentes en la provincia de Córdoba y la población del Dique Paso Piedras en Buenos Aires se observó que ésta última posee una espira ligeramente más alta. Esto recuerda que Parodiz (1944) también manifestó que en ocasiones la configuración de la conchilla puede llegar a ser más alargada que el material tipo de la especie. Por este motivo se incluyó un ACP entre las dos poblaciones con el fin de verificar la variabilidad. Mediante este análisis los resultados arrojaron que las variables con mayor aporte fueron la longitud de espacio parietal, la longitud y ancho de la abertura y la longitud de la espira. Las tres primeras variables asociadas al tamaño de la abertura recuerdan los resultados de Parent (2008), comentado previamente. Coincidiendo con Parent (2008) podemos decir que individuos de *B. rushii* que habitan zonas más secas y de baja altitud poseen aberturas más cortas y

angostas con menor longitud del espacio parietal y las poblaciones que habitan mayor altura, como las procedentes de Córdoba en este caso, poseen una abertura más alargada y ancha, por lo tanto de mayor longitud en el espacio parietal. Vale decir que las diferencias ambientales entre las dos localidades estudiadas no se deben sólo a la altitud, sino que los sitios se encuentran ubicados en ecorregiones diferentes y por lo tanto con climas distintos. Respecto de la longitud de la espira, aunque parecía ser lo más diferenciable entre las poblaciones no resultó ser la variable más relevante, aunque contribuyó a la diferenciación de las mismas. En especies de *Amplirhagada* Iredale, 1933 (Camaenidae) Köhler y Johnson (2012), también pusieron en evidencia que existen diferencias a nivel conquiolar cuando se analiza la variabilidad en relación a la elevación.

Por otro lado, en las muestras aquí analizadas se apreció que las esculturaciones de la protoconcha poseen el mismo patrón particular, denotando de esta manera la correspondencia a la misma especie con una distribución disyunta. Mediante el análisis anatómico en el capítulo siguiente se confirma y corrobora la correspondencia a la misma especie. En cuanto a la diferenciación con *B. durus* o especies de *Rhinus* para la toma de una decisión taxonómica quedará a futuro comparar las características anatómicas que serán tratadas en el capítulo siguiente con las especies previamente mencionadas.

La diferenciación morfométrica entre *B. bonariensis* y *B. vesicalis* fue difícil de establecer en la representación de los ACP resultando en una distribución de puntos altamente superpuesta; tanto en el ACP de las tres especies como en el ACP de las tres morfologías de *B. bonariensis* y ejemplares de *B. vesicalis*. Aunque la separación de las especies se maximizó con la aplicación de ambos AD, quedaron ejemplares en un área solapada. Esto motivó a evaluar con qué morfología de *B. bonariensis* hay mayor semejanza, lo cual arrojó que *B. vesicalis* tiene mayor similitud con las morfologías “A” y “C” incluso un ejemplar del paralectotipo (Nº130) quedó incluido en la morfología “A”; esto explica la presencia de muestras en colecciones de museos que teniendo morfologías comparables con “A” y “C” fueron identificadas como *B. vesicalis*.

Las variables que aportaron a la diferenciación de esta especie fueron la longitud total, ancho de la abertura, longitud de la abertura y longitud del último anfracto. Considerando que la variación en la longitud total se debe a que se contó con ejemplares de distintos tamaños; el ancho de la abertura y la longitud de la abertura resultan ser las características, a nuestro entender, más destacables para diferenciar a esta especie. Vale mencionar que las características conquiulares que permiten de manera cuantitativa reconocer a *B. vesicalis* son principalmente: la longitud de la abertura y la longitud de la espira en relación a la longitud total de la conchilla, y como carácter cualitativo el poseer anfractos poco a muy poco convexos. De las tres características solo se vieron

representadas numéricamente las primeras dos, quedando la convexidad de cada vuelta no incluida en el análisis morfométrico. Por lo tanto éste pudo ser un punto importante en los resultados observados quedando a futuro incorporarlo, midiendo su angulosidad respecto de la sutura para verificar si el aporte de ese carácter permite una mayor diferenciación morfométrica de ambas especies. Cabe destacar que todos los ejemplares tratados en el presente capítulo presentaron una morfología conquiolar equivalente al paralectotipo 1975392/a (NHMUK). En ninguna ocasión, incluso al observar material depositado en museos argentinos, fue posible encontrar una morfología semejante al lectotipo de la especie.

Por las razones mencionadas en cada especie, queda en el siguiente capítulo continuar el estudio específico abarcando la anatomía interna, que permitirá tener una visión más integral y posiblemente validar o refutar los resultados obtenidos a partir de lo analizado conquiolarmente.

Hasta aquí podemos decir que la variabilidad interespecífica estudiada desde el punto de vista de la morfometría conquiolar revalidan las entidades catalogadas por Cuezco et al. (2013) sobre la base de conchillas. Sumado a que el estudio realizado en el presente capítulo aportó información al conocimiento de la variabilidad intraespecífica que hasta el momento no se había analizado.

**PARTE 1.-**  
**ESTUDIOS MORFO-ANATÓMICOS**  
**CAPÍTULO 1.2.-**  
**CARACTERES ANATÓMICOS**



### 1.2.A. INTRODUCCIÓN

Como se menciona a lo largo del desarrollo de la presente tesis, la gran mayoría de las especies de gasterópodos terrestres fueron descritas únicamente a nivel conquiolar y, si bien, en muchos grupos ofrece características que permiten una identificación adecuada de las entidades, en algunos taxa puede verse afectado por evolución paralela o convergente (Suvorov, 2002). En ocasiones la discriminación de especies es dificultosa debido a la gran cantidad de descripciones y a la acumulación de sinonimias causada por la gran plasticidad de esta parte del gasterópodo (Borda y Ramírez, 2014).

En la medida en que fue incrementándose la disponibilidad de material con partes blandas, se han ido incorporando descripciones de algunos órganos o sistemas. Por un lado, esto permitió contar con información anatómica particularmente importante para el diagnóstico, siendo puntualmente el sistema reproductor el más destacable y rico en caracteres (Suvorov, 2002) y se considera que es un sistema que posee una evolución relativamente independiente al ambiente (Schileyko, 1995). Por otro lado, disponer de información anatómica permitió analizar y vincular caracteres morfológicos y moleculares para llevar adelante análisis filogenéticos y trabajar sobre los sistemas de clasificación (Ponder et al., 2008). No obstante, uno de los principales problemas en la taxonomía de los gasterópodos terrestres es que no se considera al organismo como una unidad (Suvorov, 2002).

Como se mencionara de manera general, comenzando por el siglo XIX el conocimiento de los Bulimulidae, en particular los presentes en la Argentina se basó principalmente en caracteres conquiolares, lo cual dio lugar a una supernumeraria cantidad de especies descritas. Posteriormente, y sobre todo desde mediados del siglo pasado, se han ido incorporando caracteres respecto de partes duras del sistema digestivo y en relación al reproductor pero sólo en estudios más recientes se ha ampliado el conocimiento a otros sistemas en forma puntual.

La familia Bulimulidae en la Argentina se encuentra representada por 46 especies (Cuezzo et al., 2013; Miranda, 2014; Miranda y Cuezzo, 2014). De ellas, se mencionarán a continuación, específicamente, aquellas a las que cuales se ha incorporado información en relación a su anatomía interna. El género *Bostryx* es el más numeroso y estudiado desde el punto de vista anatómico. De las 19 especies descritas, 14 cuentan con información anatómica. En el caso de *B. famatinus* se incorporó sólo el estudio de una estructura puntual (Pilsbry, 1895-1896: mandíbula). En la mayor parte de las especies de *Bostryx*, a lo largo de los últimos 80 años, se fueron incorporando caracteres

anatómicos entre los que se encuentran *B. cordillerae* (Breure, 1978: características del complejo peniano, vagina, bursa copulatrix y conducto correspondiente; Miranda, 2015: sistema paleal y reproductor); *B. cuyanus* (Hylton Scott, 1953: sistema reproductor, rádula y mandíbula; Breure, 1978: sistema reproductor e histología del complejo peniano; Miquel, 1993: imagen de diente central y laterales); *B. martinezi* (Hylton Scott, 1965: rádula y mandíbula; Miranda, 2014: morfología externa, rádula, mandíbula, sistema paleal, reproductor); *B. pastorei* (Parodiz, 1946: rádula y mandíbula; Miranda, 2015: sistema paleal, reproductor); *B. peristomatus*, *B. scarber*, *B. roselleus* (Miranda y Cuezco, 2014: morfología externa, sistema digestivo, paleal y reproductor); *B. reedi* (Miquel, 1993: imagen de diente central y laterales; Miranda, 2015: sistema paleal, reproductor), *B. strobili* (Miranda, 2015: sistema paleal, reproductor); *B. stelzneri* (Parodiz, 1946: órganos bucales, rádula y mandíbula; Breure, 1978: complejo peniano e histología del mismo; Miquel, 1993: imagen de diente central y laterales; Miranda y Cuezco, 2014: morfología externa, sistema digestivo, paleal y reproductor); *B. rudisculpus* (Miranda, 2015: morfología externa, rádula y mandíbula, sistema paleal, reproductor); *B. tortoranus* (Breure, 1978: reproductor; Miquel, 1995: diente central y laterales; Miranda, 2015: morfología externa, rádula, mandíbula, sistema paleal, reproductor); *B. torallyi* (Parodiz, 1946: rádula; Breure, 1978: sistema reproductor; Miquel, 1995: describe diente central y laterales; Miranda, 2020: mandíbula, rádula, sistema reproductor).

En el género *Drymaeus*, de las nueve especies descritas cinco cuentan con información anatómica, con mención de características particulares como en *D. hyltoni* (Miquel, 1989 a: rádula) o con ampliación del conocimiento anatómico enfocado en el sistema reproductor, organización histológica del complejo peniano o a nivel de estructuras del digestivo. Entre las especies de *Drymaeus* con este tipo de información, se encuentran *D. hygrophylaeus* (Breure y Eskens, 1981: complejo peniano e histología del mismo, características de la vagina, bursa copulatrix y morfología del conducto); *D. interpunctus* (Breure y Eskens, 1981: complejo peniano e histología, vagina, bursa copulatrix y morfología del conducto; Miquel, 1989 a: morfología del diente central y laterales); *D. papyraceus* (Parodiz, 1946: órganos bucales, mandíbula, rádula; Rezende, 1967: rádula, mandíbula, órganos paleales, sistema digestivo, reproductor e histología del mismo; Van Mol, 1971: organización interna del complejo peniano por medio de cortes histológicos) y *D. poecilus* (Parodiz, 1946: mandíbula, rádula; Breure y Eskens, 1981: complejo peniano e histología, vagina, bursa copulatrix y morfología del conducto; Miquel, 1989 a: diente central y laterales; Miranda, 2016: utilizó caracteres anatómicos para realizar un análisis cladístico del género *Bostryx*).

Por otra parte, el género *Naesiotus* representado por nueve especies conocidas, solo tres cuentan con información anatómica parcial en dos de los cuales está enfocada en la rádula como sucede en *N. calchaquinus* y *N. deletangui* (Miquel, 1989 b: morfología de los dientes centrales y laterales). La única especie de la cual se dispone información asociada al reproductor es *N. oxylabris* (Parodiz, 1946: órganos bucales, rádula; Breure y Coppoio, 1978; rádula, complejo peniano, bursa copulatrix y su conducto).

En el caso del género *Scutalus* únicamente representado por la especie *S. tupacii* fue estudiada en varias ocasiones, pero siempre enfocando el análisis en partes duras del sistema digestivo, en el reproductor y solo dos especialistas comenzaron a abordar otras estructuras (Doering, 1875: rádula y mandíbula; Parodiz, 1946: órganos bucales, mandíbula, rádula, sistema reproductor; Hylton Scott, 1951: rádula, mandíbula, sistema reproductor, manto y órganos del manto y caracterizó al pie; Breure, 1978: reproductor; Miquel, 1998: rádula)

Por último, para *Bulimulus* Cuezco et al. (2013) reconocen hasta la actualidad ocho especies válidas en Argentina entre las que se encuentran *B. apodemetes*, *B. bonariensis*, *B. elatior*, *B. fourmiersi*, *B. gracilis*, *B. prosopidis*, *B. rushii* y *B. vesicalis*. Las cuales cuentan con una amplia bibliografía abocada a la descripción de las mismas desde lo conquiolar, no obstante ninguna de las especies cuenta con información anatómica completa. Sólo existe en la literatura mención de características anatómicas puntuales o información parcial de las partes blandas como es el caso de *B. bonariensis* (Miquel, 1991: imagen de la rádula; Díaz y Martín, 2013: morfología e histología del sistema reproductor; Miranda, 2016: codificación de caracteres en análisis cladístico de *Bostryx*), *B. gracilis* (Miranda, 2016: codificación de caracteres en análisis cladístico de *Bostryx*) y *B. rushii* (Miquel, 1991: imagen de la rádula). Las especies de las que se dispone de mayor información anatómica son *B. apodemetes* (Parodiz, 1946: sistema reproductor; Breure, 1978: proporciones de las partes que componen el complejo peniano e inserción del musculo retractor, caracterizó la vagina, bursa copulatrix y conducto de la misma; Miquel, 1991: imagen de dientes laterales; Miranda, 2016: codificación de caracteres en análisis cladístico de *Bostryx*) y *B. prosopidis* (Breure, 1978: proporciones de las partes que componen el complejo peniano e inserción del musculo retractor, caracterizó la vagina, bursa copulatrix y conducto de la misma, describió la histología básica del complejo peniano).

Por lo antes expuesto, existe una gran numerosidad de especies presentes en Argentina para la familia. Sin embargo, la información anatómica disponible es puntual o parcial enfocada en ciertas estructuras especialmente reproductoras y sólo en contados casos se dispone de una anatomía completa. Lo cual también sucede en relación al género

*Bulimulus* ya que es escasa la información anatómica. Especialmente, al considerar la amplia distribución de una de sus especies como *Bulimulus bonariensis*; que además, posee variabilidad desde lo conquiolar, como se planteó en el capítulo precedente. A esto, se añade la nula o escasa información anatómica respecto de representantes del género presentes en la provincia de Buenos Aires. Por lo tanto, el presente capítulo tiene como objetivo ampliar la descripción de especies de *Bulimulus*, principalmente en la provincia de Buenos Aires: *B. bonariensis*, *B. rushii* y *B. vesicalis*. Analizando la anatomía de sus partes blandas, partes duras como rádula y mandíbula, e histología de la genitalia con el fin de contribuir a la diferenciación específica y generar aportes anatómicos de múltiples sistemas para futuros estudios integrados en el género y la familia.

## 1.2.B. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.B.1. Material estudiado

Del material disponible para el desarrollo de la presente tesis doctoral (**Parte 1.- Capítulo 1.1.-, Tabla 1.1.1**), se implementaron en el actual capítulo las muestras que disponían tanto de partes duras (conchilla: la gran mayoría analizadas en el **Capítulo 1.1.-, Tabla 1.1.2**) como partes blandas. El presente abordaje anatómico se realizó a partir de 62 ejemplares identificados como *B. bonariensis*, 5 ejemplares de *B. vesicalis* y 12 ejemplares de *B. rushii* (**Tabla 1.2.1**).

**Tabla 1.2.1**

*Lotes y ejemplares seleccionados para el análisis anatómico*

ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR
<b><i>B. bonariensis</i></b>	<b><i>B. bonariensis</i></b>	<b><i>B. bonariensis</i></b>
MLP-Ma 15167	MLP-Ma 15186/b	MLP-Ma 14522/a
MLP-Ma 15169/a	MLP-Ma 15186/c	MLP-Ma 14630/a
MLP-Ma 15169/b	IBS-Ma 486	MLP-Ma 14643
MLP-Ma 15169/c	IBS-Ma 362-1	MLP-Ma 14825/b
MLP-Ma 15169/d	IBS-Ma 362-2	MLP-Ma 14825/c
MLP-Ma 15169/e	IBS-Ma 362-3	MLP-Ma 14825/d
MLP-Ma 15169/f	IBS-Ma 393	
MLP-Ma 15166 <b>R-M</b>	IBS-Ma 363	<b><i>B. vesicalis</i></b>
MLP-Ma 15168/a	MLP-Ma 14825/e	MLP-Ma 14685/a
MLP-Ma 15168/b	MLP-Ma 14825/f	MLP-Ma 14685/b <b>R-M</b>
MLP-Ma 15168/c	MLP-Ma 14825/g	MLP-Ma 14685/c
MLP-Ma 15168/d	MLP-Ma 15184/a	MLP-Ma 14686/a
MLP-Ma 15160/a	MLP-Ma 15184/b	MLP-Ma 15157/a
MLP-Ma 15160/b	MLP-Ma 15184/c	
MLP-Ma 14629/a	MLP-Ma 15184/d	<b><i>B. rushii</i></b>
MLP-Ma 14629/b	MLP-Ma 15184/e <b>R-M</b>	MLP-Ma 15181/a
MLP-Ma 14629/d	MLP-Ma 15184/f	MLP-Ma 15181/b
MLP-Ma 14629/e	MLP-Ma 15184/g	MLP-Ma 15181/c <b>R-M</b>
MLP-Ma 14629/f	MLP-Ma 14544/a	MLP-Ma 15181/d
MLP-Ma 15178/a	MLP-Ma 14544/b	MLP-Ma 14854/a
MLP-Ma 15178/b	MLP-Ma 14544/c	MLP-Ma 14854/b
MLP-Ma 15178/c	MLP-Ma 14544/d	MLP-Ma 14854/c
MLP-Ma 15178/d	MLP-Ma 14544/e	MLP-Ma 15159/a
MLP-Ma 15178/e	MLP-Ma 15188/a	MLP-Ma 15159/e
MLP-Ma 15183/a	MLP-Ma 15188/b	MLP-Ma 15159/f
MLP-Ma 15183/b	MLP-Ma 15188/c <b>R-M</b>	MLP-Ma 15159/i
MLP-Ma 15183/c	MLP-Ma 15188/d	MLP-Ma 14546 <b>R</b>
MLP-Ma 15186/a	MLP-Ma 15188/e	

Con las letras “R” y/o “M” se indican los ejemplares analizados para caracterizar la rádula y/o mandíbula respectivamente.

### **1.2.B.2. Procesamiento de las muestras**

Las muestras que sólo contaban con material conquiolar se transportaron en recipiente rígido con una base de algodón siguiendo las recomendaciones de Barrientos (2003). Dichas muestras y las conchillas de los ejemplares que contenían partes blandas se acondicionaron como se describió en el **Capítulo 1.1.-** apartado **1.1.B.3.** de la presente tesis.

Por otra parte, las muestras que contaban con partes blandas se transportaron al laboratorio en recipiente rígido debidamente etiquetado, con sustrato y hojarasca del lugar. El acondicionamiento de los ejemplares se realizó según lo indicado por Barrientos (2003) con modificaciones propias. Para el proceso de relajación y sacrificio se colocaron los ejemplares vivos en envases de cierre hermético asegurando la ausencia de burbujas de aire y conteniendo agua previamente hervida y que posteriormente se dejó enfriar. A la cual se le adicionaron cristales de mentol Parafarm® y se dejaron en heladera de 12 a 16 horas, según el tamaño del animal (los más pequeños 12 hs y hasta 16 hs en los de mayor longitud total). La finalización del proceso de relajación fue evidenciada por la extensión del pie, cabeza, tentáculos, visualización de la mandíbula y manifestación del gonoporo. La separación de las partes blandas se realizó bajo microscopio estereoscópico marca Leica modelo EZ4. Se utilizó, en un comienzo, un excavador de uso odontológico que por tener los extremos a modo de disco plano y curvo permitió separar el borde del manto del lado izquierdo del animal y el extremo final del músculo columelar de la conchilla. Una vez que se pudo acceder a este músculo se lo traccionó con una pinza de punta fina N°5, se intercaló con la sujeción y traslado del animal con pinza tipo algodонера realizando movimientos helicoidales. Una vez separadas las partes blandas, se colocaron en alcohol al 96% o en una solución de Raillet- Henry (ácido acético glacial 2%, formol 5%, agua destilada 93% y 6 gr de cloruro de sodio por litro de solución) (Thiengo, 1995) durante 12 hs y luego fueron conservadas en alcohol al 70% (Barrientos, 2003). En ambos casos el alcohol fue reemplazado luego de transcurridas 24 horas, a las 72 hs y luego de transcurridos 7 días. De cada individuo se conservaron sus partes debidamente acondicionadas y rotuladas, en los casos en que el lote estuvo conformado por más de un individuo cada ejemplar del lote, se identificó adicionando letras en orden alfabético.

Los complejos penianos seleccionados para el análisis histológico se fijaron en Raillet-Henry y se procesaron como se explica en detalle en el **Capítulo 2.2.-** apartado **2.2.B.4.**

### **1.2.B.2.a. Proceso de disección**

La disección, separación de los sistemas y la captura de fotografías de los mismos se realizaron bajo microscopio binocular estereoscópico (Leica modelos -EZ4 con cámara Tucsen P16-0022 - y -S9i que dispone de cámara incorporada-) siguiendo la propuesta de Pérez Zeballos y García Moreno (2009), a la cual se le adicionaron modificaciones propias para preservar la mayor parte de las estructuras.

El proceso de disección se inició con un corte en el manto del lado derecho del ano y se procedió a realizar una línea de corte a lo largo del borde derecho del animal en paralelo al recto e intestino posterior hasta finalizar el área pulmonar, luego se avanzó con una línea de corte en el borde nuczal del manto, por detrás de la cabeza hacia el lado izquierdo y atrás del animal, hasta sobrepasar el pericardio, para finalizar se cortó por detrás del mismo y del riñón lo que permitió rebatir el manto. De esta manera se pudo visualizar el área pulmonar y conservar el extremo final del sistema digestivo. Luego, se continuó con una línea de corte a través del tegumento dorsal de la cabeza hacia delante de la misma, para descubrir el sistema nervioso central, parte anterior del sistema digestivo y reproductor. A partir de aquí se procedió a separar los sistemas.

Particularmente el abordaje del sistema reproductor se realizó siguiendo la terminología propuesta por Simone y Amaral (2018) y Simone et al. (2020). Especialmente la delimitación de las partes que componen el complejo peniano se realizó siguiendo la caracterización morfo-histología descrita por Rezende y Lanzieri (1964); Lanzieri y Rezende (1965); Van Mol (1971, fig. 13); Breure (1979, fig. 61-64) y Coppois (1985, fig. A1.1).

### **1.2.B.2.b. Acondicionamiento de rádula y mandíbula**

Luego de realizada la disección de los ejemplares, se fotografiaron los respectivos sistemas y posteriormente se apartó el bulbo bucal de los individuos señalados en la **Tabla 1.2.1** para la limpieza de estructuras duras correspondientes al sistema digestivo. Durante el acondicionamiento, los bulbos bucales fueron colocados en microtubos de 1,5 ml con el agregado de 500 µl de buffer NET (1 ml Tris pH 8, 2 ml 0,5 M EDTA, 1 ml 5 M NaCl, 20 ml 10 % SDS, 76 ml agua) y 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml), se incubaron a 56°C durante 24 horas (Holznagel, 1998). Posteriormente, se realizaron lavados con agua destilada y ulterior preservación en alcohol 25 % hasta el montaje en tacos de vidrio con cinta adhesiva bifaz. Se empleó el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) (JEOL 6360/JSMT 6360 LV) del MLP para su observación.

La conchilla depositada bajo el número de lote MLP-Ma 14546, mostraba en su interior restos secos de partes blandas, para lo cual se procedió a hidratar con agua destilada la parte interna de la conchilla mediante el uso de pipeta de bulbo. Posteriormente, a los restos de tejido obtenidos se les agregó una solución de hipoclorito de sodio diluida con agua destilada 1/10 (v/v) por unos minutos hasta visualizar la rádula. Se realizaron enjuagues con agua destilada y se procedió a preservar en alcohol 25 % hasta su montaje.

## 1.2.C. RESULTADOS

### 1.2.C.1. *Bulimulus bonariensis*

#### 1.2.C.1.a. Morfología general y masa visceral

Ejemplares de esta especie poseen un tegumento de color beige claro a marrón (**Fig. 1.2.1 A, B**), con pigmento concentrado en los músculos retractores de los tentáculos (**Fig. 1.2.1 A: t**), también en la región del manto que se encuentra inmediatamente debajo de la última vuelta de la conchilla (**Fig. 1.2.2 A**), limitando los vasos de la cavidad pulmonar (**Fig. 1.2.4; Fig. 1.2.5**) y en ocasiones en relación al sistema nervioso central (**Fig. 1.2.9**). El borde del manto (**Fig. 1.2.1 D, E; Fig. 1.2.2 A, C; Fig. 1.2.3 A: bm**) es de grosor considerable ~5mm y posee una línea color marrón, también denominada línea del collar (**Fig. 1.2.2 A, C; Fig. 1.2.3 A: l**), que define el límite de formación de la conchilla. La superficie dorsal del manto y el área pulmonar se caracterizan por tener diversos acúmulos de pigmento de posición y tamaño distintos en cada individuo, a modo de huella digital (**Fig. 1.2.2 A: p**).

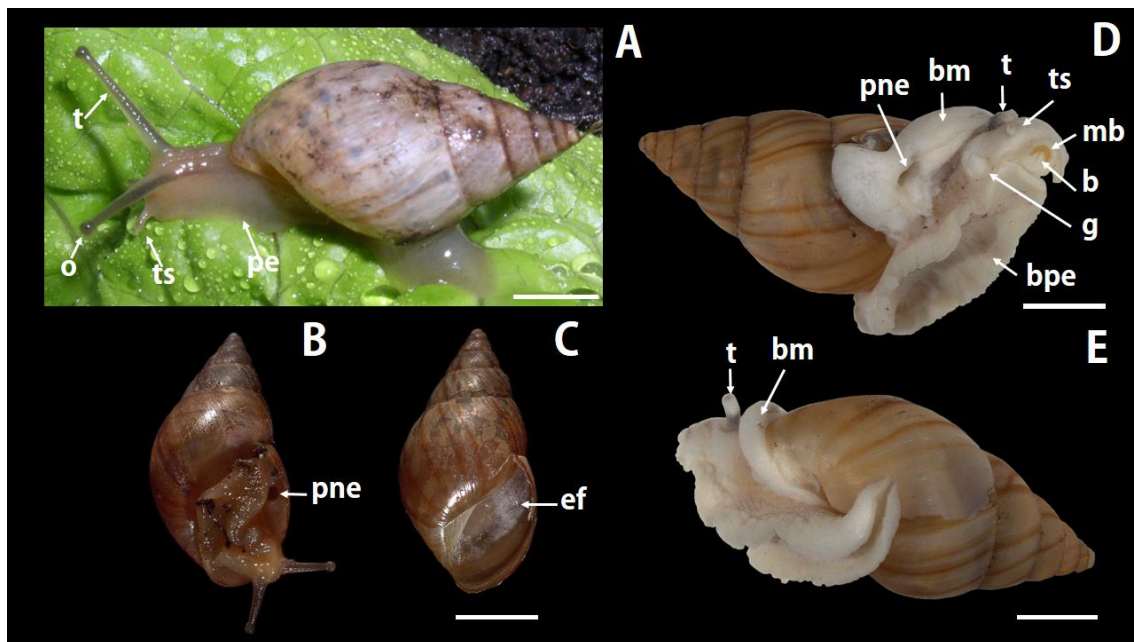
Poseen una región céfalo-pedal típica, la región cefálica está compuesta por dos pares de tentáculos retráctiles, el par más dorsal es el portador de ojos (**Fig. 1.2.1 A, D, E; Fig. 1.2.2 A, B, D, E: t**) y el par más cercano a la boca es sensorial (**Fig. 1.2.1 A, D; Fig. 1.2.2 A, B: ts**) cuya longitud es un tercio respecto del par anterior. La boca (**Fig. 1.2.1 D; Fig. 1.2.2 B, E; Fig. 1.2.3 B: b**) se encuentra limitada por un labio superior (**Fig. 1.2.2 D, E; Fig. 1.2.3 B: ls**), dos labios inferiores (**Fig. 1.2.2 D, E; Fig. 1.2.3 B: li**) y a ambos lados posee un palpo bucal formado por una extensión del tegumento (**Fig. 1.2.2 D, E; Fig. 1.2.3 A: pb**). Anterior, en el flanco derecho de la cabeza, debajo del tentáculo más alto se encuentra el gonoporo común (**Fig. 1.2.1 D; Fig. 1.2.2 A: g**) y en una posición media el pneumostoma (**Fig. 1.2.1 B, D: pne**). El pie (**Fig. 1.2.1 A: pe**) es una estructura muscular que al desplazarse produce ondas de contracción monotáxicas retrógradas, su base es lisa (**Fig. 1.2.1 D, Fig. 1.2.2 B, D, E Fig. 1.2.3 A: bpe**) y lateralmente está conformado por tegumento que también es glandular, pero con aspecto de papilas dispuestas como mosaico (**Fig. 1.2.3**). En períodos de inactividad, cuando el animal estiva o hiberna, la región céfalo-pedal la retraen dentro de la conchilla y forman el epifragma membranoso (**Fig. 1.2.1 C: ef**).

Al remover la conchilla se observa desde el extremo de la espira que la glándula digestiva posee color marrón a beige y ocupa ~4 vueltas y  $\frac{1}{4}$  (**Fig. 1.2.2 A, B: gd**). La misma contiene, en su lóbulo posterior, aproximadamente en la tercera vuelta, el ovotestis. El lóbulo anterior de la glándula digestiva es el de mayor tamaño y contiene al

intestino anterior (**Fig. 1.2.2 A: ia**), posterior (**Fig. 1.2.2 A: ip**) y al estómago. A su vez, la glándula digestiva, rodea estructuras reproductoras como el conducto hermafrodita, glándula del albumen, bursa copulatrix y parte de los conductos. La última vuelta del animal está ocupada externamente por la cavidad pulmonar con los órganos del manto asociados a ella, comienza en el lateral izquierdo del animal a partir del riñón (**Fig. 1.2.2 B: r**) y se extiende hasta el lateral derecho a la altura del pneumostoma (**Fig. 1.2.2 A**), que se encuentra limitado posteriormente por el intestino posterior y recto y anteriormente por el borde del manto (**Fig. 1.2.2 A**). Por transparencia, se puede apreciar la vena pulmonar (**Fig. 1.2.2 A: vp**), vasos pulmonares y cavidad pericárdica (**Fig. 1.2.2 B: cp**). Anteriormente, en el borde del manto se encuentra una delgada línea marrón, la línea del collar (**Fig. 1.2.2 A, C; Fig. 1.2.3 A: l**).

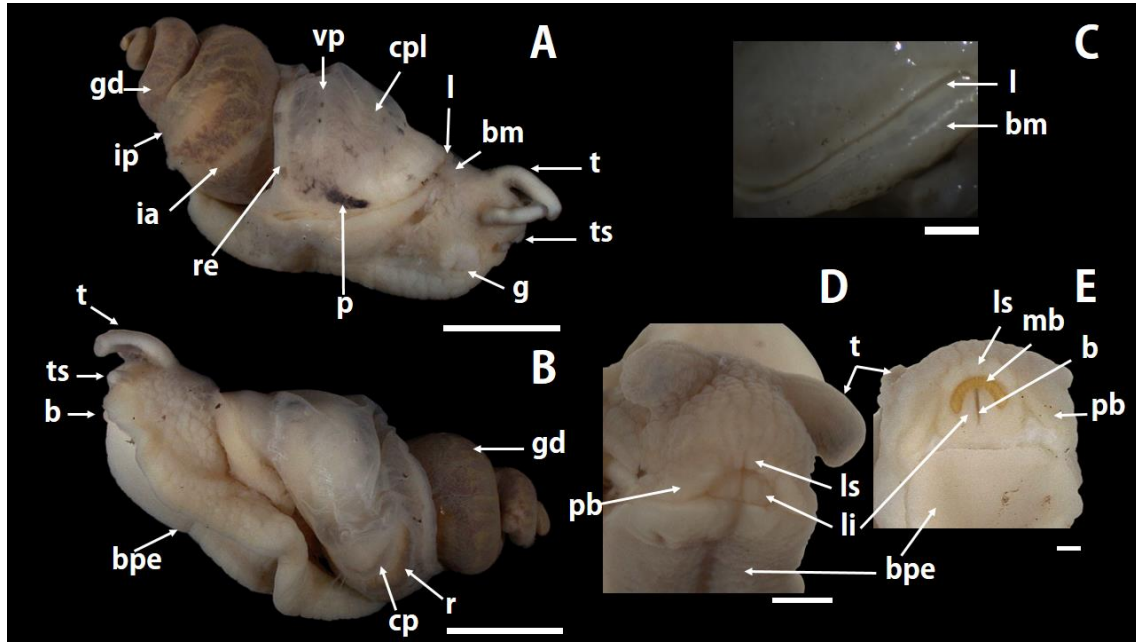
### Figura 1.2.1

*Aspecto general de Bulimulus bonariensis*



**A-** Vista lateral izquierda (MLP-Ma 15169/e). **B-** Vista ventral con el animal asomando por la abertura. **C-** Vista del epifragma (MLP-Ma 15166/a). **D-** Vista ventro-lateral derecha del animal relajado y fijado. **E-** Vista lateral izquierda (MLP-Ma 15169/a).

*Abreviaturas:* base del pie (bpe), boca (b), borde del manto (bm), epifragma (ef), gonoporo (g), mandíbula (mb), ojo (o), pie (pe), pneumostoma (pne), tentáculo portador de ojo (t), tentáculo sensorial (ts). Escala= 5 mm.

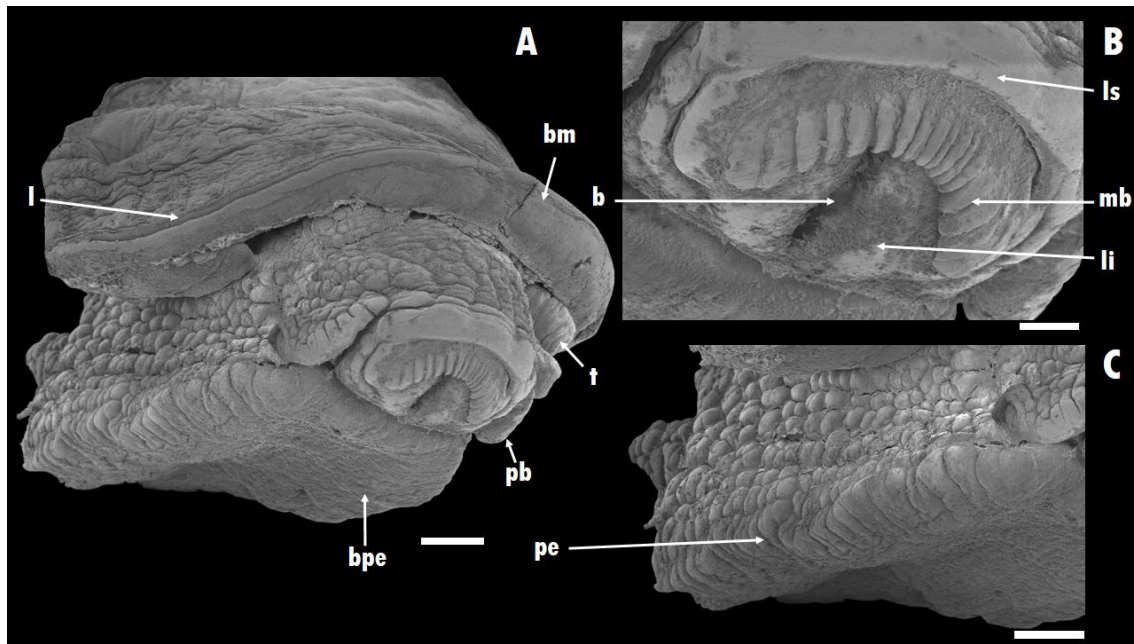
**Figura 1.2.2***Morfología general y masa visceral de Bulimulus bonariensis*

A- Vista lateral derecha. B- Vista lateral izquierda. C- Borde del manto. D- Región cefálica (MLP-Ma 15169/a). E- Detalle región bucal (MLP-Ma 15168/a).

*Abreviaturas:* base del pie (bpe), boca (b), borde del manto (bm), cavidad pericárdica (cp), cavidad pulmonar (cpl), glándula digestiva (gd), gonoporo (g), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), labio inferior (li), labio superior (ls), línea del collar (l), mandíbula (mb), palpo bucal (pb), pigmento (p), recto (re), riñón (r), tentáculo portador de ojo (t), tentáculo sensorial (ts), vena pulmonar (vp). Escala A-B= 5 mm. C-E=1 mm.

### Figura 1.2.3

Aspecto de *Bulimulus bonariensis* bajo MEB.



A- Vista latero- frontal derecha y parcialmente ventral. B- Detalle de las estructuras que limitan la boca. C- Vista latero- ventral derecha del pie. (MLP-Ma 15188/d).

Abreviaturas: base del pie (bpe), boca (b), borde del manto (bm), labio inferior (li), labio superior (ls), línea del collar (l), mandíbula (mb), palpo bucal (pb), pie (pe), tentáculo portador de ojo (t). Escala A, C= 500  $\mu$ m. B= 200  $\mu$ m.

#### 1.2.C.1.b. Órganos del manto

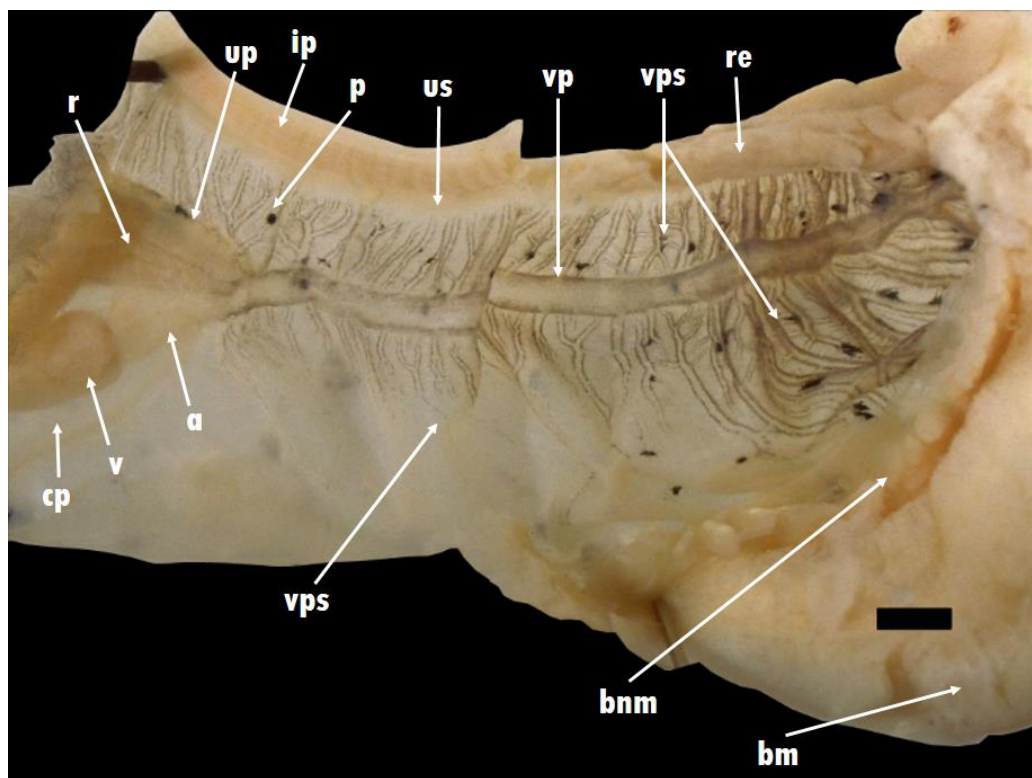
El pulmón ocupa la última vuelta del manto casi en su totalidad (**Fig. 1.2.2 A, B**). La cavidad pericárdica (**Fig. 1.2.4: cp**) está ubicada a la izquierda del riñón (**Fig. 1.2.4: r**) y tiene un diámetro menor aproximadamente igual al mismo y un diámetro mayor  $\sim 1/3$  más extenso, con la particularidad de encontrarse el 50% de la cavidad pericárdica dirigida posteriormente. El ventrículo (**Fig. 1.2.4: v**) tiene un tamaño ligeramente mayor que la aurícula (**Fig. 1.2.4: a**) y ambos se ubican del lado latero posterior izquierdo del animal (**Fig. 1.2.2 B**). Se continúa en una vena pulmonar (**Fig. 1.2.4: vp**) bien desarrollada, de similar calibre a lo largo de toda su extensión y que se dirige hasta llegar al borde nucal del manto (**Fig. 1.2.4: bnm**), paralelo al intestino posterior (**Fig. 1.2.4: ip**) y recto (**Fig. 1.2.4: re**). A ambos lados de la vena pulmonar hay vasos pulmonares conspicuos (**Fig. 1.2.4: vps**) y claramente diferenciables por pigmento definiendo sus bordes, excepto  $2/3$  de los vasos que se encuentran del lado izquierdo de la vena pulmonar; en estos vasos el pigmento va disminuyendo en cantidad

lo que dificulta la observación de todo su recorrido. En la **Figura 1.2.5** se observa como los vasos pulmonares poseen, a su vez, pequeños vasos laterales (**Fig. 1.2.5: vl**).

El riñón (**Fig. 1.2.4: r**) es ligeramente triangular y ocupa  $\sim 1/5$  del área pulmonar; el uréter primario (**Fig. 1.2.4: up**) corre paralelo al riñón y se dirige posteriormente, continuándose en un uréter secundario (**Fig. 1.2.4: us**) que es estrecho y paralelo al intestino posterior (**Fig. 1.2.4: ip**) y recto del lado izquierdo del mismo (**Fig. 1.2.4**). La abertura del uréter es poco conspicua, anterior y a la izquierda del ano.

**Figura 1.2.4**

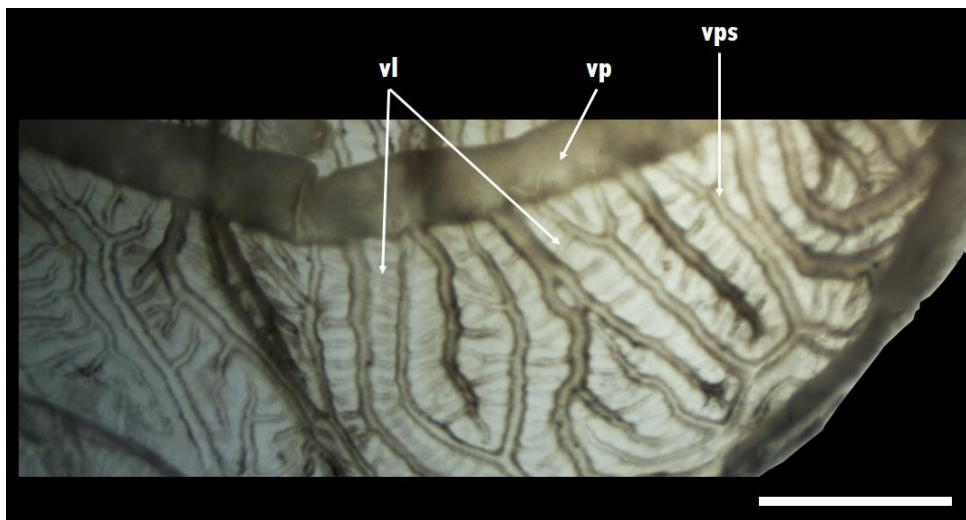
Órganos del manto de *Bulimulus bonariensis*



*Abreviaturas:* aurícula (a), borde nuchal del manto (bnm), borde del manto (bm), cavidad pericárdica (cp), intestino posterior (ip), pigmento (p), recto (re), riñón (r), uréter primario (up), uréter secundario (us), vena pulmonar (vp), vasos pulmonares (vps), ventrículo (v). (MLP-Ma 15169/a). Escala= 1 mm.

### Figura 1.2.5

#### Detalle de los vasos



Abreviaturas: vena pulmonar (vp), vasos laterales (vl), vasos pulmonares (vps). (MLP-Ma 15169/a). Escala= 1 mm.

#### 1.2.C.1.c. Sistema digestivo

El presente sistema se inicia con la boca, la cual se encuentra limitada dorsalmente por la mandíbula (**Fig. 1.2.7 A; Fig. 1.2.8 C: mb**), que tiene forma de herradura compuesta por un número variable de placas, entre 9-17, cada una de ellas con forma rectangular de ancho gradualmente mayor hacia los extremos de la misma, lo cual indica que a medida que el animal crece se van formando nuevas placas en el punto medio de la misma. El bulbo bucal (**Fig. 1.2.7: bb**) es de contorno lateral ovalado, desde su porción media dorsal el sistema se continúa en el esófago anterior (**Fig. 1.2.6 A; Fig. 1.2.7 A, B: ea**). En el extremo posterior del bulbo bucal se encuentra el saco radular (**Fig. 1.2.6 A; Fig. 1.2.7 A: sr**), lugar de origen de la cinta y dientes radulares. Ingresando al bulbo bucal, a ambos lados del esófago, se encuentran los conductos de las glándulas salivales (**Fig. 1.2.6; Fig. 1.2.7: cgs**). El bulbo bucal está limitado por una serie de músculos; dorsal y lateralmente se encuentra rodeado por el músculo peribucal (**Fig. 1.2.7 A, B: mpb**) que cubren completamente la rádula y el odontóforo. Dorso-lateralmente posee dos pequeños músculos, los dorsales del bulbo bucal (**Fig. 1.2.7 A, B: mdb**) que se insertan en el tegumento que contacta con el límite más dorsal de la mandíbula. De este punto se dirigen, de manera separada, hacia atrás y se insertan a ambos lados de la parte media del bulbo bucal, estos músculos son muy delgados y habitualmente se pierden durante la disección. En una vista ventral, el bulbo bucal tiene un par de músculos ventrales del bulbo bucal (**Fig. 1.2.7 C: mvb**), cada uno se origina

en la parte anterior del mismo muy cerca de la boca y luego se dirige en dirección postero-central al bulbo bucal y se inserta ventral al odontóforo. Cerrando ventralmente el bulbo bucal hay dos músculos peribucales ventrales (**Fig. 1.2.7 C: mpbv**). El músculo retractor del bulbo bucal (**Fig. 1.2.6, Fig. 1.2.7 A, C: mbb**) es un grueso paquete de musculatura, de extensa longitud, que se dirige ventral al sistema digestivo y es el encargado de retraer el bulbo bucal y, por protracción, la cabeza dentro de la última vuelta cuando el animal lo requiere.

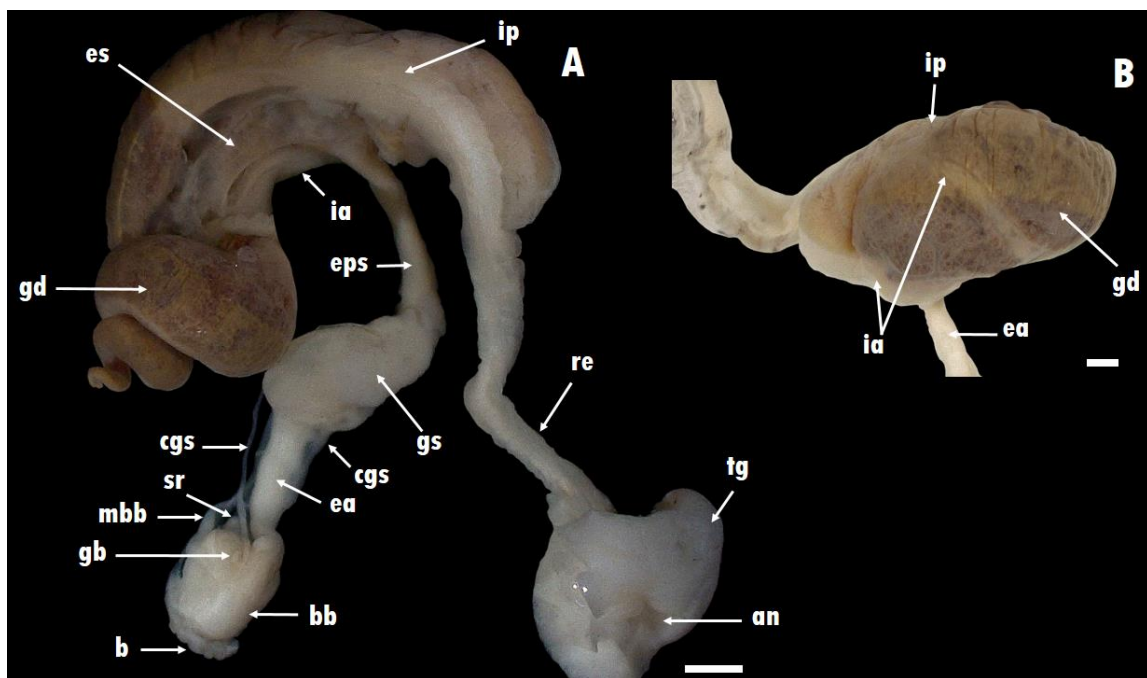
La rádula (**Fig. 1.2.8 A-B**) está conformada por aproximadamente 180 filas de dientes, cada una de las cuales se encuentra constituida por un diente central o raquídeo y 35 ( $\pm 2$ ) dientes hacia cada hemirádula, contabilizando tanto dientes laterales como marginales. El diente raquídeo (**Fig. 1.2.8 A: dr**) es apenas más pequeño respecto de los laterales, es tricúspide conformado por una cúspide central o mesocono que culmina en una punta roma y a cada lado posee un denticulo reducido. Los dientes laterales (**Fig. 1.2.8 A: dl**) son bicúspides de tamaño ligeramente mayor al raquídeo, cada diente lateral posee un mesocono cuyo extremo también culmina en una punta roma y el ectocono de cada lateral tiene aspecto triangular con su extremo en punta y se ubica en posición opuesta al diente central. El mesocono de los dientes laterales gradualmente se hace más largo y luego del lateral 17, dicha cúspide pasa a disponerse con cierta angulación apuntando hacia la parte central de la rádula. La base de los dientes raquídeos y laterales muestran hasta tres zonas de sujeción a la cinta radular. Los dientes marginales (**Fig. 1.2.8 B: dm**), últimos 15 ( $\pm 2$ ) a cada lado, son similares a los dientes laterales con la adición de un segundo denticulo al ectocono.

Las glándulas salivales (**Fig. 1.2.6: gs**) son dos masas blanquecinas alargadas dispuestas en la región dorsal del esófago medio. Cada cuerpo glandular posee un conducto de la glándula salival (**Fig. 1.2.6; Fig. 1.2.7: cgs**) que se dirige hacia la región anterior, a ambos lados del esófago anterior, e ingresa al bulbo bucal en una posición dorsal y posterior entre el esófago y el ganglio bucal. El esófago posee una disposición ventral al sistema reproductor y se dirige en dirección a la espira ocupando toda la longitud de la última vuelta. El esófago, respecto de la ubicación de las glándulas salivales, se lo divide en tres partes: un esófago anterior (**Fig. 1.2.6: ea**), un esófago medio el cual lleva dorsalmente los cuerpos de las glándulas salivales y un esófago posterior (**Fig. 1.2.6: ep**) de menor diámetro. Al contactar con la glándula digestiva el esófago da lugar al estómago (**Fig. 1.2.6: es**), el cual es un saco estrecho de delgadas paredes que se curva acompañando el desarrollo de la espira. Posteriormente, el sistema digestivo da un giro de 180° y se continua en un intestino anterior (**Fig. 1.2.6: ia**) que se ubica paralelo al estómago y luego se extiende dorsalmente al mismo en un nuevo giro

de 180°, haciéndose visible desde una vista externa de la espira (**Fig. 1.2.6 B**). El intestino posterior (**Fig. 1.2.6: ip**) se ubica periféricamente a la glándula digestiva y retorna en un nuevo giro de 180° hacia la parte anterior del animal, desembocando a través del recto (**Fig. 1.2.6: re**) en un ano (**Fig. 1.2.6: an**) ubicado en el lateral derecho del animal, en una posición media. Respecto de la glándula digestiva (**Fig. 1.2.6: gd**), la porción anterior de la misma contiene y engloba el estómago e intestino, la porción más posterior es de ~ 3 1/2 vueltas que se dispone rodeando y protegiendo a la gónada.

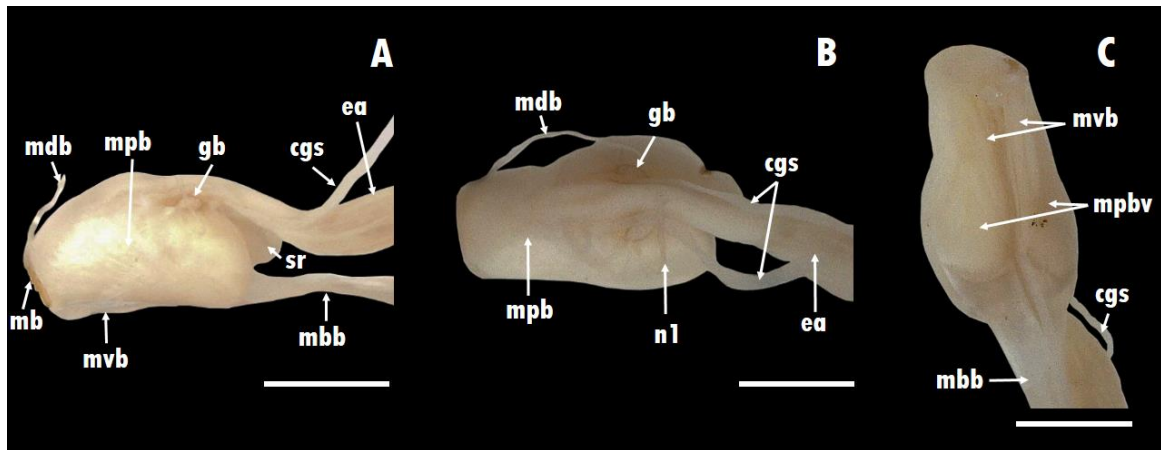
### Figura 1.2.6

*Sistema digestivo completo de Bulimulus bonariensis*



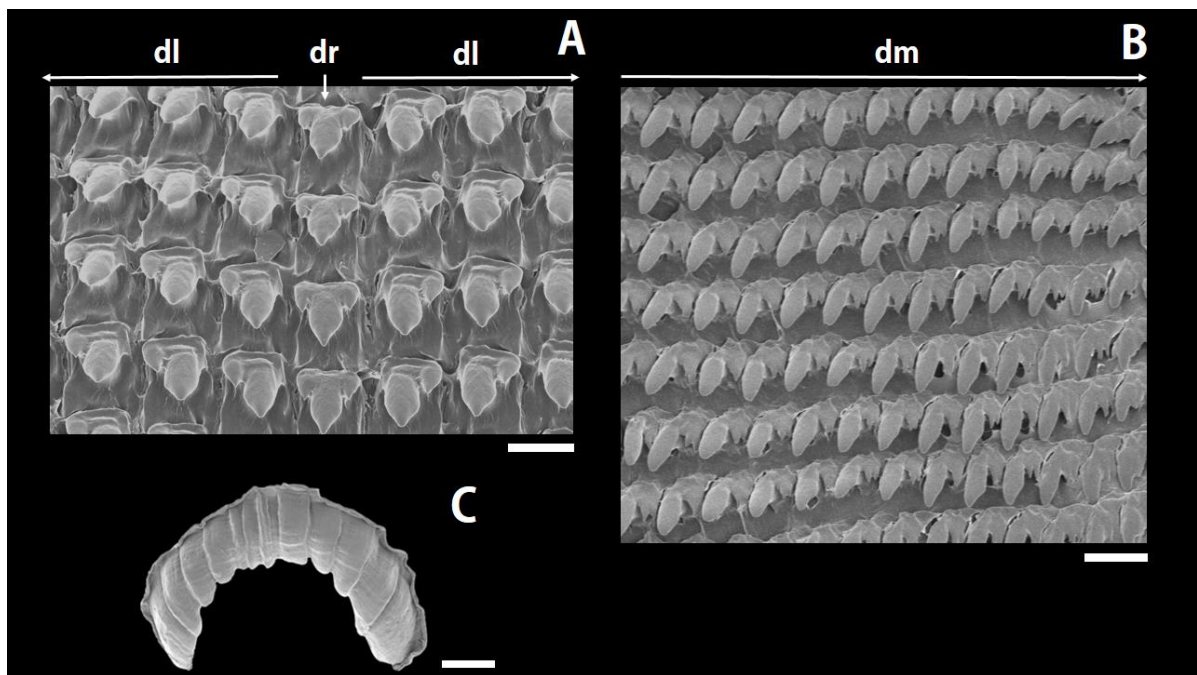
**A-** Vista general del sistema digestivo. **B-** Vista externa del recorrido del intestino en la glándula digestiva. (MLP-Ma 15168/e).

*Abreviaturas:* ano (an), boca (b), bulbo bucal (bb), conducto de la glándula salival (cgs), esófago anterior (ea), esófago posterior (eps), estómago (es), ganglio bucal (gb), glándula digestiva (gd), glándula salival (gs), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), músculo retractor del bulbo bucal (mbb), recto (re), saco radular (sr), tegumento (tg). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.7***Bulbo bucal de Bulimulus bonariensis*

A-Vista lateral. B- Vista dorsal. C- Vista ventral. (MLP-Ma 15168/e).

Abreviaturas: conducto de la glándula salival (cgs), esófago anterior (ea), ganglio bucal (gb), mandíbula (mb), músculo dorsal del bulbo bucal (mdb), músculo retractor del bulbo bucal (mbb), músculo peribucal (mpb), músculo peribucal ventral (mpbv), músculo ventral del bulbo bucal (mvb), nervio (n1), saco radular (sr). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.8***Rádula y mandíbula de Bulimulus bonariensis*

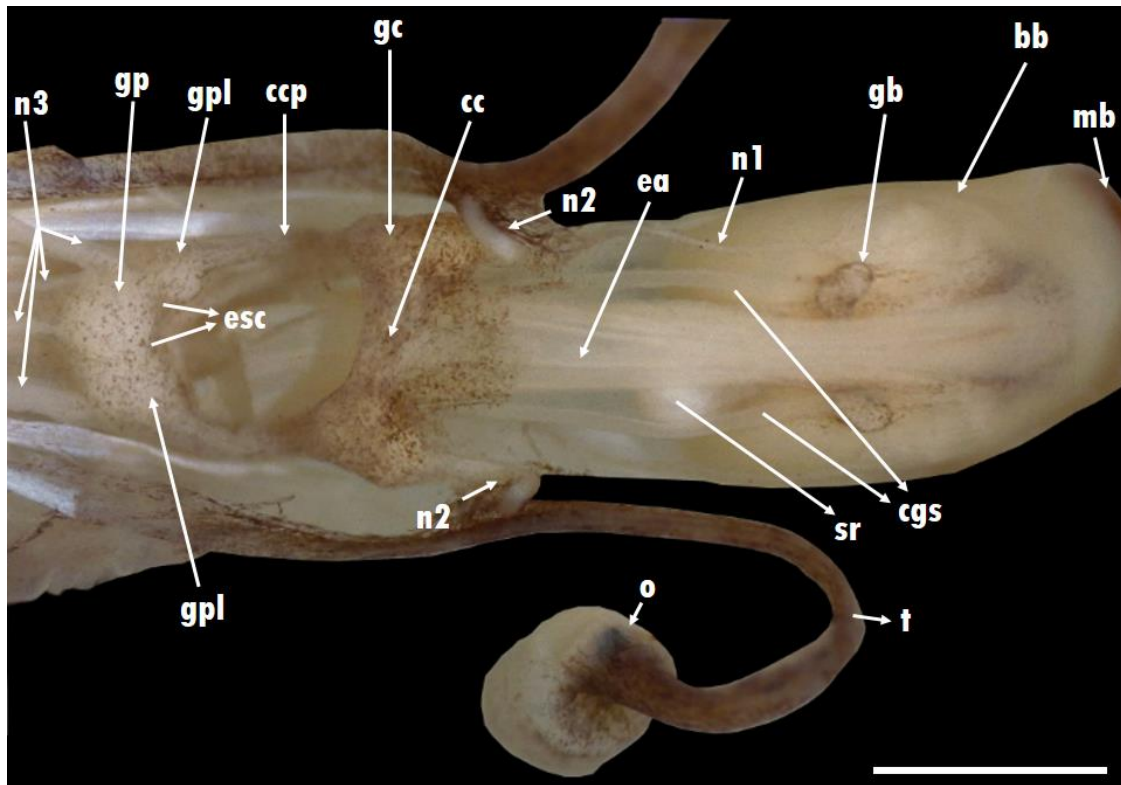
A- Segmento radular mostrando dientes raquídeos (dr) y dientes laterales (dl). B- Vista lateral con dientes marginales (dm). (MLP-Ma 15166). Escala A-B= 20 µm. C= 200 µm.

#### **1.2.C.1.d. Sistema nervioso central**

El sistema nervioso central está posicionado posteriormente respecto al bulbo bucal rodeando al esófago anterior, se encuentra conformado por un par de ganglios cerebrales dorso-laterales (**Fig. 1.2.9: gc**), claramente diferenciables entre sí y unidos por un gran conectivo cerebral (**Fig. 1.2.9: cc**). De los ganglios cerebrales, de aspecto bilobulado, parten nervios (**Fig. 1.2.9: n1**), hacia delante hasta el bulbo bucal, para inervar un par de ganglios bucales (**Fig. 1.2.9: gb**) ubicados en la parte media del mismo y postero-laterales al inicio del esófago. Además, de los ganglios cerebrales, parten nervios (**Fig. 1.2.9: n2**) hacia los tentáculos. Los ganglios pedales están ampliamente fusionados formando un ganglio pedial de posición central (**Fig. 1.2.9: gp**) y a ambos lados, aunque fusionados al anterior, se diferencian los ganglios pleurales (**Fig. 1.2.9: gpl**), que se relacionan con los ganglios cerebrales por conectivos cerebro-pleurales (**Fig. 1.2.9: ccp**). Sólo hay una pequeña escotadura (**Fig. 1.2.9: esc**) que diferencia el par ganglionar pleural del pedal, relicto del conectivo pleuro-pedal. De esta masa ganglionar parten nervios (**Fig. 1.2.9: n3**), que corresponden a los cordones nerviosos pedales y pleurales, que se dirigen hacia la parte posterior del animal ventralmente al sistema digestivo.

**Figura 1.2.9**

*Sistema nervioso central de Bulimulus bonariensis*



*Abreviaturas:* bulbo bucal (bb), conducto de la glándula salival (cgs), conectivo cerebral (cc), conectivo cerebro-pleural (ccp), escotadura (esc), esófago anterior (ea), ganglio bucal (gb), ganglio cerebral (gc), ganglio pedial (gp), ganglio pleural (gpl), mandíbula (mb), nervio (n1-3), ojo (o), saco radular (sr), tentáculo portador de ojo (t). (MLP-Ma 15168/a). Escala= 1 mm.

### 1.2.C.1.e. Sistema reproductor

La descripción del presente sistema se realizó en todos los casos partiendo de la gónada en dirección al gonoporo, para finalizar se describe el complejo peniano.

El sistema reproductor se inicia en la gónada hermafrodita, ovotestis (**Fig. 1.2.10: ov**). El ovotestis se encuentra ubicado desde la segunda hasta la tercer o cuarta vuelta de la espira alojado en la región más interna de la glándula digestiva y rodeada periféricamente por la misma sin entremezclarse. Está constituida por 3 lóbulos, que en algunos ejemplares se presenta como si fuera una estructura única aunque al observar los conductos lobulares (**Fig. 1.2.11 A: cl**) se visualizan los tres, en otros ejemplares cada uno de los tres lóbulos se puede distinguir con claridad (**Fig. 1.2.11 B**), por último, también se han visualizado ejemplares que poseen 4 lóbulos, 2 anteriores y 2 lóbulos posteriores muy próximos entre sí (**Fig. 1.2.11 C**). Cada uno de los lóbulos se encuentra compuesto por acinos o folículos dispuestos paralelamente (**Fig. 1.2.11: f**), los lóbulos

se disponen uno detrás de otro y cada uno de ellos se continúa en un delgado conducto lobular, los cuales se van uniendo y extienden hasta el conducto hermafrodita. El conducto hermafrodita (**Fig. 1.2.10: ch**) posee una coloración que varía entre blanquecino, beige a tostado siendo casi en su totalidad replegado, de recorrido sinuoso y enrollado que se extiende hasta la base del receptáculo seminal, siendo recto el corto tramo antes de contactarlo. El receptáculo seminal (**Fig. 1.2.10: rs**), está en asociación a la glándula del albumen, ubicado en la región media y cóncava de la misma, tiene el aspecto de un saco angosto de 1 mm de longitud en promedio. La glándula del albumen (**Fig. 1.2.10: gla**) es una estructura de color beige, elíptica de gran tamaño, ~1/3 la longitud del espermioviducto, y se encuentra ubicada en el lateral izquierdo del animal; está conformada por un lóbulo dirigido hacia la espira, con el receptáculo seminal debajo y la cámara del albumen en dirección al espermioviducto (**Fig. 1.2.10: eo**). Este último, se dispone dorsal al digestivo, en la última vuelta del animal, dirigiéndose de izquierda a derecha en dirección a la vagina, es un conducto intensamente replegado en el área opuesta a la glándula prostática y de desarrollo variable a lo largo del año (ver **Capítulo 2.2.-** de la presente tesis). Asociado íntimamente al espermioviducto, se encuentra la glándula prostática (**Fig. 1.2.10: pr**) de color blanquecina, que ocupa el lado no replegado del mismo y se extiende a lo largo de su recorrido. El último tramo se adelgaza y se une a la vagina en el punto donde se encuentra inserto el conducto de la bursa copulatrix.

La bursa copulatrix (**Fig. 1.2.10: bc**) es una estructura redondeada de tono blanco o rosado ubicada cerca de la glándula del albumen, pero alejada de la misma por el primer tramo del conducto de la bursa copulatrix (**Fig. 1.2.10: cbc**), el cual es delgado durante ese trayecto. Luego el conducto se ensancha casi al triple del diámetro y discurre paralelamente al espermioviducto teniendo en este trayecto ambas estructuras igual longitud.

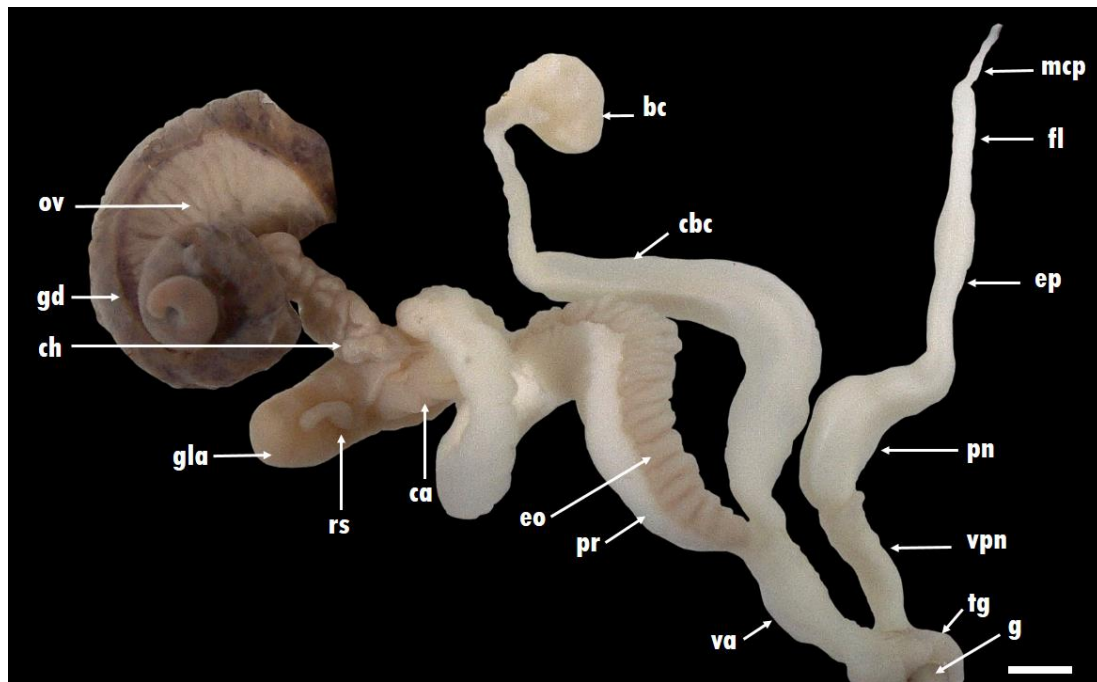
Por otro lado, el complejo peniano se une con la vagina (**Fig. 1.2.10: va**) y desemboca al exterior en un gonoporo común (**Fig. 1.2.10: g**) de contorno redondeado ubicado del lado derecho del animal, anterior e inmediatamente por detrás y debajo del segundo par de tentáculos.

En el animal, el complejo peniano comienza con la porción correspondiente a la vaina del pene (**Fig. 1.2.10: vpn**) que se dirige anteriormente hacia la cabeza, para luego, el pene (**Fig. 1.2.10: pn**), retomar el recorrido hacia atrás pasando dorsalmente al bulbo bucal y entre los músculos retractores de los tentáculos. El pene se continúa en un epifalo (**Fig. 1.2.10: ep**) de longitud variable, y luego en un flagelo (**Fig. 1.2.10: fl**) al cual se asocia el músculo retractor del complejo peniano (**Fig. 1.2.10: mcp**) que se

inserta terminal a éste y lo relaciona con el mesotelio que recubre la masa visceral. Respecto del complejo peniano, se identificaron proporciones distintas de las regiones que lo componen y morfologías claramente diferentes a nivel del pene (**Fig. 1.2.12 A - Fig. 1.2.12 H**). Con el fin de comprobar que las diferencias entre entidades dentro de *B. bonariensis* se encuentran en manifiesto al observar la estructura copuladora, en la **Tabla 1.2.2** se indica para cada morfología de complejo peniano encontrado, las morfologías conquiolares, el lote/ejemplar y la localidad/provincia al que pertenece. También se observa en la **Figura 1.2.13** un mapa para ilustrar la distribución de los ejemplares cuyas configuraciones de complejos penianos, constituyen claramente estructuras distintas entre sí. A continuación se describe cada morfología de complejo peniano encontrada, cada una de las cuales corresponde a un morfotipo distinto de la especie *B. bonariensis*:

- Morfología del complejo peniano “A” (**Fig. 1.2.12 A**): La longitud del flagelo corresponde a  $\frac{1}{2}$  del epifalo y es apenas más angosto que éste; epifalo de igual longitud al pene considerando el área ocupada por la vaina del pene y es  $\frac{1}{3}$  del ancho del pene; el pene es ancho cerca al epifalo y se angosta en la región próxima a la vaina del pene, ésta última es  $\frac{1}{2}$  de la longitud total peniana.
- Morfología del complejo peniano “B” (**Fig. 1.2.12 B**): La longitud del flagelo es  $\frac{3}{4}$  de la longitud del epifalo y, al igual que la morfología anterior, es apenas más angosto; la longitud del epifalo corresponde a  $\frac{1}{2}$  de la longitud total peniana y a  $\frac{1}{4}$  del grosor de la parte del pene más cercana a éste; el pene en la región próxima al flagelo posee forma ovalada y esta parte ocupa la mitad de la longitud total peniana, la vaina del pene es la mitad de ancha que la parte antes mencionada.
- Morfología del complejo peniano “C” (**Fig. 1.2.12 C**): El flagelo es muy corto  $\frac{1}{8}$  de la longitud del epifalo; el epifalo es extenso siendo más largo que la longitud total peniana; el pene es  $\frac{3}{4}$  del largo del epifalo y, a diferencia de las morfologías anteriores, mantiene el ancho constante a lo largo de toda la longitud peniana.
- Morfología del complejo peniano “D” (**Fig. 1.2.12 D**): La longitud del flagelo es  $\frac{1}{3}$  del epifalo; el epifalo tiene aproximadamente la misma longitud que la longitud total peniana y es  $\frac{1}{2}$  del ancho de la región más proximal del pene; el pene en su parte próxima al epifalo y hasta la vaina del pene posee el mismo grosor aproximado y en la región de la vaina del pene es  $\frac{1}{2}$  de ancho.

- Morfología del complejo peniano “E” (**Fig. 1.2.12 E**): El flagelo es aproximadamente igual de largo que el epifalo; el epifalo tiene aproximadamente la misma longitud que el pene sin la región de la vaina del pene; el pene en la parte próxima al epifalo es el doble de ancho que éste y la región de la vaina del pene es ligeramente más ancha.
- Morfología del complejo peniano “F” (**Fig. 1.2.12 F**): El flagelo es  $\frac{1}{2}$  del largo del epifalo; el epifalo es aproximadamente  $\frac{1}{2}$  de la longitud total peniana; el pene en la región próxima al epifalo se comienza a ensanchar hasta alcanzar el doble del ancho, luego hacia la vaina del pene se adelgaza nuevamente.
- Morfología del complejo peniano “G” (**Fig. 1.2.12 G**): La longitud del flagelo es aproximadamente igual a la del epifalo aunque es  $\frac{1}{2}$  de su ancho; el epifalo es ligeramente más largo que el pene sin considerar la vaina del pene; el pene en su parte proximal al epifalo es el doble de ancho que éste y se afina hacia la vaina del pene y la región de la vaina del pene es  $\frac{1}{2}$  de la longitud total peniana.
- Morfología del complejo peniano “H” (**Fig. 1.2.12 H**): La longitud del flagelo es  $\frac{1}{2}$  del epifalo; el epifalo es aproximadamente igual de largo que la longitud total peniana; el pene es el doble de ancho al epifalo en la región proximal a éste luego se adelgaza levemente y mantiene el mismo grosor hasta el final de la vaina del pene.

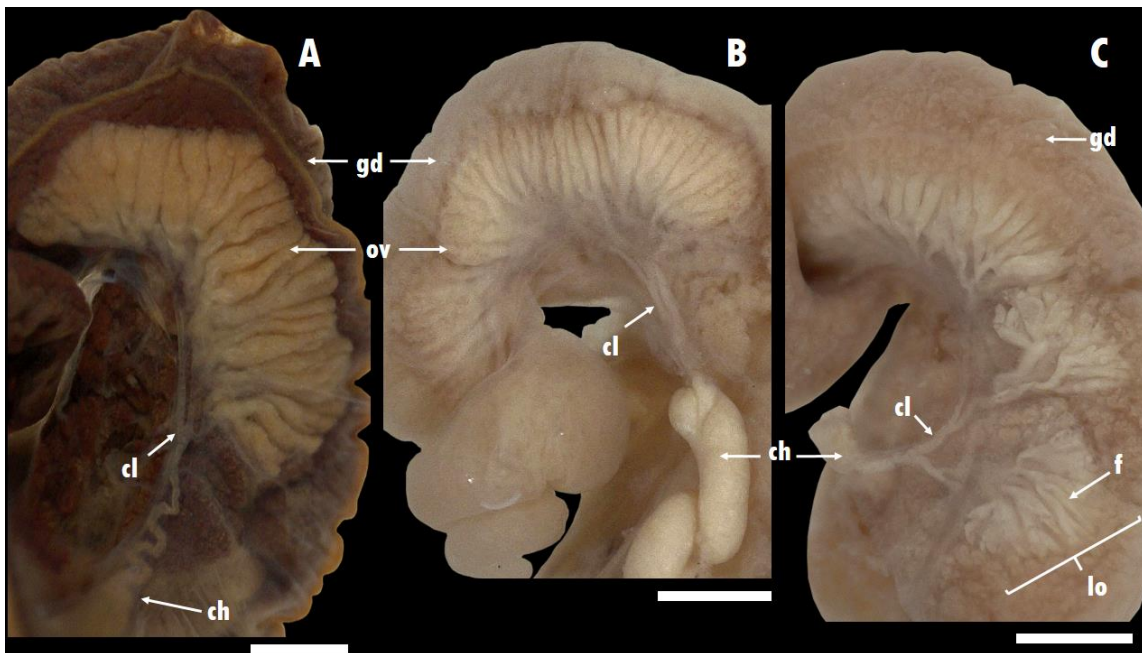
**Figura 1.2.10***Sistema reproductor de Bulimulus bonariensis*

Vista general del sistema reproductor completo. (MLP-Ma 15166).

*Abreviaturas:* bursa copulatrix (bc), cámara del albumen (ca), conducto hermafrodita (ch), conducto de la bursa copulatrix (cbc), epifalo (ep), espermioviducto (eo), flagelo (fl), glándula del albumen (gla), glándula digestiva (gd), gonoporo (g), músculo retractor del complejo peniano (mcp), ovotestis (ov), receptáculo seminal (rs), tegumento (tg), pene (pn), próstata (pr), vagina (va), vaina del pene (vp). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.11**

Detalle del ovotestis de *Bulimulus bonariensis*

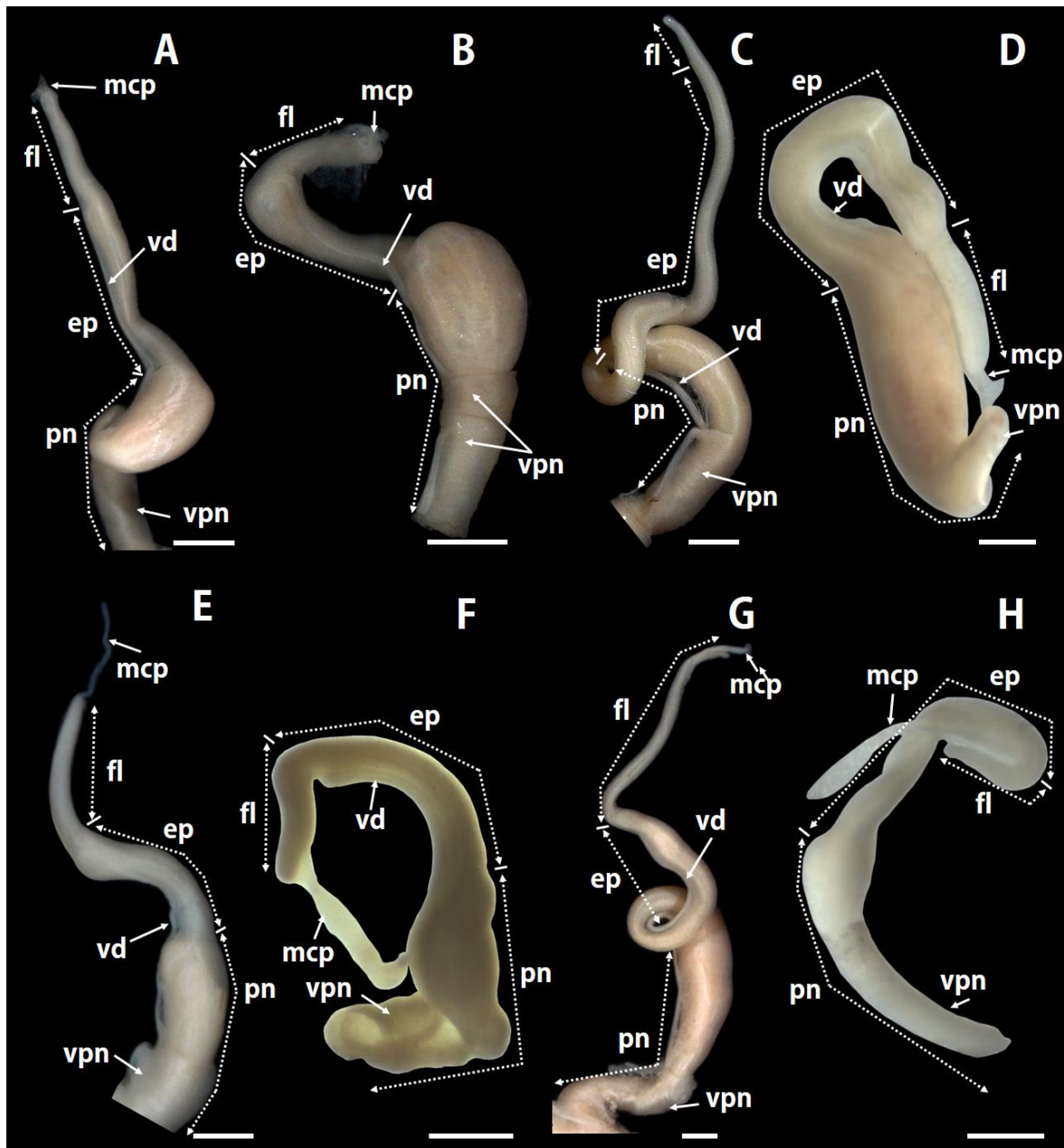


Detalle de la gónada. **A-** ovotestis con aspecto de estructura única (MLP-Ma 15168/c). **B-** ovotestis con los tres lóbulos bien definidos (MLP-Ma 15167). **C-** ovotestis conformada por cuatro lóbulos (MLP-Ma 15169/a).

*Abreviaturas:* conducto hermafrodita (ch), conducto lobular (cl), folículo (f), glándula digestiva (gd), lóbulo del ovotestis (lo), ovotestis (ov). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.12**

Variación morfológica del complejo peniano en *Bulimulus bonariensis*



A- MLP-Ma 15169/f. B- MLP-Ma 15188/c. C- MLP-Ma 15178/a. D- MLP-Ma 15184/g. E- 14544/e. F- MLP-Ma 15160/a. G- IBS Ma 362-2. H- MLP-Ma 14522.

Abreviaturas: epifalo (ep), flagelo (fl), músculo retractor del complejo peniano (mcp), pene (pn), vaso deferente (vd), vaina del pene (vpn). Escala= 1 mm.

**Tabla 1.2.2***Morfologías de complejo peniano y conquiolares asociadas*

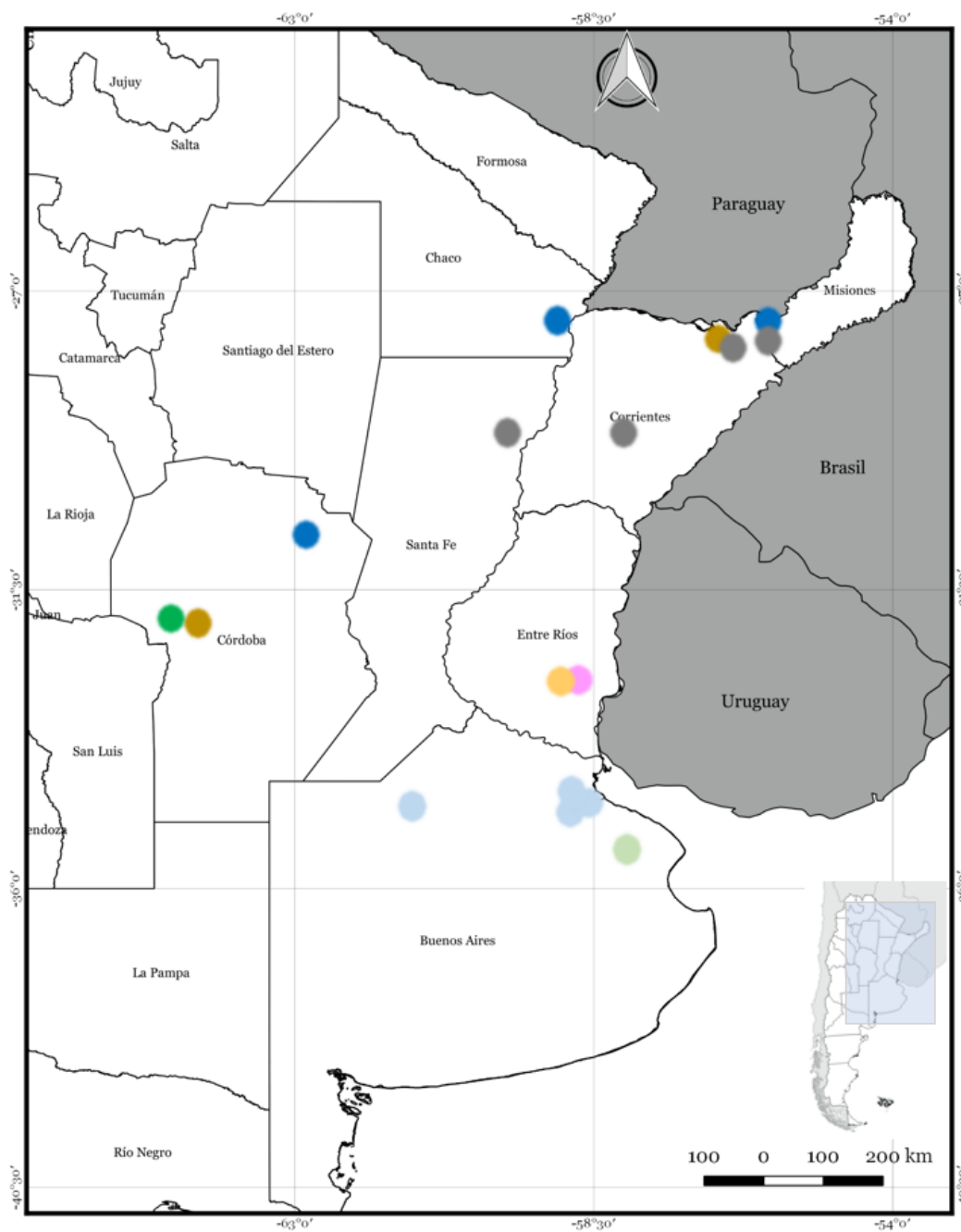
MORFOLOGÍA DEL COMPLEJO PENIANO	MORFOLOGÍA CONQUIOLAR	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	LOCALIDAD/ PROVINCIA
<b>A</b>	A	MLP-Ma 14630/a	Los Toldos/Bs. As.
	A	MLP-Ma 15167	Fcio. Varela/Bs. As
	A	MLP-Ma 15169/f	Fcio. Varela/Bs. As
	C	MLP-Ma 15166	Fcio. Varela/Bs. As
	B	MLP-Ma 15168/b	Fcio. Varela/Bs. As
	C	MLP-Ma 15168/c	Fcio. Varela/Bs. As
	C	MLP-Ma 15168/d	Fcio. Varela/Bs. As
	A	MLP-Ma 15169/a	Fcio. Varela/Bs. As
	A	MLP-Ma 15169/b	Fcio. Varela/Bs. As
	B	MLP-Ma 15169/c	Fcio. Varela/Bs. As
	B	MLP-Ma 15169/d	Fcio. Varela/Bs. As
	A	MLP-Ma 15169/e	Fcio. Varela/Bs. As
	A	MLP-Ma 14629/a	La Plata/Bs. As.
	C	MLP-Ma 14629/b	La Plata/Bs. As.
	A	MLP-Ma 14629/d	La Plata/Bs. As.
	A	MLP-Ma 14629/e	La Plata/Bs. As.
	B	MLP-Ma 14629/f	La Plata/Bs. As.
	A	MLP-Ma 14643	La Plata/Bs. As.
<b>B</b>	C	MLP-Ma 14544/b	Larroque/Entre Ríos
	C	MLP-Ma 15188/a	Larroque/Entre Ríos
	A	MLP-Ma 15188/b	Larroque/Entre Ríos
	B	MLP-Ma 15188/d	Larroque/Entre Ríos
	B	MLP-Ma 15188/e	Larroque/Entre Ríos
	A	MLP-Ma 15188/c	Larroque/Entre Ríos
<b>C</b>	A	MLP-Ma 15178/a	Resistencia/Chaco
	C	MLP-Ma 15178/b	Resistencia/Chaco
	A	MLP-Ma 15178/c	Resistencia/Chaco
	B	MLP-Ma 15178/d	Resistencia/Chaco
	A	MLP-Ma 15178/e	Resistencia/Chaco
	B	MLP-Ma 15183/a	Miramar/Córdoba
	B	MLP-Ma 15183/b	Miramar/Córdoba
	A	MLP-Ma 15183/c	Miramar/Córdoba
	A	IBS-Ma 393	Posadas/Misiones
	A	IBS-Ma 363	Posadas/Misiones
<b>D</b>	A	MLP-Ma 14825/e	Ituzaingó/Corrientes
	A	MLP-Ma 14825/f	Ituzaingó/Corrientes
	B	MLP-Ma 14825/g	Ituzaingó/Corrientes
	A	MLP-Ma 15184/a	V. del Dique/Córdoba
	A	MLP-Ma 15184/b	V. del Dique/Córdoba
	C	MLP-Ma 15184/c	V. del Dique/Córdoba
	A	MLP-Ma 15184/d	V. del Dique/Córdoba
	A	MLP-Ma 15184/e	V. del Dique/Córdoba
	C	MLP-Ma 15184/f	V. del Dique/Córdoba
	A	MLP-Ma 15184/g	V. del Dique/Córdoba
<b>E</b>	C	MLP-Ma 14544/e	Larroque/Entre Ríos
<b>F</b>	A	MLP-Ma 15160/a	Chascomús/Bs. As.
	C	MLP-Ma 15160/b	Chascomús/Bs. As.
<b>G</b>	A	MLP-Ma 15186/a	Mercedes/Corrientes
	A	MLP-Ma 15186/b	Mercedes/Corrientes

Continuación **Tabla 1.2.2**

	C	MLP-Ma 15186/c	Mercedes/Corrientes
	A	MLP-Ma 14825/b	Ituzaingó/Corrientes
	B	MLP-Ma 14825/c	Ituzaingó/Corrientes
	B	MLP-Ma 14825/d	Ituzaingó/Corrientes
	B	IBS-Ma 486	Posadas/Misiones
	A	IBS-Ma 362-2	Avellaneda/Santa Fé
	A	IBS-Ma 362-3	Avellaneda/Santa Fé
<b>H</b>	B	MLP-Ma 14522/a	V. Gral. Belgrano/Córdoba

**Figura 1.2.13**

Localización de los ejemplares de *Bulimulus bonariensis* según la morfología del complejo peniano



Referencias: Morfologías A, B, C, D, E, F, G, H

### **Caracterización histológica del complejo peniano con morfología “A”**

El complejo peniano se encuentra anatómicamente diferenciado en flagelo, epifalo y pene (**Fig. 1.2.10; Fig. 1.2.12 A**). En la **Figura 1.2.14** se indican los distintos niveles donde se realizó el corte transversal y a continuación se caracteriza cada una de estas porciones desde su estructura histológica:

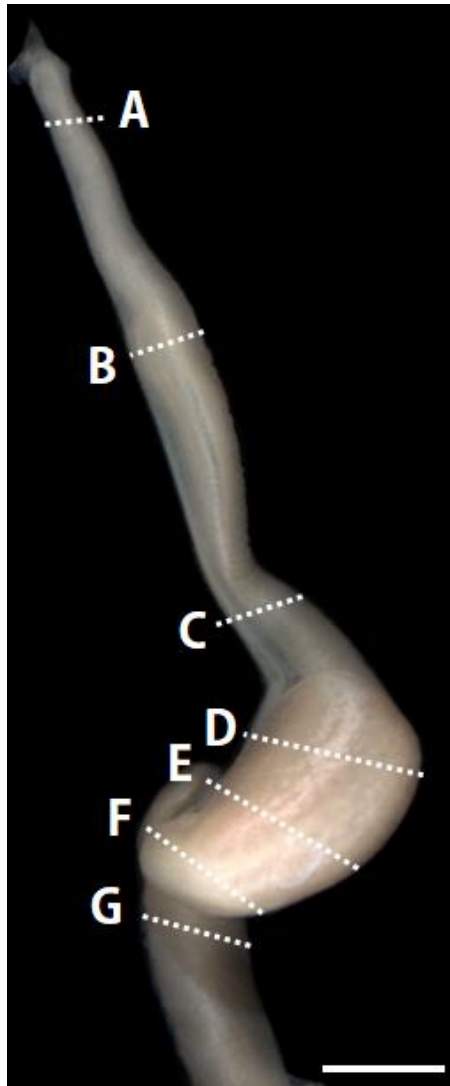
El flagelo (**Fig. 1.2.14 A**) es una estructura tubular que termina ciego, forma el extremo del complejo peniano y se encuentra conectado por un lado al músculo retractor del complejo peniano y por otro se encuentra limitado por la ubicación hasta la cual llega el vaso deferente. Se encuentra limitado externamente por una delgada capa de musculatura circular, se caracteriza por presentar abundantes y voluminosas células glandulares (**Fig. 1.2.15 A: fl**).

El epifalo (**Fig. 1.2.14 B, C**) es una porción con abundante musculatura circular, posee una luz con aspecto de estrella, en el extremo cercano al pene (**Fig.1.2. 15 C: ep**), pero hacia el flagelo los extremos de la luz se van bifurcando (**Fig.1.2.15 B: ep**), dicha luz está tapizada por un epitelio cilíndrico con cilios de corta longitud, debajo del mismo presenta células glandulares subepiteliales (**Fig.1.2.16 A**). En asociación al epifalo, por medio de fibras musculares, se encuentra el vaso deferente (**Fig.1.2.15 B, C: vd**) que discurre en paralelo a él a lo largo de toda su extensión. El epitelio del vaso deferente es también cúbico, pero en este caso se encuentra tapizado por cilios largos (**Fig.1.2.16 B: vd**).

La región más distal del complejo peniano corresponde al pene (**Fig.1.2.14 D-G**), fácil de distinguir anatómicamente por ser una región de mayor calibre. En los cortes transversales se puede observar que la luz del pene (**Fig.1.2.15 G: pn**) se ubica central en la base del complejo peniano y luego pasa a ubicarse lateral (**Fig.1.2.15 D-F**). Su luz está tapizada por un epitelio cilíndrico alto, con citoplasma basófilo y núcleos basales (**Fig.1.2.16 C: pn**). Periféricamente, se encuentra rodeado por una serie de divertículos penianos (**Fig.1.2.15 D-G: dp**) repletos de una secreción que mantiene la turgencia de la estructura. Los divertículos penianos reducen su número en dirección al epifalo (**Fig.1.2.15 D-G: dp**), la luz de los mismos se encuentran tapizados por un epitelio cilíndrico, más bajo en relación a la luz del pene, con un citoplasma basófilo y núcleo basal (**Fig.1.2.16 C, D: dp**). Externamente, el pene está limitado por una delgada capa de musculatura circular (**Fig.1.2.15 D-G: mc**) (**Fig.1.2.16 D**). La base del pene se encuentra rodeada por la vaina del pene (**Fig.1.2.15 G: vpn**) que contiene al vaso deferente.

**Figura 1.2.14**

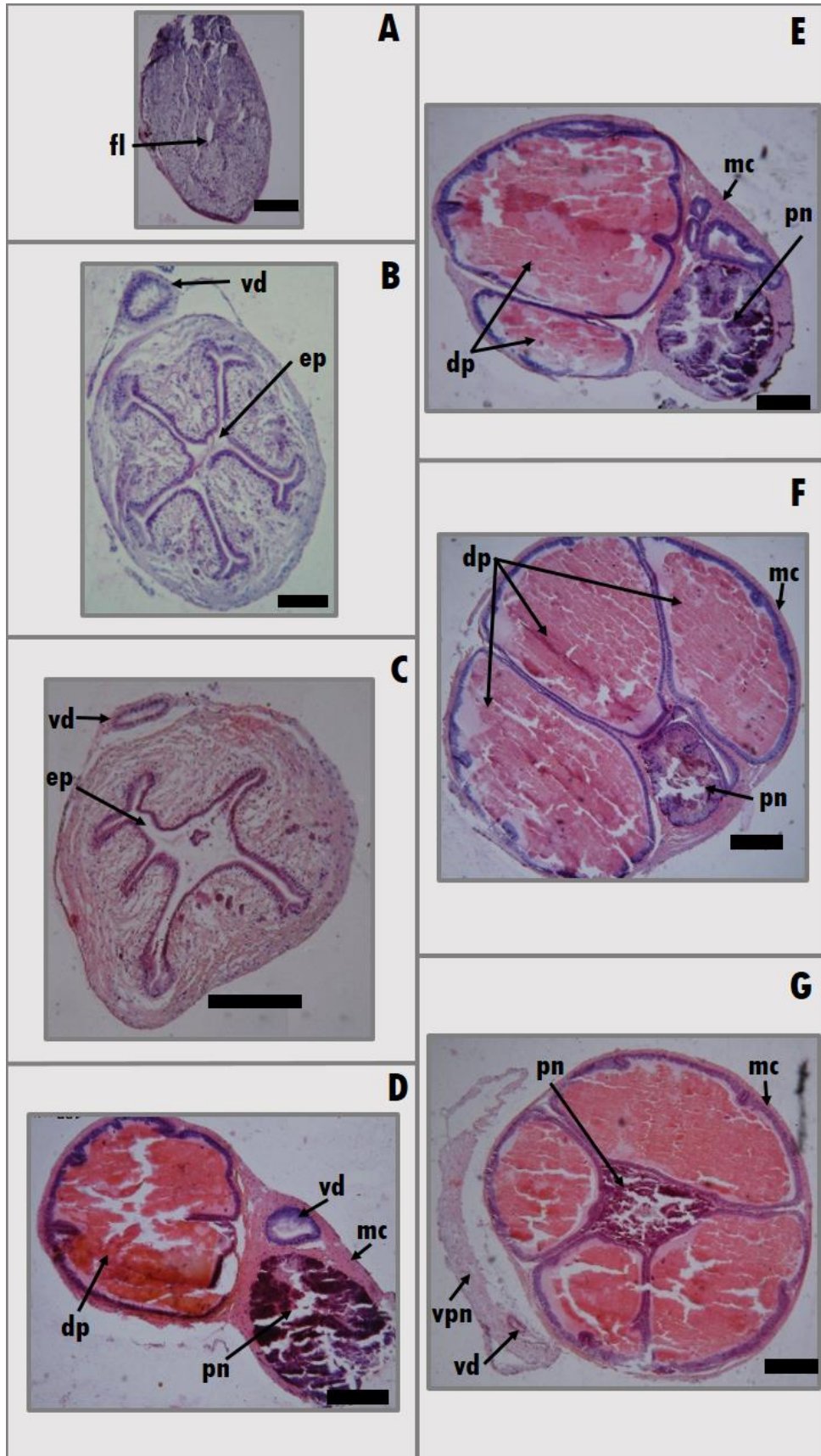
Complejo peniano con morfología "A" de *Bulimulus bonariensis*, típico de la provincia de Buenos Aires



Las letras denotan los distintos niveles de corte transversal. (MLP-Ma 15169/f). **A**-Extremo del flagelo. **B**-Epifalo. **D-G** Pene. Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.15**

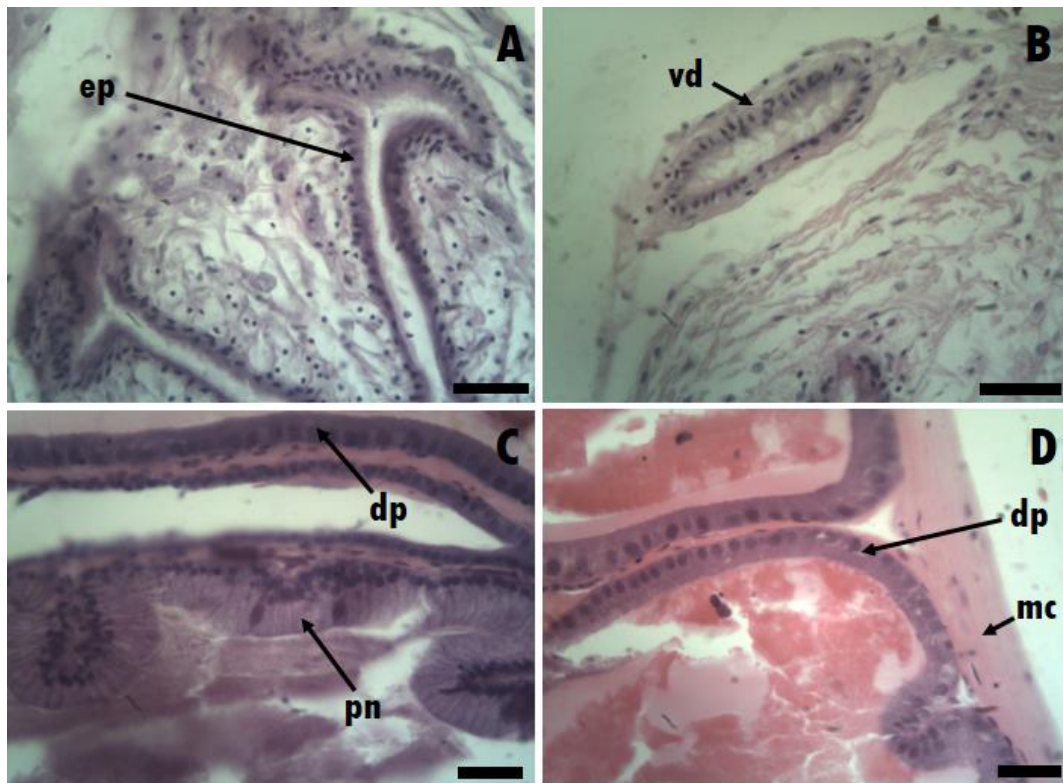
*Cortes transversales del complejo peniano de Bulimulus bonariensis*



A- Corte transversal a la altura del extremo del flagelo (fl). **B, C**- Epifalo (ep) con vaso deferente (vd). **D-G**. Cortes a distintos niveles del pene, mostrando la disposición de los divertículos penianos (dp), ubicación de la luz del pene (pn), vaso deferente (vd) y vaina del pene (vpn). (MLP-Ma 15166). Escala A, C-G= 200  $\mu$ m, B= 100  $\mu$ m.

### Figura 1.2.16

*Detalle de los tipos celulares encontrados en el complejo peniano de Bulimulus bonariensis*



A- Epitelio del epifalo (ep), cilíndrico ciliado con células glandulares subepiteliales. B- Vaso deferente (vd), con epitelio cúbico ciliado. C- Epitelio del pene (pn), cilíndrico alto y divertículo peniano (dp), con epitelio cilíndrico bajo. D- Divertículo peniano (dp) y musculatura circular (mc) que lo rodea. (MLP-Ma 15166). Escala= 20  $\mu$ m.

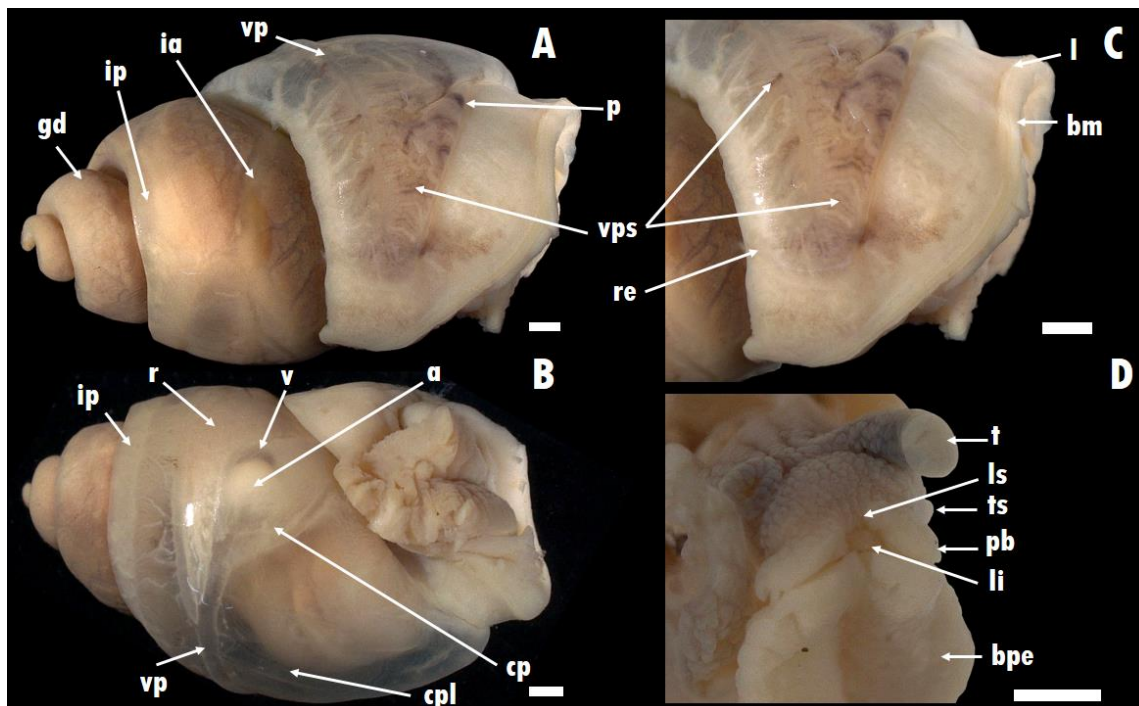
### **1.2.C.2. *Bulimulus vesicalis***

#### **1.2.C.2.a. Morfología general y masa visceral**

Al igual que la especie antes descrita el tegumento es de color beige claro a marrón (**Fig. 2.1.17**), con pigmento también concentrado en ciertas regiones como músculos retractores de los tentáculos (**Fig. 2.1.17 D: t**), región del manto correspondiente a la última vuelta (**Fig. 1.2.17 A, C**) y algunas veces limitando los vasos de la cavidad pulmonar; no se ha visualizado en relación al sistema nervioso central.

La región céfalo-pedal incluyendo las estructuras asociadas a la cabeza como el labio inferior, labio superior, palpo bucal, tentáculo portador de ojo, tentáculo sensorial, como la ubicación del gonoporo común, pneumostoma y pie es semejante a *B. bonariensis* (**Fig.1.2.17 D**).

Al extraer las partes blandas de la conchilla se observa la glándula digestiva de coloración marrón y ocupa ~ 3 1/2 vueltas (**Fig. 1.2.17 A: gd**). La misma contiene, en su lóbulo posterior, aproximadamente en la segunda vuelta, el ovotestis. El lóbulo anterior de la glándula digestiva es el de mayor tamaño y al igual que en la especie anterior contiene las mismas estructuras digestivas y reproductoras. En la última vuelta del animal se observa externamente la cavidad pulmonar y los órganos del manto asociados (**Fig. 2.1.17 A-C**). Al igual que en la especie antes descrita, el borde del manto es grueso, con pigmento disperso (**Fig.1.2.17 A: p**) y una delgada línea del collar (**Fig.1.2.17 C: l**) delimitando la zona de formación de la conchilla.

**Figura 1.2.17***Morfología general y masa visceral de Bulimulus vesicalis*

A- Vista lateral derecha. B- Vista ventral. C- Borde del manto. D- Región cefálica. (MLP-Ma 15157).

*Abreviaturas:* aurícula (a), base del pie (bpe), borde del manto (bm), cavidad pericárdica (cp), cavidad pulmonar (cpl), glándula digestiva (gd), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), labio inferior (li), labio superior (ls), línea del collar (l), palpo bucal (pb), pigmento (p), recto (re), riñón (r), tentáculo portador de ojo (t), tentáculo sensorial (ts), vena pulmonar (vp), ventrículo (v). Escala= 1 mm.

### 1.2.C.2.b. Órganos del manto

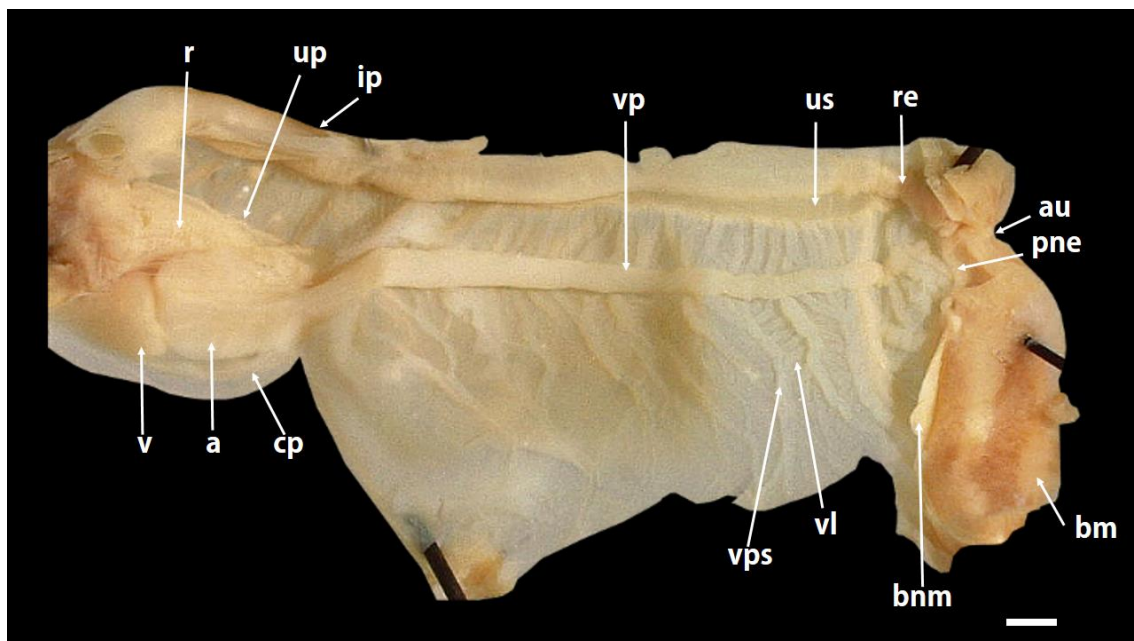
Con respecto a la ubicación del pulmón, también se dispone ocupando la última vuelta del animal; la cavidad pericárdica se ubica postero-ventral del lado izquierdo (**Fig. 1.2.17 B: cp**). En relación al riñón, la cavidad pericárdica (**Fig. 1.2.18: cp**) posee un diámetro mayor aproximadamente igual, dispuesta a la izquierda del riñón y sin encontrarse desplazada en sentido posterior como en la especie antes descrita. En cuanto al diámetro menor la cavidad pericárdica es  $\sim 1/2$  más grande. La aurícula (**Fig. 1.2.18: a**) es de mayor tamaño respecto del ventrículo (**Fig. 1.2.18: v**), la vena pulmonar (**Fig. 1.2.18: vp**) posee un mayor calibre cerca a la aurícula y se adelgaza gradualmente en dirección al pneumostoma (**Fig. 1.2.18: pne**), se observó la presencia de un gran número de vasos pulmonares (**Fig. 1.2.18: vps**) bien definidos a ambos lados de la vena pulmonar y vasos laterales (**Fig. 1.2.18: vl**), semejante a la especie anteriormente

descrita. En algunos ejemplares de la presente especie también se pudo apreciar la delimitación de los vasos por pigmento.

El riñón (**Fig. 1.2.18: r**) con forma de triángulo isósceles ocupa  $\sim 1/4$  del área pulmonar, a su derecha se encuentra el uréter primario (**Fig. 1.2.18: up**) claramente diferenciable, el cual se dirige en sentido posterior y se continúa en un uréter secundario (**Fig. 1.2.18: us**) de mayor calibre y paralelo al intestino posterior y recto para luego desembocar al exterior a través de una abertura del uréter (**Fig. 1.2.18: au**) muy pequeña a la izquierda del recto.

### Figura 1.2.18

Órganos del manto de *Bulimulus vesicalis*



*Abreviaturas:* abertura del uréter (au), aurícula (a), borde nuchal del manto (bnm), borde del manto (bm), cavidad pericárdica (cp), intestino posterior (ip), pneumostoma (pne), recto (re), riñón (r), uréter primario (up), uréter secundario (us), vena pulmonar (vp), vasos laterales (vl), vasos pulmonares (vps), ventrículo (v). (MLP-Ma 14685/b). Escala= 1 mm.

#### 1.2.C.2.c. Sistema digestivo

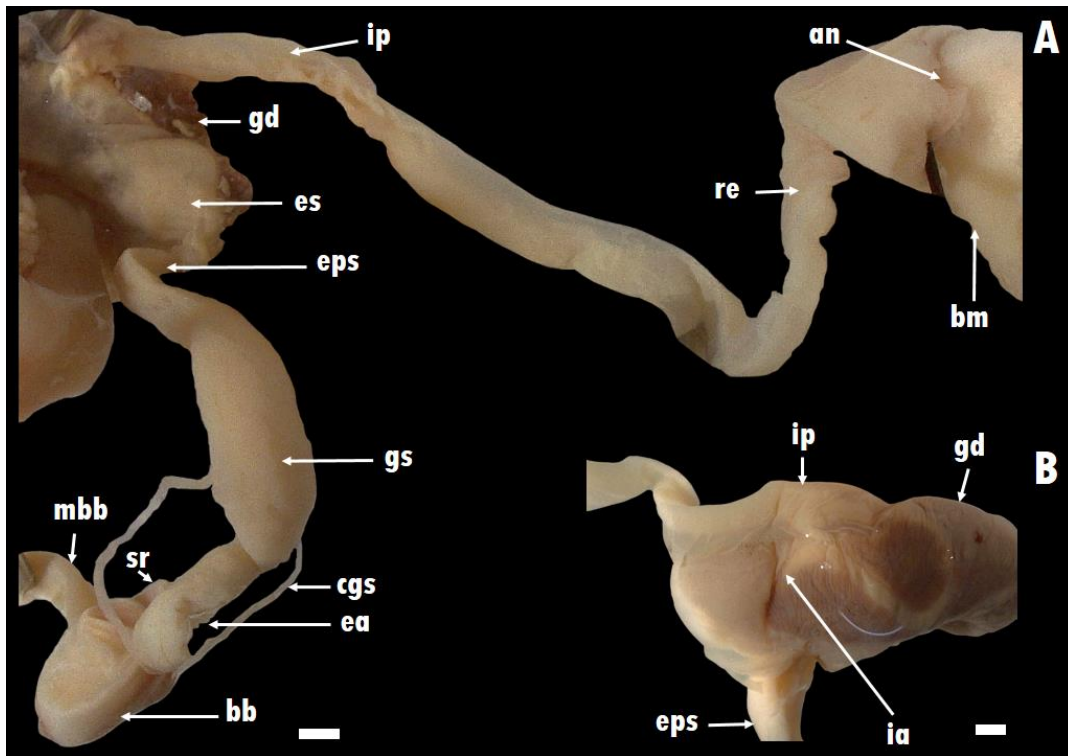
El sistema digestivo (**Fig. 1.2.19**) se inicia con la boca (**Fig. 1.2.20 C: b**) que se encuentra flanqueada dorsalmente por la mandíbula (**Fig. 1.2.20 A, C: mb**) con forma de herradura compuesta por un número también variable de placas, entre 13-15, cada una de ellas de forma rectangular (**Fig. 1.2.21 C**), al igual que lo observado en *B.*

*bonariensis* el ancho de las mismas es de menor a mayor desde el punto medio de la mandíbula hacia los extremos. Se continúa en un bulbo bucal (**Fig. 1.2.19: bb; Fig. 1.2.20**) de contorno redondeado. En el extremo opuesto del bulbo bucal se encuentra el saco radular (**Fig. 1.2.19; Fig. 1.2.20 A, B: sr**), en la porción postero-dorsal se continúa en el esófago anterior (**Fig. 1.2.19; Fig. 1.2.20 A, B: ea**) y a ambos lados del mismo los conductos de las glándulas salivales (**Fig. 1.2.19; Fig. 1.2.20 A, B: cgs**). Los músculos que cierran dorsal y lateralmente el bulbo bucal son los peribucales (**Fig. 1.2.20 B: mpb**). Dorso-lateralmente, también presentan dos pequeños músculos dorsales del bulbo bucal (**Fig. 1.2.20 A, B: mdb**). Lateralmente, el par de músculos ventrales del bulbo bucal (**Fig. 1.2.20 A, B: mvb**), se disponen desde el tegumento próximo al borde externo de la mandíbula y cada uno de ellos se dirige hacia la región ventro-lateral para contactar con el gran músculo retractor del bulbo bucal (**Fig. 1.2.19; Fig. 1.2.20 A, B, C: mbb**).

Los músculos peribucales ventrales (**Fig. 1.2.20 C: mpbv**) cierran la región ventral del bulbo bucal.

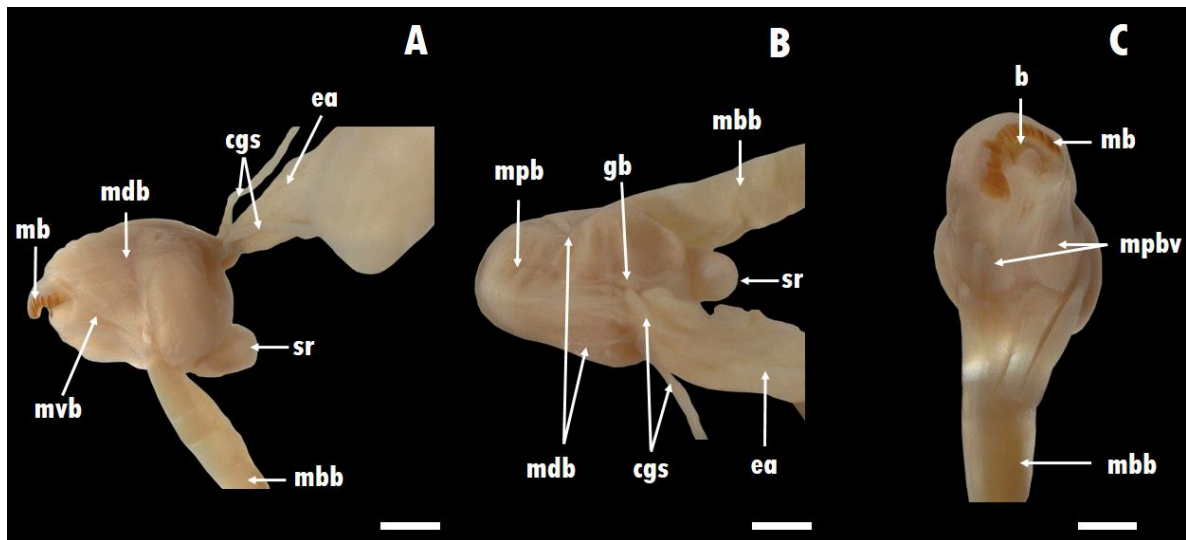
La rádula (**Fig. 1.2.21 A, B**) está conformada por aproximadamente 130 filas de dientes, cada una de las cuales se encuentra constituida por un diente raquídeo y alrededor de 30 ( $\pm 2$ ) dientes hacia cada hemirádula, contabilizando tanto dientes laterales como marginales. El diente raquídeo es tricúspide (**Fig. 1.2.21 B: dr**), los dientes laterales son bicúspides (**Fig. 1.2.21 B: dl**) y los marginales con mesocono y un ectocono formado por dos dentículos (**Fig. 1.2.21 A: dm**) poseen igual conformación a la rádula descrita para *B. bonariensis*. En esta especie la base de los dientes raquídeos posee tres zonas de sujeción a la cinta radular y en los laterales se observan hasta cuatro.

En cuanto al esófago, glándulas salivales, conductos de las glándulas salivales, estómago, intestino, recto y ano se observaron iguales características respecto de la especie descrita anteriormente (**Fig. 1.2.19 A-B**).

**Figura 1.2.19***Sistema digestivo completo de Bulimulus vesicalis*

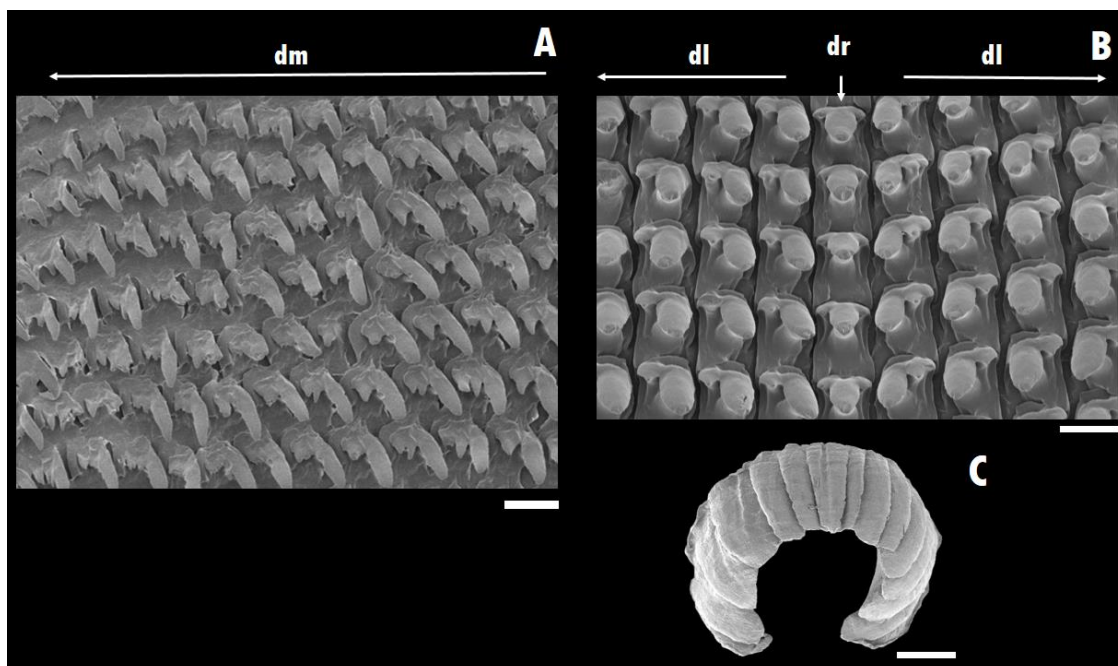
**A-** Vista general del sistema digestivo. **B-** Vista externa del recorrido del intestino en la glándula digestiva. (MLP-Ma 15157).

*Abreviaturas:* ano (an), borde del manto (bm), bulbo bucal (bb), conducto de la glándula salival (cgs), esófago anterior (ea), esófago posterior (eps), estómago (es), glándula digestiva (gd), glándula salival (gs), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), músculo retractor del bulbo bucal (mbb), recto (re), saco radular (sr). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.20***Bulbo bucal de Bulimulus vesicalis*

A-Vista lateral. B- Vista dorsal. C- Vista ventral. (MLP-Ma 15157).

*Abreviaturas:* boca (b), conducto de la glándula salival (cgs), esófago anterior (ea), ganglio bucal (gb), mandíbula (mb), músculo dorsal del bulbo bucal (mdb), músculo retractor del bulbo bucal (mbb), músculo peribucal (mpb), músculo peribucal ventral (mpbv), músculo ventral del bulbo bucal (mvb), saco radular (sr). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.21***Rádula y mandíbula de Bulimulus vesicalis*

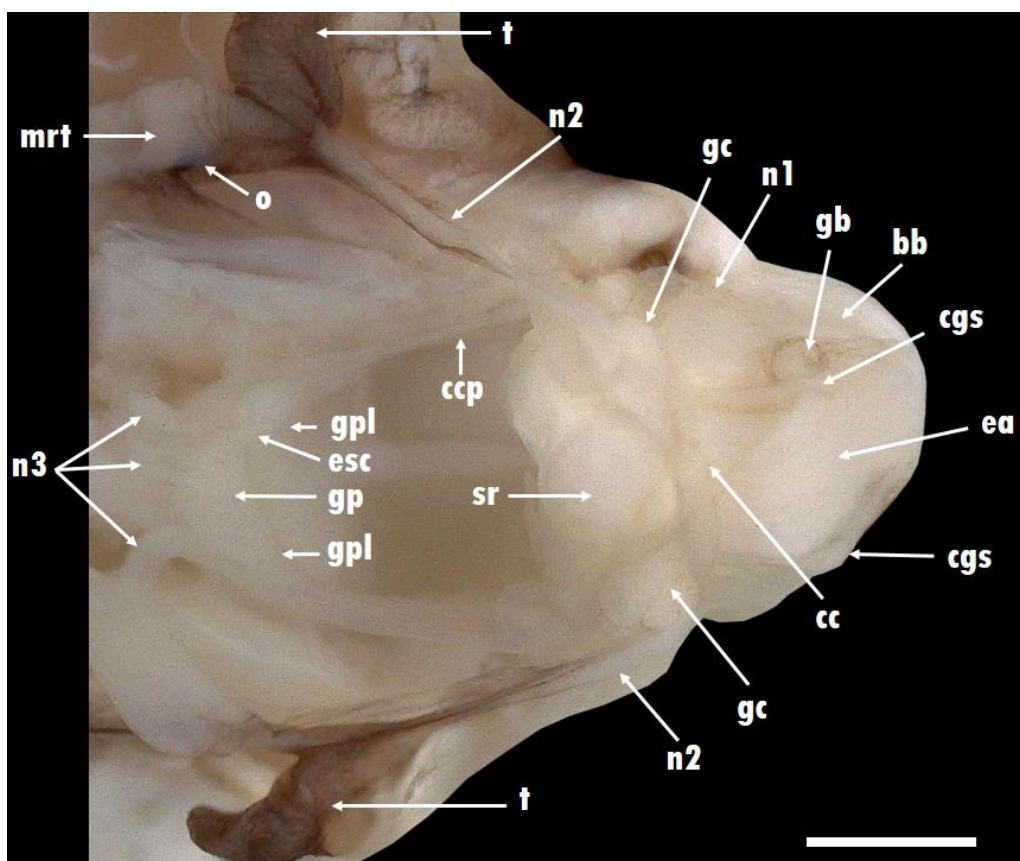
A- Vista lateral mostrando dientes marginales (dm). B- Segmento radular con dientes raquídeos (dr) y dientes laterales (dl). (MLP-Ma 14685/b). Escala A-B= 20  $\mu$ m. C= 200  $\mu$ m.

### 1.2.C.2.d. Sistema nervioso central

El sistema nervioso central (**Fig. 1.2.22**) incluye ganglios cerebrales (**Fig. 1.2.22: gc**), bucales (**Fig. 1.2.22: gb**), pedales (**Fig. 1.2.22: gp**), pleurales (**Fig. 1.2.22: gpl**), conectivo cerebral (**Fig. 1.2.22: cc**) y nervios (**Fig. 1.2.22: n1, n2, n3**) posee una configuración general igual a la especie antes descrita, sólo se aprecia una mayor longitud de ambos conectivo cerebro- pleural (**Fig. 1.2.22: ccp**).

**Figura 1.2.22**

*Sistema nervioso central de Bulimulus vesicalis*

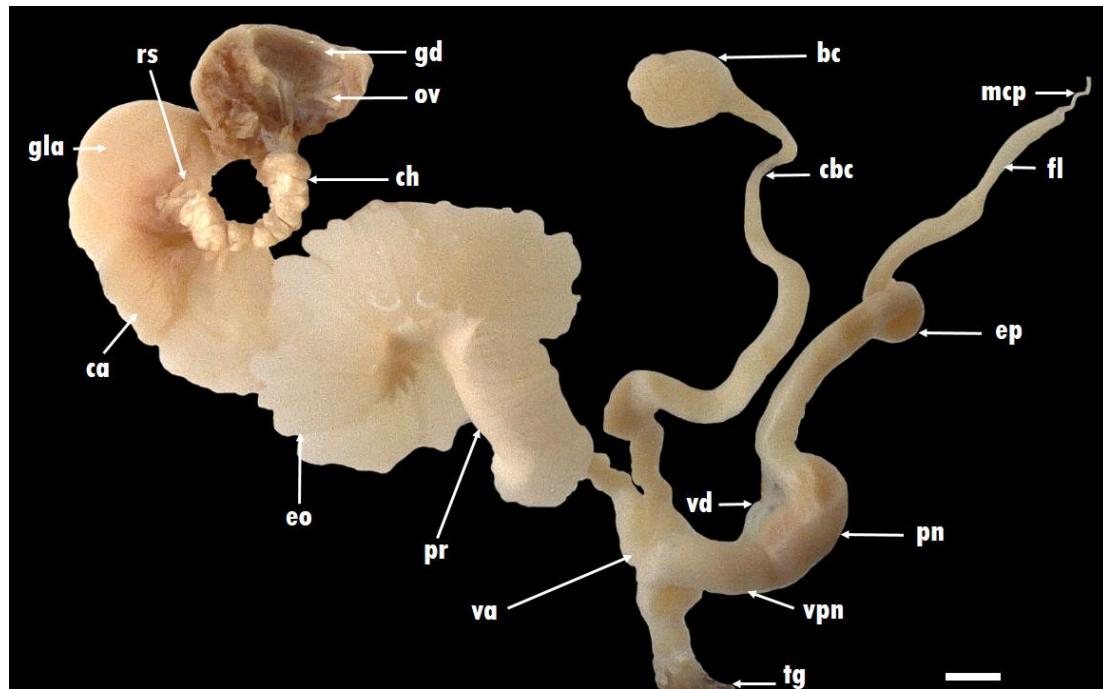


*Abreviaturas:* bulbo bucal (bb), conducto de la glándula salival (cgs), conectivo cerebral (cc), conectivo cerebro-pleural (ccp), escotadura (esc), esófago anterior (ea), ganglio bucal (gb), ganglio cerebral (gc), ganglio pedial (gp), ganglio pleural (gpl), músculo retractor del tentáculo (mrt), nervio (n1-3), ojo (o), saco radular (sr), tentáculo portador de ojo (t). (MLP-Ma 15157). Escala= 1 mm.

### 1.2.C.2.e. Sistema reproductor

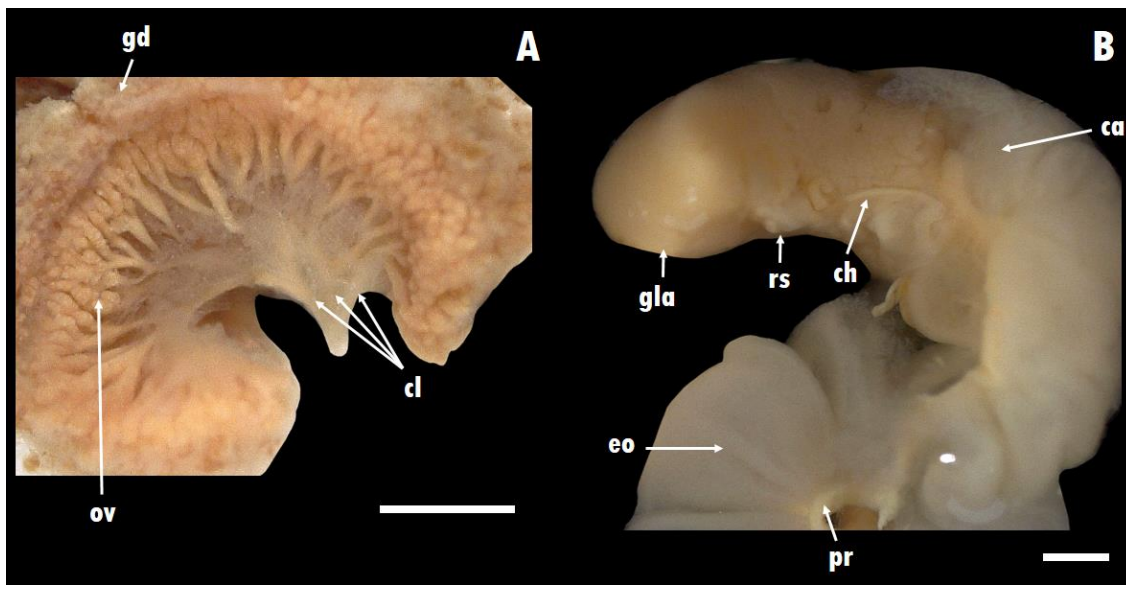
El presente sistema (**Fig. 1.2.23**) es en aspecto general muy similar a la especie *B. bonariensis*, sólo presenta ligeras variaciones que son detalladas a continuación. Partiendo del ovotestis (**Fig. 1.2.23: ov**) se observó que, en los ejemplares estudiados, no se presenta una diferenciación en lóbulos dando el aspecto de una estructura única, aunque se observa la presencia de los 3 conductos lobulares (**Fig. 1.2.24 A: cl**); a continuación las características del conducto hermafrodita (**Fig. 1.2.23; Fig. 1.2.24 B: ch**), glándula del albumen (**Fig. 1.2.23; Fig. 1.2.24 B: gla**), receptáculo seminal (**Fig. 1.2.23; Fig. 1.2.24 B: rs**), cámara del albumen (**Fig. 1.2.23; Fig. 1.2.24 B: ca**), espermioviducto (**Fig. 1.2.23; Fig. 1.2.24 B: eo**), próstata (**Fig. 1.2.23; Fig. 1.2.24 B: pr**) y bursa copulatrix (**Fig. 1.2.23: bc**) son semejantes a las descritas para *B. bonariensis*. Con respecto al conducto de la bursa copulatrix (**Fig. 1.2.23: cbc**) también es delgado en el tramo más cercano a la bursa, pero luego se ensancha al doble de su diámetro y es, al igual que en *B. bonariensis*, este trayecto del conducto el que discurre adyacente al espermioviducto hasta la vagina. Posee una vagina (**Fig. 1.2.23: va**) de corta extensión antes de unirse con el complejo peniano y desembocar en el gonoporo común.

El complejo peniano, en el animal se posiciona de igual manera que en *B. bonariensis*. Se encuentra conformado por el músculo retractor del complejo peniano que también es de inserción terminal (**Fig. 1.2.23: mcp**). A nivel del flagelo (**Fig. 1.2.23: fl**) no se observó una diferencia sustancial respecto de *B. bonariensis*, es 1/3 del largo del epifalo. Respecto del epifalo (**Fig. 1.2.23: ep**), aunque su longitud también mostró ser variable, en la mayor parte de los ejemplares examinados es tres veces la longitud del pene. La vaina del pene (**Fig. 1.2.23: vpn**) y pene (**Fig. 1.2.23: pn**) sin diferencias morfológicas respecto a la especie antes mencionada, siendo el pene de contorno ovalado.

**Figura 1.2.23***Sistema reproductor de Bulimulus vesicalis*

Vista general del sistema reproductor completo. (MLP-Ma 15157).

*Abreviaturas:* bursa copulatrix (bc), cámara del albumen (ca), conducto hermafrodita (ch), conducto de la bursa copulatrix (cbc), epifalo (ep), espermioviducto (eo), flagelo (fl), glándula del albumen (gla), glándula digestiva (gd), músculo retractor del complejo peniano (mcp), ovotestis (ov), receptáculo seminal (rs), tegumento (tg), pene (pn), próstata (pr), vagina (va), vaina del pene (vpn). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.24***Detalle del sistema reproductor*

**A-** Se muestra la gónada y los tres conductos lobulares antes llegar al conducto hermafrodita. **B-** Detalle de la glándula del albumen en vista ventral, se aprecia el receptáculo seminal y conducto hermafrodita. (MLP-Ma 14685/a).

*Abreviaturas:* cámara del albumen (ca), conducto hermafrodita (ch), conducto lobular (cl), espermioviducto (eo), glándula del albumen (gla), glándula digestiva (gd), ovotestis (ov), receptáculo seminal (rs), próstata (pr). Escala= 1 mm.

### Caracterización histológica del complejo peniano

Como se viene mencionando, el complejo peniano está formado por flagelo, epifalo y pene. La **Figura 1.2.25** señala los niveles donde se realizó el corte transversal y a continuación se caracteriza cada una de estas regiones.

El flagelo corresponde al extremo del complejo peniano a partir del cual se extiende el musculo retractor, su extremo terminal es ciego y se limita basalmente por el punto hasta el cual llega el vaso deferente. En esta especie el flagelo (**Fig. 1.2.25 A; Fig. 1.2.26 A: fl**) se caracteriza por tener una luz con forma de “Y” que gradualmente se va haciendo más pequeña y que está tapizada por un epitelio cilíndrico alto con citoplasma eosinófilo y núcleos basales (**Fig. 1.2.27 A: fl**). Es una estructura, en este caso, bien muscular (**Fig. 1.2.27 A**) casi desprovista de células glandulares.

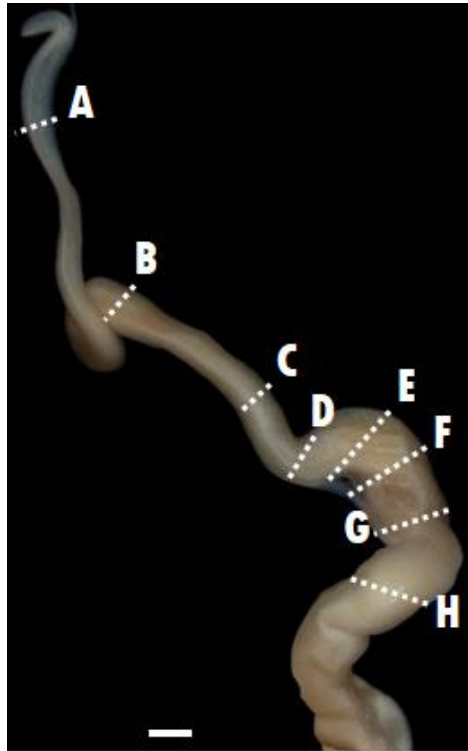
El epifalo (**Fig. 1.2.25 B; Fig. 1.2.26 B, C: ep**), del lado más cercano al flagelo, posee una luz con aspecto de cruz que tiene los extremos bifurcados. Dicha luz está tapizada por un epitelio cilíndrico con cilios de corta longitud y abundantes células glandulares con los cuellos dispuestos entre las células epiteliales (**Fig.1.2.27 B: ccg**),

externamente el epifalo está limitado por musculatura circular (**Fig. 1.2.26 B-D: mc**) la cual también contiene al vaso deferente (**Fig. 1.2.26 B-D: vd**). El vaso deferente está tapizado por un epitelio cúbico provisto de largos cilios (**Fig.1.2.27 B: vd**). En el extremo cercano al pene (**Fig.1.2.25 C**), algunos divertículos penianos (**Fig. 1.2.26 C: dp**) continúan acompañando lateralmente al epifalo.

A la altura del pene (**Fig. 1.2.25 D-H**), al igual que se describió en *B. bonariensis*, la luz del mismo se dispone central en la base (**Fig.1.2.26 H: pn**), luego se observa la presencia de divertículos penianos rodeándolo (**Fig.1.2.26 G: dp**) que pasa a ubicarse gradualmente en una posición lateral (**Fig.1.2.26 D-F**) para dar, de manera gradual, continuidad al epifalo. La luz se encuentra tapizada por un epitelio cúbico, con citoplasma eosinófilo y grandes núcleos (**Fig.1.2.27 C: pn**). Periféricamente o a un lado de la luz del pene, también se observan los divertículos penianos (**Fig.1.2.26 D-G: dp**), los cuales se visualizan repletos de una secreción que mantiene la turgencia de la estructura. Los divertículos penianos poseen su luz tapizada por un epitelio cilíndrico alto, con citoplasma eosinófilo y núcleo basal (**Fig.1.2.27 C-D: dp**). Externamente, el pene se encuentra limitado por una capa de musculatura circular (**Fig.1.2.26 D-G: mc**). A nivel de la base del pene, la luz es replegada y está tapizada por un epitelio cilíndrico alto con citoplasma basófilo y grandes núcleos ovalados (**Fig.1.2.27 F: pn**). Esta porción del pene a su vez se encuentra rodeada por la vaina del pene (**Fig. 1.2.25 H; Fig. 1.2.26 H: vpn**) que contiene al vaso deferente (**Fig. 1.2.26 H: vd**), el cual mantiene a lo largo de todo el recorrido un epitelio cúbico provisto de largos cilios (**Fig.1.2.27 E: vd**).

**Figura 1.2.25**

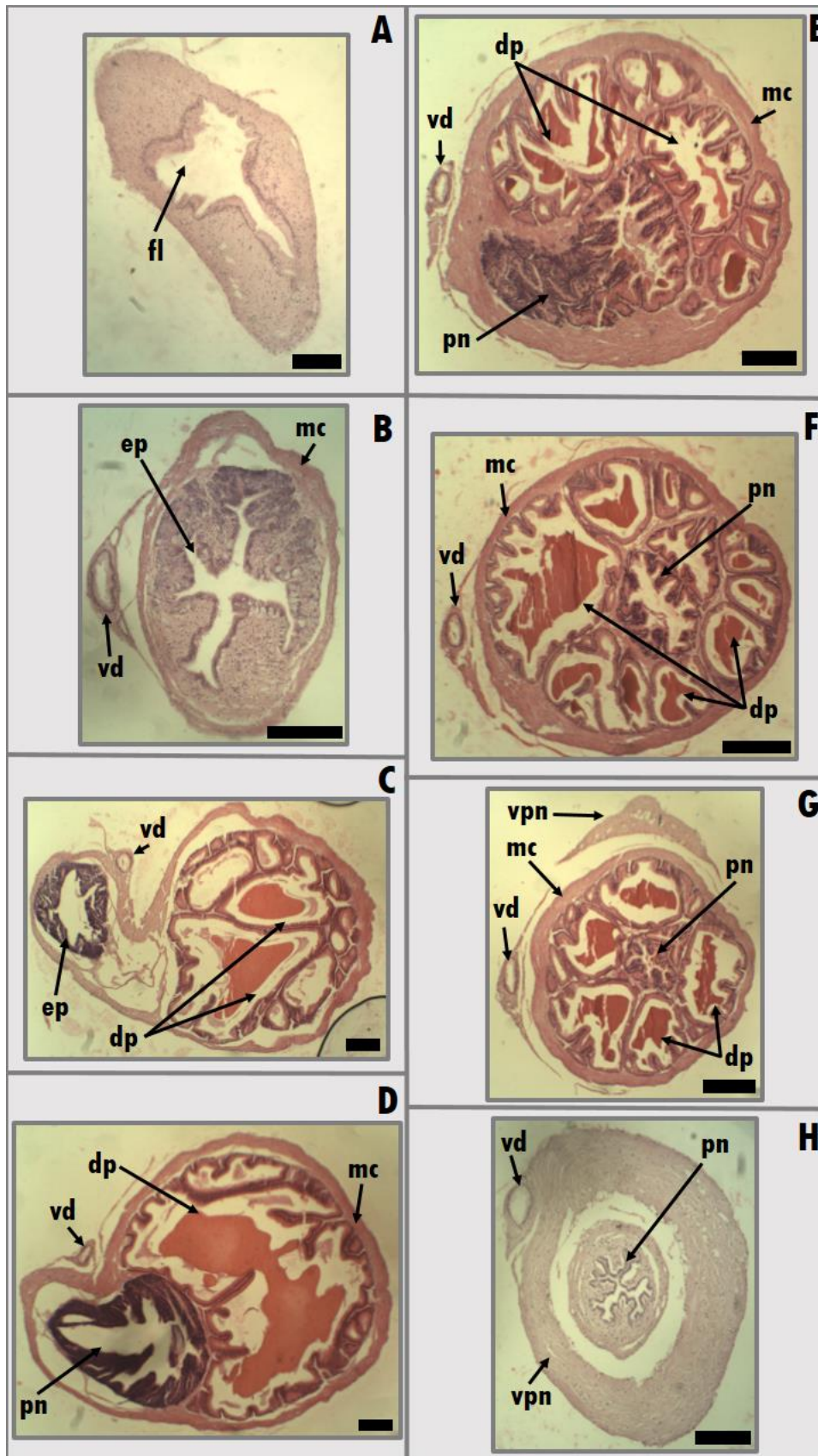
Complejo peniano de *Bulimulus vesicalis*



Las letras denotan los distintos niveles de corte transversal.  
(MLP-Ma 15157). **A**- Flagelo. **B**- Extremo del epifalo. **C**- Epifalo.  
**D-H**. Pene. Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.26**

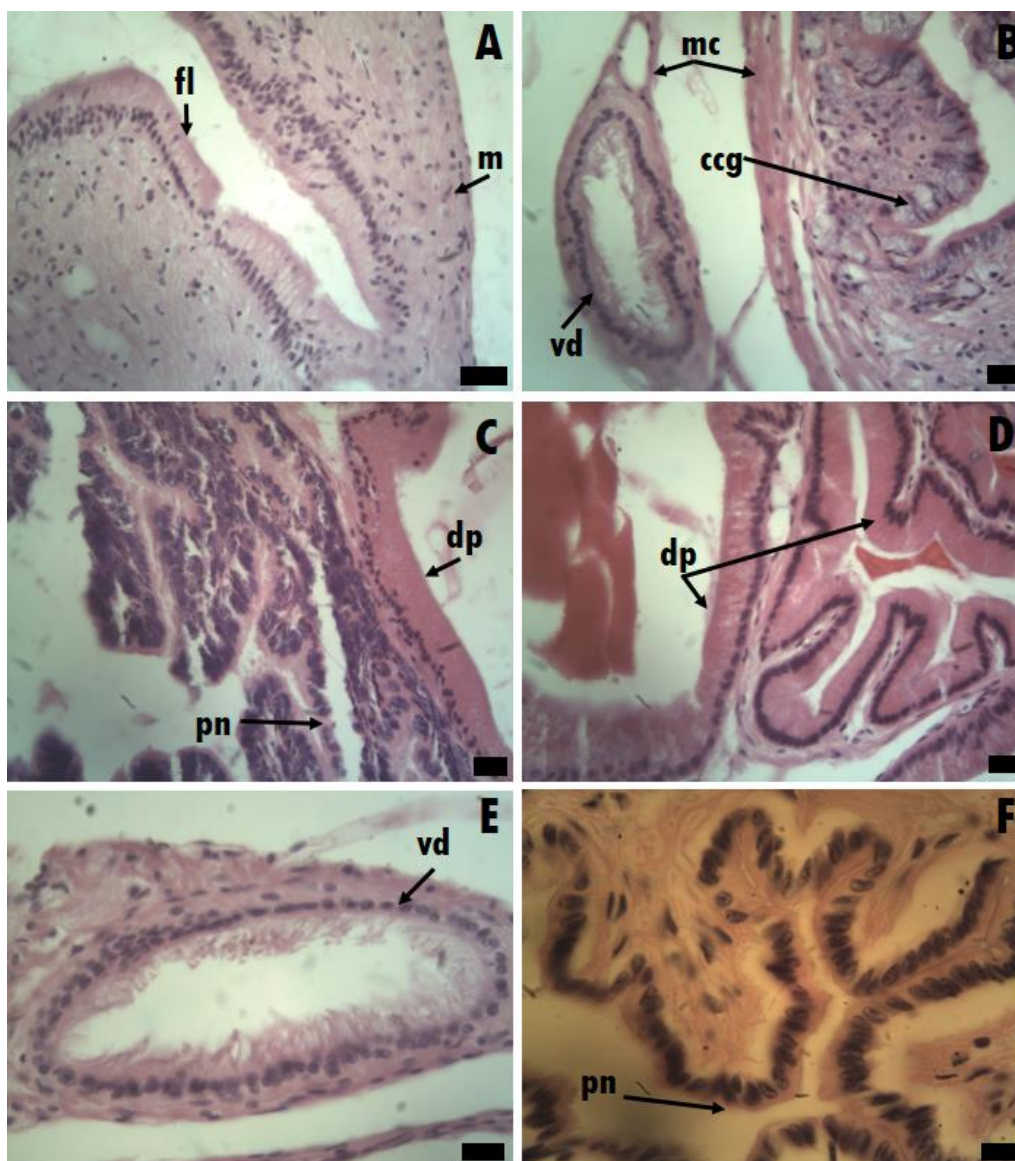
*Cortes transversales del complejo peniano de Bulimulus vesicalis*



A- Corte transversal a la altura del flagelo (fl). B- Extremo del epifalo (ep), rodeado de musculatura circular (mc) conteniendo a su vez al vaso deferente (vd) con algunos divertículos penianos laterales (dp). C- Corte del epifalo (ep) y vaso deferente (vd). D- Corte a nivel del límite entre el pene y epifalo. E-H - Cortes a distintos niveles del pene, mostrando la disposición de los divertículos penianos (dp), ubicación de la luz del pene (pn), vaso deferente (vd), musculatura circular (mc) y vaina del pene (vpn). (MLP-Ma 14685/b). Escala A-B= 100  $\mu$ m, C-H= 200  $\mu$ m.

### Figura 1.2.27

Detalle de los tipos celulares encontrados en el complejo peniano de *Bulimulus vesicalis*



A- Epitelio del flagelo (fl), cilíndrico alto y musculatura (m). B- Corte a la altura del epifalo mostrando el epitelio cilíndrico ciliado y los cuellos de las células glandulares (ccg), vaso deferente (vd) con epitelio cúbico, cilios largos y musculatura circular (mc). C- Epitelio cúbico del pene (pn) y divertículo peniano (dp), con epitelio cilíndrico alto. D- Divertículo peniano (dp). E- Vaso deferente a nivel del pene. F- Luz del pene (pn) a la altura de la vaina del pene con epitelio cilíndrico alto. (MLP-Ma 14685/b). Escala= 20  $\mu$ m.

### 1.2.C.3. *Bulimulus rushii*

#### 1.2.C.3.a. Morfología general y masa visceral

El tegumento de esta especie es de color beige claro (**Fig. 2.1.28 A-B**), con pigmento concentrado en la región dorsal de la cabeza (**Fig. 2.1.29 A**), músculos retractores de los tentáculos, el manto debajo de la última vuelta de la conchilla (**Fig. 1.2.29 A, B**) y limitando los vasos de la cavidad pulmonar (**Fig. 2.1.29 A, B, Fig. 1.2.30 A**).

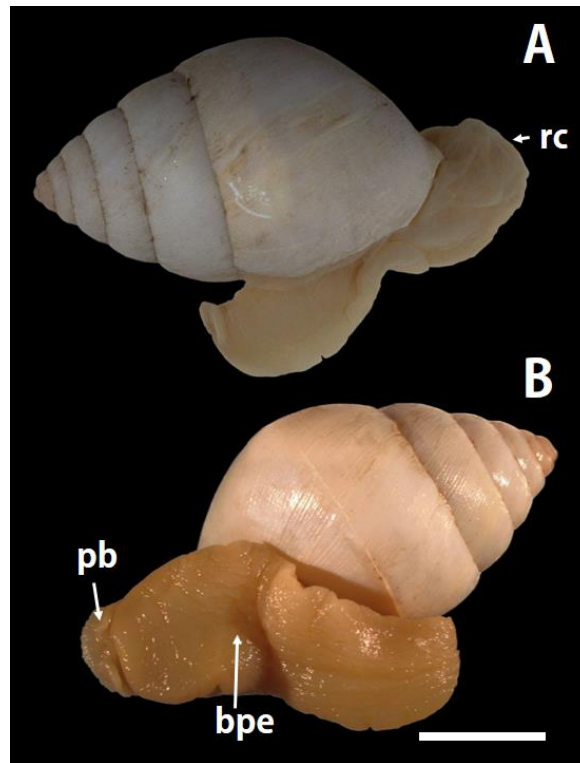
La región cefálica compuesta por labio inferior, labio superior, palpo bucal, tentáculo portador del ojo, tentáculo sensorial, (**Fig. 1.2.29 A, C**), es semejante a las especies anteriores al igual que la ubicación del gonoporo, pneumostoma y morfología del pie.

En la **Figura 1.2.29** se observa que la glándula digestiva es de color beige y en comparación con las especies anteriores posee mayor desarrollo, ya que ocupa ~5 vueltas y 1/4. La misma contiene, en su gran lóbulo posterior el ovotestis, ubicado aproximadamente en la tercer vuelta. El lóbulo anterior, en relación al sistema digestivo, contiene las mismas estructuras que mencionamos en las especies anteriores. En la última vuelta del animal se observa la amplia cavidad pulmonar (**Fig. 2.1. 29 A**).

El borde del manto está bien desarrollado (**Fig. 1.2.29 A-B: bm**), también con pequeños acúmulos de pigmento disperso (**Fig. 1.2.29 A-B: p**) en su superficie externa y con una línea en su borde más externo delimitando la zona de formación de la conchilla, en la mayoría de los ejemplares estudiados se observó que dicho borde se repliega sobre sí mismo (**Fig.1.2.29 A, B: bm**).

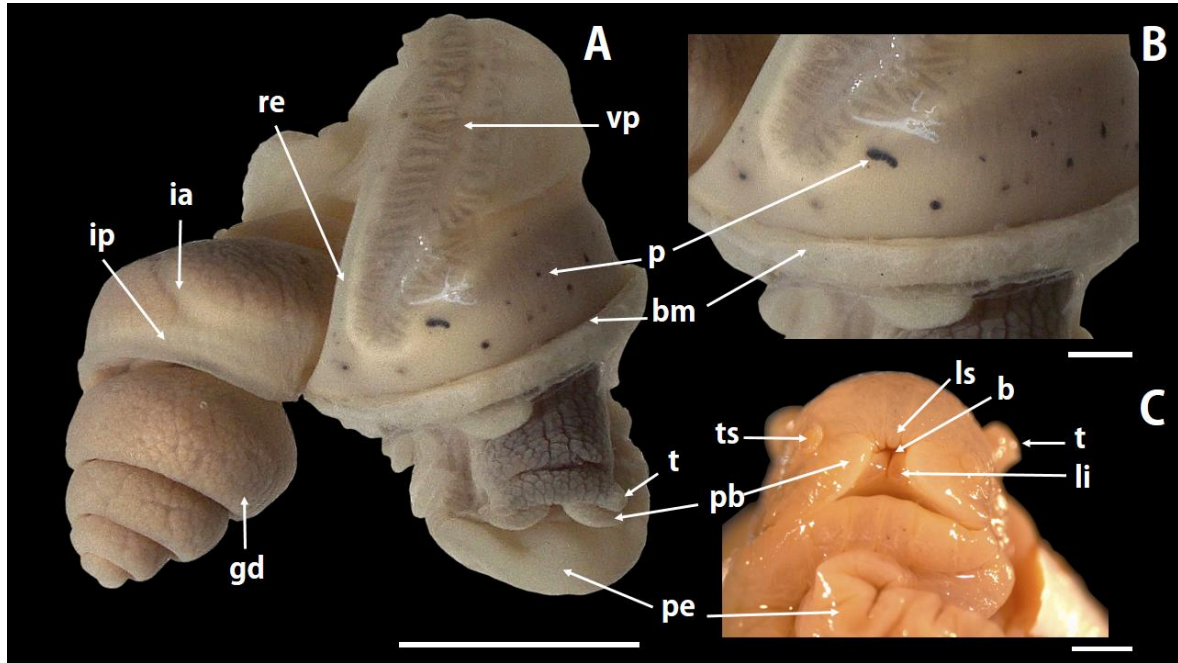
**Figura 1.2.28**

*Aspecto general de Bulimulus rushii*



**A-** Vista lateral derecha. **B-** Vista ventral. (MLP-Ma 15181/a).

*Abreviaturas:* base del pie (bpe), palpo bucal (pb), región cefálica (rc). Escala= 5 mm.

**Figura 1.2.29***Morfología general y masa visceral de Bulimulus rushii*

**A-** Vista lateral derecha. **B-** Borde del manto (MLP-Ma 15159/i). **C-** Región cefálica (MLP-Ma 15181/c).

*Abreviaturas:* boca (b), borde del manto (bm), glándula digestiva (gd), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), labio inferior (li), labio superior (ls), palpo bucal (pb), pie (pe), pigmento (p), recto (re), tentáculo portador de ojo (t), tentáculo sensorial (ts), vena pulmonar (vp). Escala A= 5 mm B-C= 1 mm.

**1.2.C.3.b. Órganos del manto**

Con respecto a la ubicación del pulmón, se dispone ocupando no sólo la última vuelta del animal sino también  $\sim 1/4$  de la vuelta que la precede, siendo de este modo, más extensa respecto de las especies anteriormente mencionadas. La cavidad pericárdica (**Fig. 1.2.30 A: cp**) se dispone también póstero-ventralmente casi llegando al lado derecho del animal, el diámetro menor es muy similar al riñón, pero el diámetro mayor es  $\sim 1/3$  más largo encontrándose la aurícula (**Fig. 1.2.30 A: a**) dispuesta por delante del riñón. El ventrículo (**Fig. 1.2.30 A: v**) tiene casi el doble de tamaño que la aurícula.

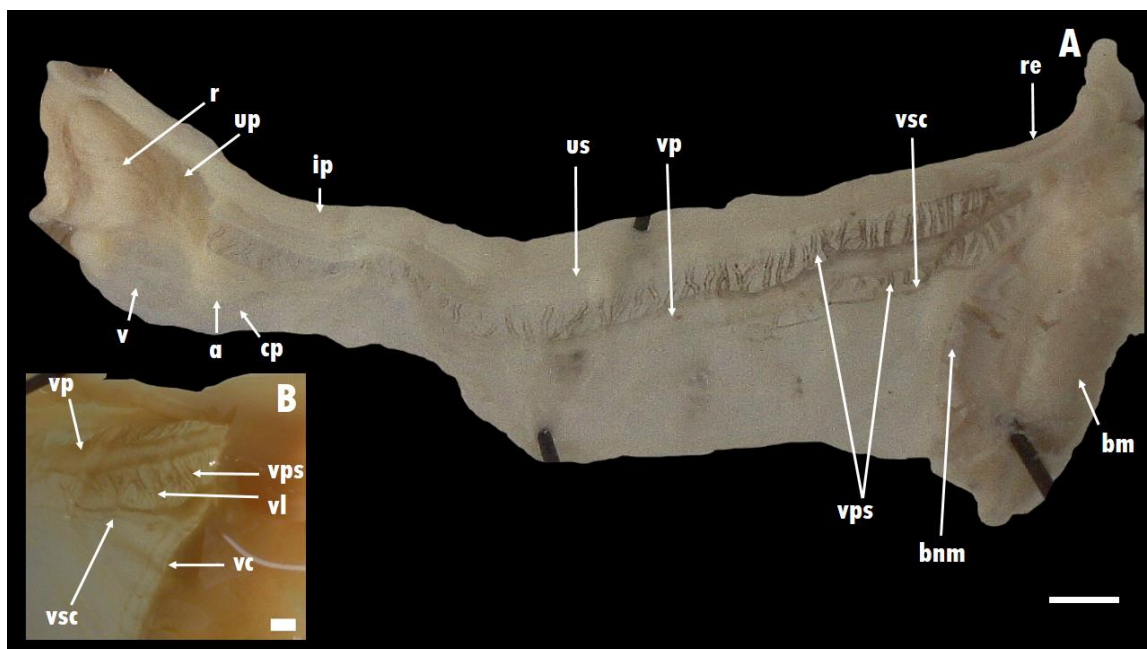
El calibre de la vena pulmonar (**Fig. 1.2.30 A, B: vp**) es parejo en dirección al pneumostoma, con excepción del último tramo  $\sim 1/7$ , en el cual el grosor es menor. Posee numerosos vasos pulmonares (**Fig. 1.2.30 A, B: vps**) a la derecha de la vena pulmonar y a lo largo de todo su recorrido, del lado izquierdo sólo hay vasos pulmonares presentes en el último tercio. Respecto de los vasos laterales (**Fig. 1.2.30 B: vl**), están presentes en un número escaso, son pequeños y de difícil visualización.

Un rasgo distintivo de la presente especie es la presencia de un vaso del collar (**Fig. 1.2.30 B: vc**), que discurre paralelo al borde nual del manto (**Fig. 1.2.30 A: bnm**) y el cual cerca del pneumostoma se bifurca dando lugar al vaso secundario del collar (**Fig. 1.2.30 A, B: vsc**) que se extiende en sentido posterior un tercio de la superficie de la cavidad pulmonar, sólo se visualizaron vasos pulmonares del lado izquierdo conectándose con dicho vaso secundario del collar.

El riñón (**Fig. 1.2.30 A: r**) es de aspecto casi triangular, a la derecha del mismo se encuentra el uréter primario (**Fig. 1.2.30 A: up**) muy delgado y que se continua en un uréter secundario (**Fig. 1.2.30 A: us**) de mayor calibre que desemboca al exterior por una abertura del uréter pequeña y difícil de apreciar.

### Figura 1.2.30

Órganos del manto de *Bulimulus rushii*



Abreviaturas: aurícula (a), borde nual del manto (bnm), borde del manto (bm), cavidad pericárdica (cp), intestino posterior (ip), recto (re), riñón (r), uréter primario (up), uréter secundario (us), vaso del collar (vc), vasos laterales (vl), vasos pulmonares (vps), vaso secundario del collar (vsc), vena pulmonar (vp), ventrículo (v). (MLP-Ma 15181/b). Escala= 1 mm.

#### 1.2.C.3.c. Sistema digestivo

El sistema digestivo (**Fig. 1.2.31**), al igual que se describió previamente, la boca (**Fig. 1.2.31 A; Fig. 1.2.32 C: b**) se encuentra limitada dorsalmente por la mandíbula (**Fig. 1.2.32 B; Fig. 1.2.33 C: mb**) que, con el típico aspecto de herradura, se diferencia

de las especies anteriormente mencionadas por ser más abierta, aunque también está compuesta por un número variable de placas, entre 9-12, apenas más largas que anchas.

El bulbo bucal (**Fig. 1.2.31; Fig. 1.2.32: bb**) es alargado con iguales características respecto de las estructuras que se asocian. El esófago anterior (**Fig. 1.2.31; Fig. 1.2.32 A-C: ea**) ingresa en la porción media dorsal y a ambos lados del mismo los conductos de las glándulas salivales (**Fig. 1.2.31; Fig. 1.2.32 A-C: cgs**). El bulbo bucal se encuentra flanqueado por la misma serie de músculos, dorsal y lateralmente, músculo peribucal (**Fig. 1.2.32 A, B: mpb**), músculos dorsales del bulbo bucal (**Fig. 1.2.32 B: mdb**). A diferencia de las especies anteriormente descritas, ventro-lateralmente posee dos pares de músculos ventrales del bulbo bucal (**Fig. 1.2.32 C: mvb**), cada par se origina en la parte anterior del bulbo bucal muy cerca de la boca y luego cada par se divide en dos músculos uno se dirige en dirección póstero-central al bulbo bucal y se inserta ventral al odontóforo, el otro se dirige a la zona lateral del bulbo bucal, por encima de un fuerte par de músculos peribucales ventrales (**Fig. 1.2.32 C: mpbv**) que tapizan la región ventral del bulbo bucal. Además, hay un par de cortos músculos peribucales accesorios (**Fig. 1.2.32 C: mpba**) que discurren desde la parte ventral del odontóforo, donde se insertan y se dirigen póstero-lateralmente hasta el gran músculo retractor del bulbo bucal (**Fig. 1.2.31; Fig. 1.2.32 A-C: mbb**). El músculo retractor del bulbo bucal se origina posterior al mismo y es un grueso paquete de musculatura, de extensa longitud con igual función a la descrita en las especies anteriores.

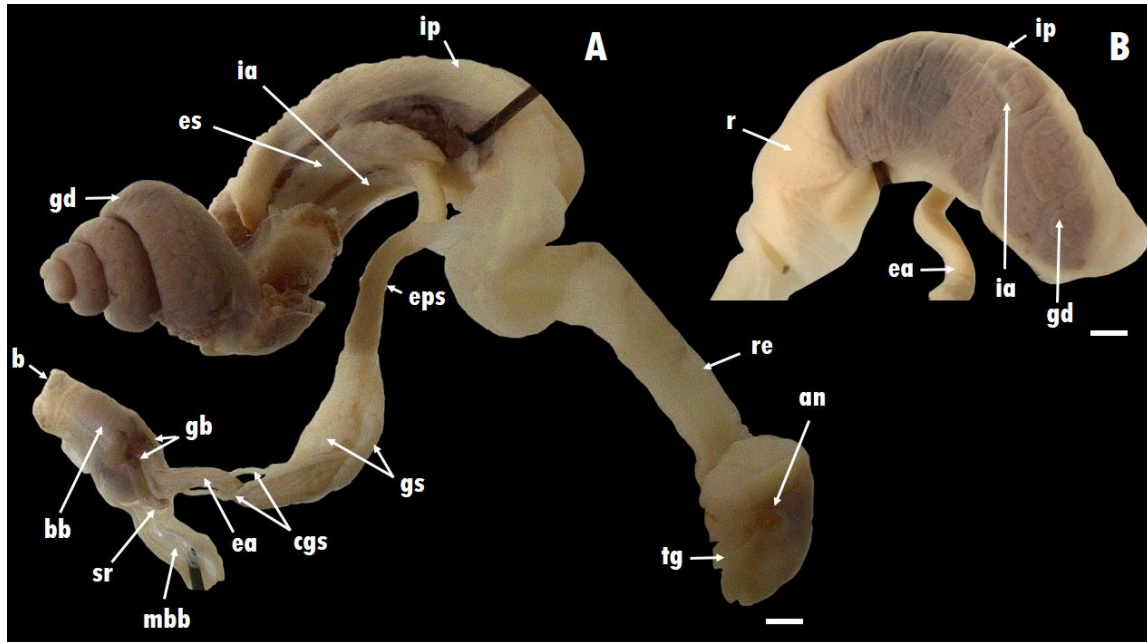
La rádula (**Fig. 1.2.33**) está conformada por aproximadamente 80 filas de dientes, cada una de las cuales se encuentra constituida por un diente raquídeo y alrededor de 27 ( $\pm 2$ ) dientes, entre dientes laterales y marginales.

El diente raquídeo (**Fig. 1.2.33 B: dr**) es más pequeño respecto de los laterales, posee tres cúspides con mesocono que culmina en un extremo en punta y a cada lado posee un denticulo reducido que también culmina en un extremo puntiagudo. Los dientes laterales (**Fig. 1.2.33 B: dl**) son bicúspides de mayor tamaño respecto al raquídeo, cada diente lateral posee un mesocono cuyo extremo también culmina en una punta y el ectocono de cada lateral es triangular cuyo extremo también es en punta. Los raquídeos y laterales también poseen hasta tres zonas de sujeción a la cinta radular, pero menos conspicuas. Entre los dientes laterales y marginales no se observa una clara diferenciación, únicamente a partir del lateral 15 el mesocono se alarga y direcciona apuntando hacia la parte central de la rádula. Los dientes marginales (**Fig. 1.2.33 A: dm**), a diferencia de las especies descritas anteriormente, posee un ectocono no subdividido.

Respecto del esófago, glándulas salivales, conductos de las glándulas salivales, estómago, intestino, recto y ano siguen la disposición y características descritas para las especies anteriormente tratadas. Con, la excepción de que la porción posterior de la glándula digestiva es más extensa, ocupando ~4 vueltas (Fig. 1.2.31).

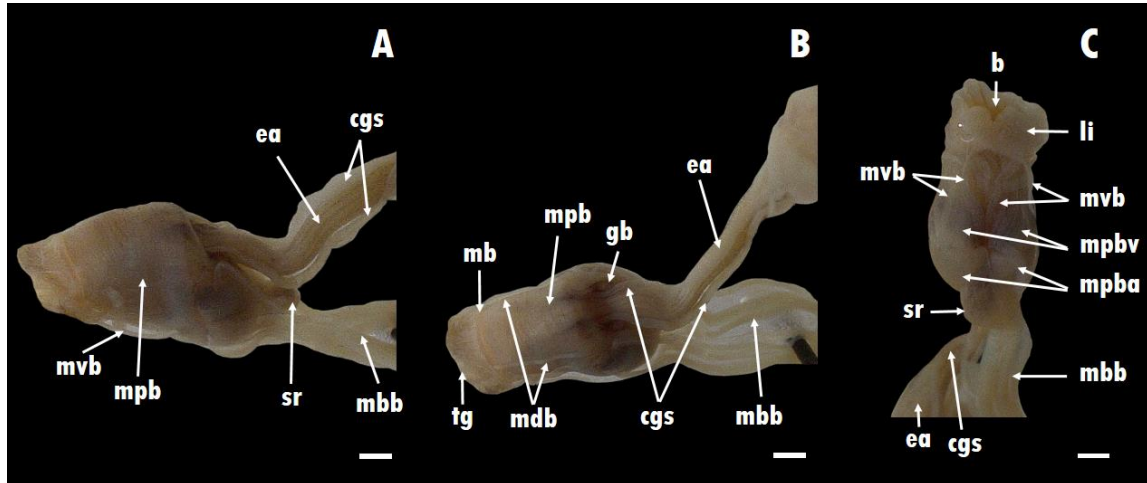
**Figura 1.2.31**

*Sistema digestivo completo de Bulimulus rushii*



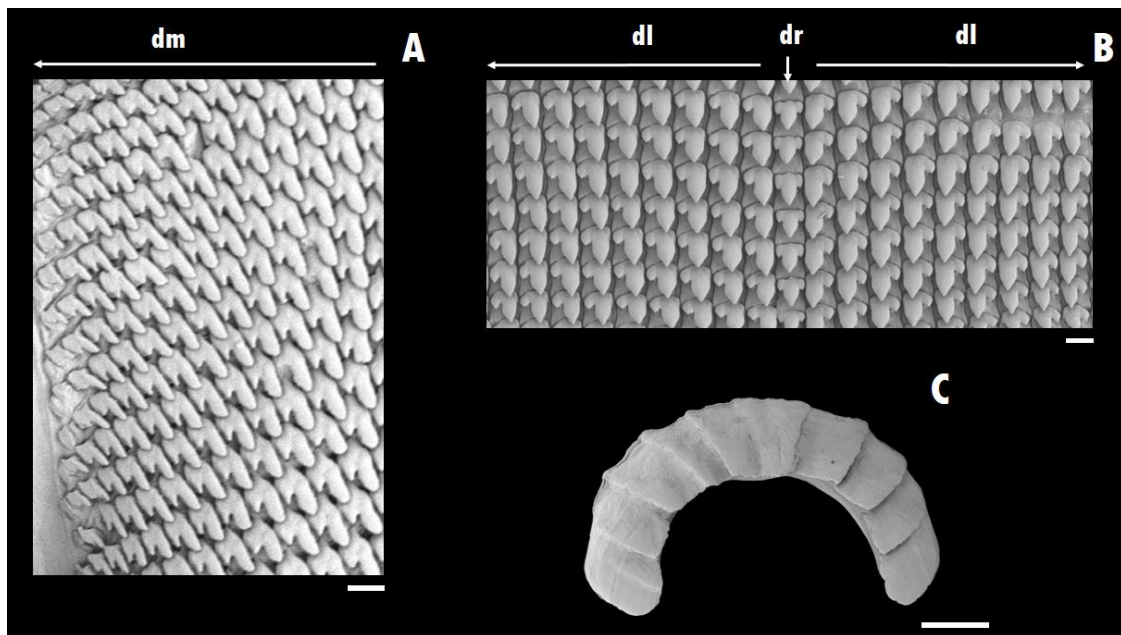
**A-** Vista general del sistema digestivo. **B-** Vista externa del recorrido del intestino en la glándula digestiva. (MLP-Ma 15159/i).

*Abreviaturas:* ano (an), boca (b), bulbo bucal (bb), conducto de la glándula salival (cgs), esófago anterior (ea), esófago posterior (eps), estómago (es), ganglio bucal (gb), glándula digestiva (gd), glándula salival (gs), intestino anterior (ia), intestino posterior (ip), músculo retractor del bulbo bucal (mbb), recto (re), riñón (r), saco radular (sr), tegumento (tg). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.32***Bulbo bucal de Bulimulus rushii*

**A-**Vista lateral. **B-** Vista dorsal. **C-** Vista ventral. (MLP-Ma 15159/i).

*Abreviaturas:* boca (b), conducto de la glándula salival (cgs), esófago anterior (ea), ganglio bucal (gb), labio inferior (li), mandíbula (mb), músculo dorsal del bulbo bucal (mdb), músculo retractor del bulbo bucal (mbb), músculo peribucal (mpb), músculo peribucal accesorio (mpba), músculo peribucal ventral (mpbv), músculo ventral del bulbo bucal (mvb), saco radular (sr), tegumento (tg). Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.33***Rádula y mandíbula de Bulimulus rushii*

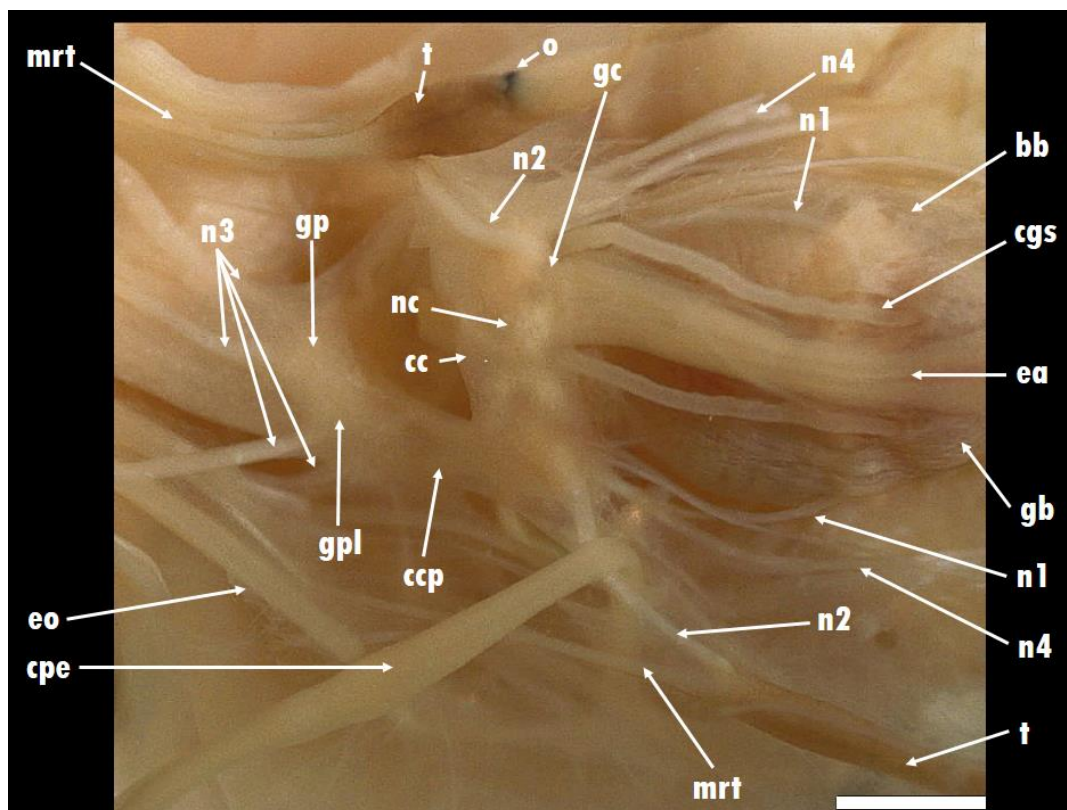
**A-** Vista lateral mostrando dientes marginales (dm). **B-** Segmento radular con dientes raquídeos (dr) y dientes laterales (dl). (MLP-Ma 14546) Escala A-B= 20  $\mu$ m. C= 200  $\mu$ m.

### 1.2.C.3.d. Sistema nervioso central

Su estructura es semejante a la de *B. bonariensis* con ligeras variaciones. Los ganglios cerebrales (**Fig. 1.2.34: gc**) no son tan conspicuos y se aprecian por transparencia sus nodos, también se visualiza claramente cómo otros nervios (n4) se dirigen hacia la región anterior de la cabeza. El ganglio pedal único (**Fig. 1.2.34: gp**) se le adicionan los ganglios pleurales (**Fig. 1.2.34: gpl**) fusionados a ambos lados del pedal y diferenciables entre sí por los nervios que de ellos emergen. Los ganglios bucales (**Fig. 1.2.34: gb**), conectivo cerebral (**Fig. 1.2.34: cc**), conectivo cerebro-pleural (**Fig. 1.2.34: ccp**) y nervios (**Fig. 1.2.34: n1- n3**), poseen una configuración general igual a las especies antes descritas.

**Figura 1.2.34**

*Sistema nervioso central de Bulimulus rushii*



*Abreviaturas:* bulbo bucal (bb), complejo peniano (cpe), conducto de la glándula salival (cgs), conectivo cerebral (cc), conectivo cerebro-pleural (ccp), esófago anterior (ea), espermioviducto (eo), ganglio bucal (gb), ganglio cerebral (gc), ganglio pedal (gp), ganglio pleural (gpl), músculo retractor del tentáculo (mrt), nervio (n1-4), nodo cerebral (nc), ojo (o), tentáculo portador de ojo (t). (MLP-Ma 15181/a). Escala= 1 mm.

### 1.2.C.3.e. Sistema reproductor

El sistema reproductor (**Fig. 1.2.35**) está compuesto por la gónada hermafrodita, el ovotestis (**Fig. 1.2.35: ov**), cuyos lóbulos (**Fig. 1.2.36 A: lo**) se encuentran alojados en la parte más interna de la espira, en la región media de la glándula digestiva (**Fig. 1.2.35; Fig. 1.2.36: gd**). Está conformada por 5 lóbulos muy pequeños cuyos conductos lobulares son cortos (**Fig. 1.2.36 A: cl**). A diferencia de las especies anteriormente descritas, en esta especie el conducto hermafrodita (**Fig. 1.2.35; Fig. 1.2.36 A, B: ch**) es completamente recto y proporcionalmente más largo, siendo aproximadamente  $\sim 1/3$  del espermioviducto. Se relaciona en su extremo opuesto al receptáculo seminal (**Fig. 1.2.36 B: rs**) ubicado ventralmente a la glándula del albumen y sólo visible a gran aumento. La glándula del albumen (**Fig. 1.2.35; Fig. 1.2.36 B: gla**), es una estructura blanquecina de sólo dos veces el tamaño del receptáculo seminal, pero conspicuo y diferenciable en el trayecto de esta región del sistema. La cámara del albumen (**Fig. 1.2.36 B: ca**), se dirige hacia la región anterior del animal y se une al espermioviducto (**Fig. 1.2.35; Fig. 1.2.36 B, D-F: eo**). El último a lo largo de todo su recorrido es de diámetro muy delgado y poco variable. La glándula prostática (**Fig. 1.2.36 D: pr**) ocupa  $\sim 1/2$  de la superficie del espermioviducto. La bursa copulatrix (**Fig. 1.2.35; Fig. 1.2.36 C: bc**) es una pequeña estructura esférica con un largo conducto,  $\sim 1/8$  mayor al espermioviducto y que se separa del mismo a la altura de la glándula del albumen. El conducto de la bursa copulatrix (**Fig. 1.2.35; Fig. 1.2.36 C: cbc**) y el espermioviducto discurren paralelamente (**Fig. 1.2.35; Fig. 1.2.36 E**) para unirse en una corta vagina (**Fig. 1.2.35; Fig. 1.2.36 F: va**) antes de abrir en el gonoporo común. Con excepción de la vagina, el espermioviducto, conducto de la bursa copulatrix, glándula del albumen, receptáculo seminal y conducto hermafrodita que se disponen del lado derecho del animal, en paralelo y en íntima asociación al músculo columelar a través de mesotelio; la bursa copulatrix y el extremo de su conducto se separan del músculo columelar y pasan a disponerse sobre el esófago posterior.

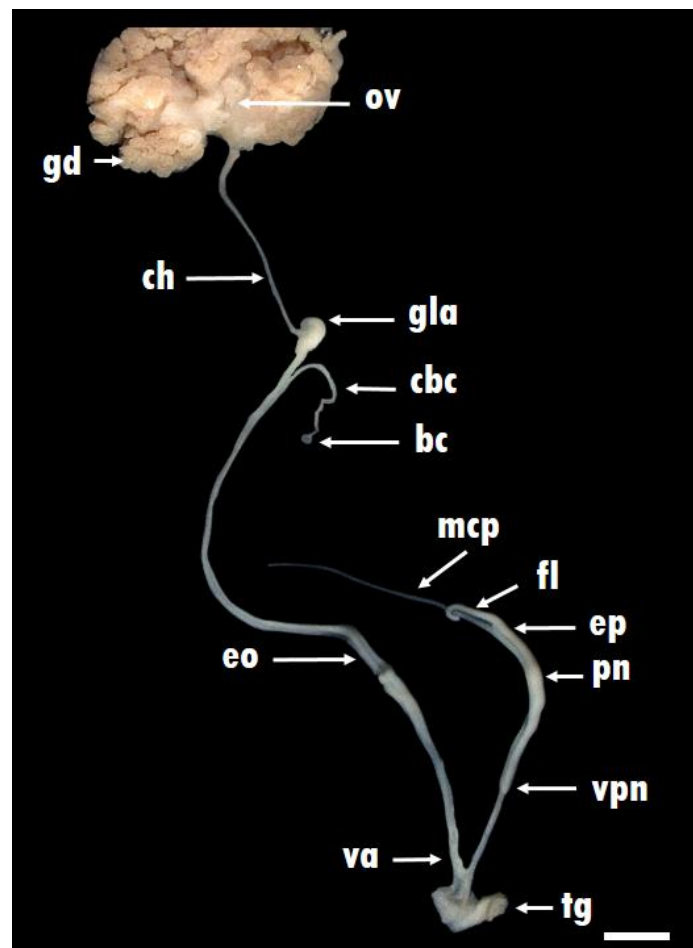
El complejo peniano es simple (**Fig. 1.2.35**), la región correspondiente al flagelo (**Fig. 1.2.35: fl; Fig. 1.2.37: A**) comienza a partir del punto en el cual el músculo retractor del complejo peniano (**Fig. 1.2.35: mcp**) se separa de la estructura, la longitud del flagelo es aproximadamente igual al epifalo. Respecto del epifalo (**Fig. 1.2.35: ep; Fig. 1.2.37: B**), el límite superior es el punto de separación de dicho músculo y el límite inferior el lugar de inserción del músculo retractor del complejo peniano. En relación al ancho no posee una clara diferenciación con el pene (**Fig. 1.2.35: pn; Fig. 1.2.37: C, D**). La inserción del músculo retractor del pene (**Fig. 1.2.35: mcp**) no es terminal como en *B. bonariensis* sino que está posicionado a mitad del complejo. Otro carácter

diferencial en esta especie es la presencia de vaina del pene (**Fig. 1.2.35: vpn**) delgada y poco conspicua. La longitud de la vaina del pene y pene es el doble del epifalo.

En la **Figura 1.2.36 F** se aprecia cómo se separa el complejo peniano de la vagina (**Fig. 1.2.36 F: cpe**), el cual se posiciona del lado interno del músculo retractor del tentáculo derecho (**Fig. 1.2.36 F: mrt**) y por encima del nervio que lo inerva (**Fig. 1.2.36 F: n2**); por otro lado, se observa el espermioviducto junto al conducto de la bursa copulatrix, ambos de muy pequeño calibre, además de la musculatura tegumentaria (**Fig. 1.2.36 F: mt**) que va desde las estructuras mencionadas hasta el tegumento que cubre el flanco derecho del animal.

### Figura 1.2.35

#### *Sistema reproductor de Bulimulus rushii*

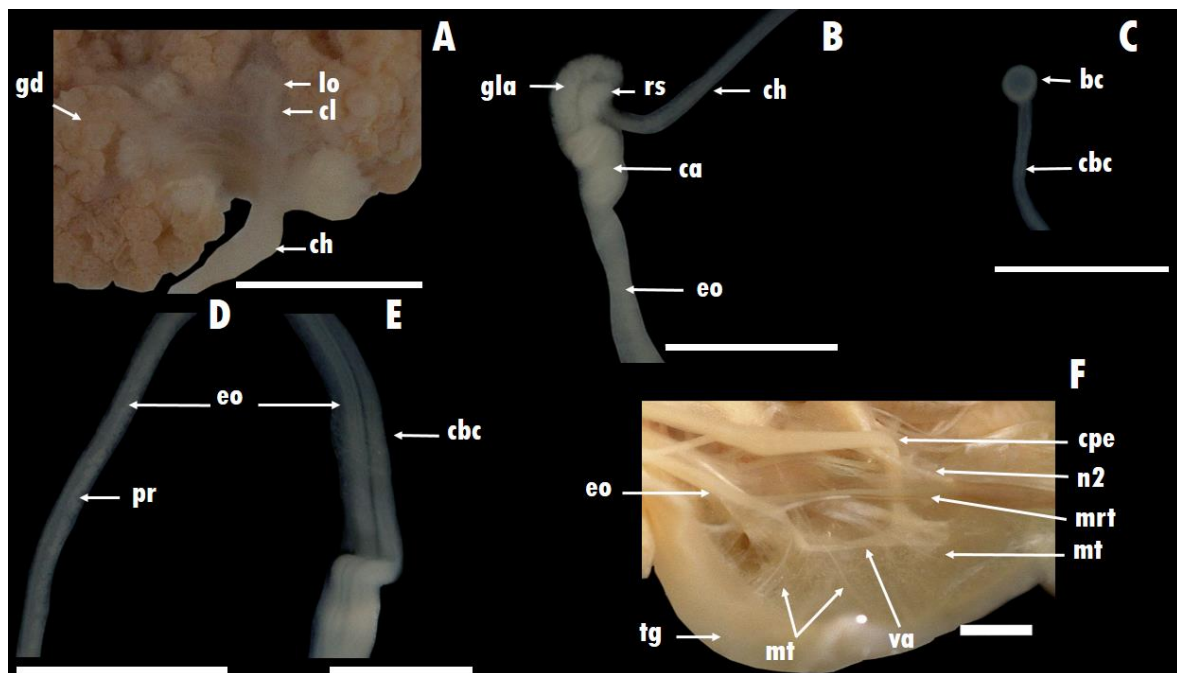


Vista general del sistema reproductor completo. (MLP-Ma 15181/b).

*Abreviaturas:* bursa copulatrix (bc), conducto hermafrodita (ch), conducto de la bursa copulatrix (cbc), epifalo (ep), espermioviducto (eo), flagelo (fl), glándula del albumen (gla), glándula digestiva (gd), músculo retractor del complejo peniano (mcp), ovotestis (ov), tegumento (tg), pene (pn), vagina (va), vaina del pene (vpn). Escala= 1 mm.

### Figura 1.2.36

Vista en detalle de algunas estructuras del sistema reproductor de *Bulimulus rushii*



Abreviaturas: bursa copulatrix (bc), cámara del albumen (ca), complejo peniano (cpe), conducto de la bursa copulatrix (cbc), conducto hermafrodita (ch), conducto lobular (cl), espermioviducto (eo), glándula del albumen (gla), glándula digestiva (gd), músculo retractor del tentáculo (mrt), musculatura tegumentaria (mt), nervio (n2), lóbulo del ovotestis (lo), próstata (pr), receptáculo seminal (rs), tegumento (tg), vagina (va). (MLP-Ma 15181/b). Escala= 1 mm.

### Caracterización histológica del complejo peniano

La **Figura 1.2.37** señala los distintos niveles donde se realizó el corte transversal, a continuación se caracteriza cada una de estas regiones.

A diferencia de lo mencionado en las especies anteriores, la región correspondiente al flagelo (**Fig. 1.2.37 A; Fig. 1.2.38 A: fl**) es acompañada en toda su extensión por el vaso deferente (**Fig. 1.2.38 A: vd**), siendo de esta manera la abertura de posición terminal. La luz del flagelo es de aspecto irregular y se encuentra tapizada por un epitelio cúbico pluriestratificado (**Fig. 1.2.39 A: fl**). El vaso deferente, se ubica paralelamente y posee una luz limitada por un epitelio cúbico (**Fig. 1.2.39 A: vd**). En esta especie el flagelo está conformado por un parénquima compacto sin presencia de células musculares.

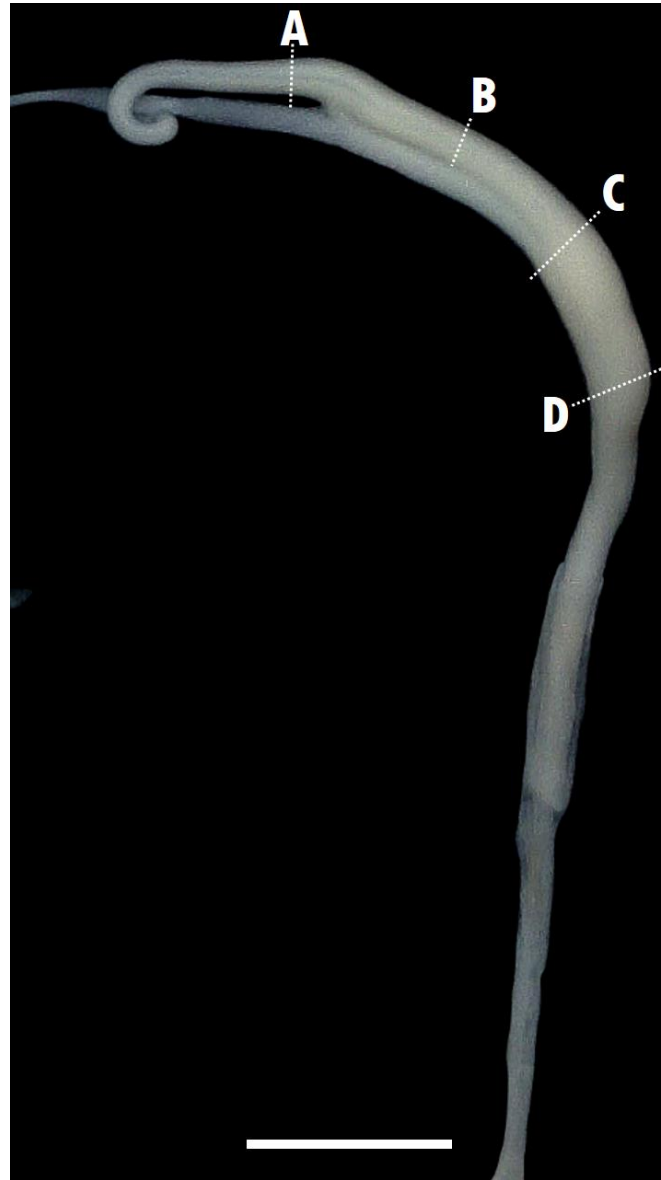
El epifalo (**Fig. 1.2.37 B; Fig. 1.2.38 B: ep**) es similar a la región antes descrita, con la diferencia de que su luz tiene forma de cruz y el sector que rodea al vaso deferente se encuentra mejor diferenciado.

La zona correspondiente al pene (**Fig. 1.2.37 C, D; Fig. 1.2.38 C, D: pn**) denota una mayor diferenciación entre el vaso deferente y el pene, teniendo este último una luz irregular de mayor calibre, tapizada por el mismo tipo celular al mencionado para el flagelo (**Fig. 1.2.39 B: pn**).

A lo largo de los distintos cortes realizados a diferentes niveles del complejo peniano se pudo apreciar que los tipos celulares que lo conforman son similares, no pudiendo realizar entonces una caracterización por sectores, pero sí desde las proporciones que las estructuras ocupan y desde lo anatómico en relación a la ubicación del músculo retractor del complejo peniano, como se mencionó en la descripción referente a este sistema.

**Figura 1.2.37**

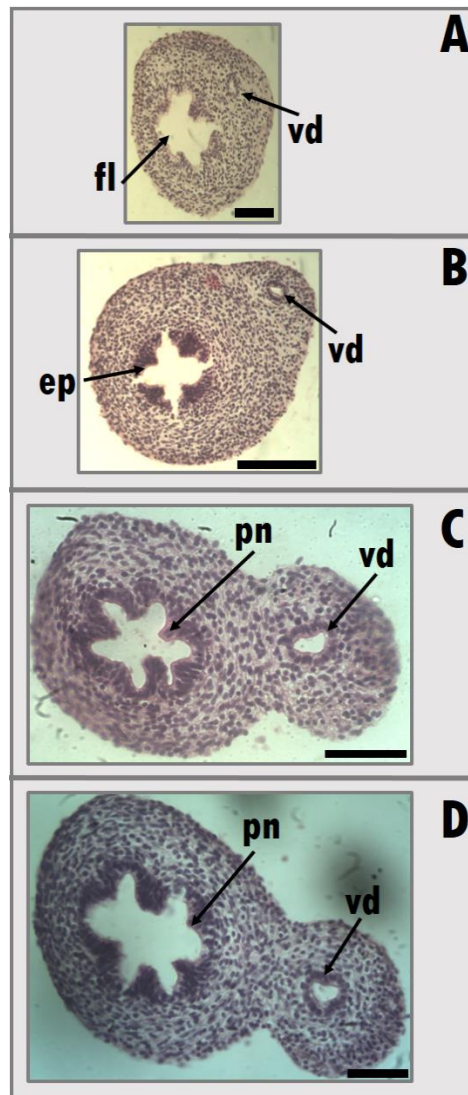
Complejo peniano de *Bulimulus rushii*



Las letras denotan los distintos niveles de corte transversal. (MLP-Ma 15181/b). A- Flagelo. B- Epifalo. C-D. Pene. Escala= 1 mm.

**Figura 1.2.38**

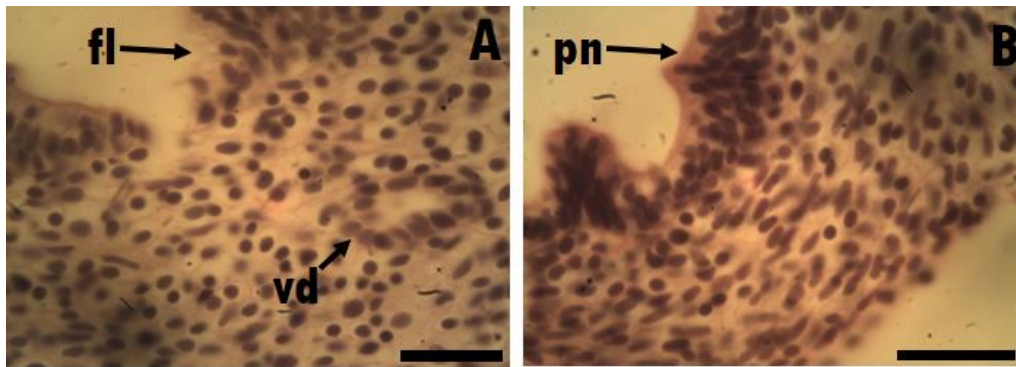
*Cortes transversales del complejo peniano de Bulimulus rushii*



A- Corte transversal a la altura del flagelo (fl) y vaso deferente (vd). B- Epifalo (ep). C-D- Corte a nivel del pene (pn). (MLP-Ma 15181/c). Escala A-D= 50  $\mu$ m.

**Figura 1.2.39**

Detalle de los tipos celulares encontrados en el complejo peniano de *Bulimulus rushii*



**A-** Epitelio del flagelo (fl), cúbico pluriestratificado y vaso deferente (vd), con epitelio cúbico. **B-** Corte a la altura pene (pn), con epitelio pluriestratificado. (MLP-Ma 15181/c). Escala= 20  $\mu$ m.

### 1.2.D. DISCUSSION

De las 68 especies de *Bulimulus* con estatus de aceptadas en MolluscaBase eds. (2021) sólo algunas cuentan con un análisis anatómico. La mayoría de las especies del género constan de una descripción parcial o comentarios de características puntuales, entre las que se encuentran *B. guadalupensis* (Breure, 1974: mención al tracto reproductor masculino no contorneado y músculo retractor del pene distal), *B. limnoides* (Van Mol, 1971: organización interna del complejo peniano por medio de cortes histológicos), *B. schadei* (Schlesch, 1935: sistema reproductor) y *B. wiebesi* (Breure, 1978: características del complejo peniano, bursa copulatrix y conducto de la misma). Unas pocas cuentan con una descripción más amplia y detallada como *B. corumbaensis* (Lanzieri y Rezende, 1965: descripción de la rádula, mandíbula, órganos del manto y reproductor con cortes transversales del mismo), *B. sula* (Simone y Amaral, 2018: órganos del manto, masa visceral, sistema circulatorio, excretor, digestivo, reproductor, sistema nervioso central) y *B. tenuissimus* (Rezende y Lanzieri, 1964: analizaron anatómica e histológicamente el complejo peniano). Contabilizando estas especies y adicionando las cuatro citadas en Argentina que, como mencionamos previamente, cuentan con alguna descripción en relación a la morfología interna, podemos denotar que menos del 20% de las especies de *Bulimulus* poseen literatura con información anatómica.

Desde este ángulo y en cuanto a la caracterización del género *Bulimulus*, Pilsbry (1895-1896) mencionó unas pocas características generales entre las cuales se encuentran la rádula típica de un gasterópodo terrestre, una mandíbula formada por pocas placas verticales y un sistema reproductor que carece de órganos o apéndices accesorios. En 1946, Parodiz añadió como característica del género, que en relación al sistema reproductor el pene es generalmente largo y con flagelo prolongado. También que la bursa copulatrix es de forma esférica con tamaño reducido y que su conducto es considerablemente largo. Por último, aunque describió el ovotestis, la morfología dada hace referencia a que en realidad estaba aludiendo al conducto hermafrodita.

Posteriormente, Breure (1979) añadió las siguientes características teniendo en consideración lo descripto hasta ese momento: pericardio con una longitud de  $\frac{3}{4}$  respecto al nefridio, vena pulmonar y venas laterales bien desarrolladas, uréter adrectal cerrado y buen desarrollo del borde del manto. Entre las características del sistema reproductor mencionó que la parte distal del pene es engrosada, la presencia de una vaina del pene y que en corte transversal el mismo está compuesto por tubos paralelos. Además, el autor añadió que el epifalo es delgado y de dos veces la longitud del pene, que

el flagelo es también delgado y la inserción del músculo retractor del pene es distal. Respecto del conducto de la bursa copulatrix (espermateca) su parte media es ancha y angosto hacia el extremo, siendo la bursa copulatrix globosa, sumado a la presencia de una vagina corta. Del sistema digestivo, mencionó las características de la rádula con dientes centrales tricúspides más pequeños que los dientes latero-marginales los cuales son bicúspides y aserrados en los más externos.

En relación a las características mencionadas por Breure (1979), se pudo constatar que las tres especies presentan las características que el describió en los órganos del manto respecto del desarrollo de los vasos que lo componen; no obstante, en ninguna de las especies tratadas la longitud del pericardio fue menor en comparación con el riñón. También, se apreciaron diferencias en la ubicación del pericardio respecto del riñón, en *B. bonariensis* la cavidad pericárdica se dispone posteriormente más allá del límite del riñón, en *B. vesicalis* la extensión de la cavidad pericárdica se restringe a la longitud del mismo y en *B. rushii* la aurícula se dispone completamente por delante del riñón. Por otro lado, en las tres especies tratadas se pudo constatar el gran desarrollo del borde del manto.

Con respecto a las características asociadas al sistema reproductor, las tres especies presentan el extremo distal del pene de mayor grosor y la presencia de una vaina del pene. En corte transversal, el complejo peniano a la altura del pene en ambas especies *B. bonariensis* y *B. vesicalis* presentan una serie de tubos paralelos o divertículos penianos dispuestos en número diferente y con características distintivas entre ellas, recordando en gran medida lo observado por Van Mol (1971) para *B. limnoides*. No obstante, estos divertículos penianos no se encuentran presentes en *B. rushii* que manifiesta una estructura histológica más simple respecto a las especies mencionadas anteriormente. En relación al grosor del epifalo, en las tres especies estudiadas presenta un calibre menor pero en ningún caso llega a ser de dos veces la longitud del pene. Sí se observó que el flagelo es delgado con una inserción del músculo retractor del complejo peniano distal y terminal en *B. bonariensis* y *B. vesicalis*. En el caso de *B. rushii*, la inserción de dicho músculo también es en el extremo del complejo peniano, pero no terminal sino ubicado en el límite entre el flagelo y el epifalo, Lanzieri y Rezende (1965) también observaron una inserción de dicho músculo en posición sub-terminal para *B. corumbaensis*. En relación al conducto de la bursa copulatrix en las tres especies se pudo evidenciar que dicho conducto es angosto en la región cercana a la bursa y se ensancha en dirección al gonoporo con distinto grado de aumento del calibre en las tres especies tratadas. Asimismo, se constató que la bursa copulatrix propiamente dicha tiene en los

tres casos un contorno redondeado así como se evidenció la presencia de una vagina de corta extensión.

En relación a las partes duras asociadas al sistema digestivo, las características de los dientes que conforman la rádula en las tres especies se ajusta a lo descripto por Parodiz (1946) y Breure (1979).

Por otra parte, al comparar las características anatómicas definidas por el autor antes citado con las observadas en *B. bonariensis*, *B. rushii* y *B. vesicalis* aquí tratadas; la nueva información dada a conocer contribuye a la ampliación de la caracterización del género. No obstante, teniendo en cuenta el gran número de especies que lo conforman queda aún mucho por investigar.

Dada la escasa información anatómica disponible en la literatura y la amplia distribución en nuestro país de *B. bonariensis* (Miquel, 1991; Cuezco et al., 2013), surgió la necesidad de realizar un estudio anatómico de muestras provenientes principalmente de la provincia de Buenos Aires, localidad tipo de la especie (Rafinesque, 1833; Parodiz, 1962). Sumado a ejemplares provenientes de otras provincias incluidas en el área de distribución cuyo reconocimiento de los ejemplares como pertenecientes a dicha especie fue realizada por identificación conquiolar. Y, resultando en la manifestación de una amplia diversidad de morfotipos desde lo anatómico a nivel del complejo peniano. Pone al descubierto que el rango de distribución hasta entonces considerado como habitado por *B. bonariensis*, por el simple análisis de la conchilla, es en realidad una amplia gama de especies, aquí tratadas como morfotipos, hasta el momento no conocidas ni descriptas anatómicamente. Por este motivo, de aquí en adelante sólo se considerará correspondiente a *B. bonariensis* ejemplares procedentes de Buenos Aires cuyo aspecto de complejo peniano se corresponda con la morfología “A” de la **Figura 1.2.12**.

Por otro lado, en algunos casos se encontraron entidades con complejos penianos diferentes en simpatria. Este tipo de distribución no es de sorprender ya que en las islas Galápagos es común encontrar hasta once especies en simpatria, siendo lo más común hallar entre cuatro a cinco (Parent, 2012).

La presencia de un complejo de especies para *B. bonariensis* concuerda con lo planteado por Breure (2016 a; b), quien manifestó esta idea para ejemplares distribuidos desde el norte de Argentina, Paraguay y Bolivia hasta el sur de Brasil. Otros Bulimulidae argentinos también fueron considerados un complejo de especies, cuyas entidades sólo pudieron ser establecidas por un análisis detallado y combinado de la conchilla y partes blandas. Como ejemplo podemos citar el caso de *B. tortoranus* conformado por tres especies (Miranda, 2014) y *B. stezneri* compuesto por cuatro especies de las cuales tres

volvieron al status de especie y por análisis anatómico se aportó una nueva para la ciencia (Miranda y Cuezco, 2014). La presencia de complejos de especies en este género también fue desarrollada por Ramirez y Ramirez (2013) para Perú, en el cual *B. modestus* estaba conformada, según estudios de base genética, por tres especies.

Respecto de *B. sporadicus*, especie con la cual *B. bonariensis* es hasta el momento sinonimizada desde lo conquiolar, no existen hasta la actualidad estudios anatómicos comparados que lo respalden. Aunque contamos con menciones puntuales en relación a la especie, Formica Corsi (1900) la describió conquiolaramente y dio las dimensiones del animal siendo el de mayor tamaño de 40 mm de longitud. También dijo que en vida posee una cabeza rugosa amarillenta o negruzca así como los tentáculos. Esta última característica no contribuye a realizar una diferenciación respecto de los ejemplares aquí estudiados ya que se observó la misma variación en coloración. Posteriormente, Schlesch (1935) describió la subespecie *B. sporadicus schadei* y presentó la anatomía del reproductor, la cual es congruente con la observada en ejemplares procedentes de Buenos Aires (**Fig. 1.2.12 A**), con la excepción de que el músculo retractor del complejo peniano es en todos los ejemplares observados en la presente tesis de posición terminal.

Por otro lado, Parodiz (1946: fig. 21) en ejemplares de *B. sporadicus* provenientes de la provincia de Corrientes, observó una mandíbula compuesta por entre 13-15 placas, cuyo tamaño van de mayor a menor del centro hacia afuera. Si bien el número de placas no aporta sustento en la diferenciación específica, se diferencia de todos los ejemplares aquí determinados como *B. bonariensis* en el hecho de que mostraron una mandíbula con placas más grandes en la periferia y de menor tamaño hacia el centro de la misma.

En un análisis cladístico del género *Bostryx*, Miranda (2016) seleccionó, como grupo externo, un conjunto de ejemplares identificados como *B. sporadicus* (sinónimo de *B. bonariensis*) junto a otros dos representantes de *Bulimulus*. Realizó disecciones y tomó características morfológicas continuas y discretas de la conchilla, órganos del manto y sistema reproductor. Al comparar las características codificadas en dicho trabajo con las presentadas en esta tesis para *B. bonariensis*, se pudo constatar la existencia de sólo dos diferencias. Por un lado, los ejemplares estudiados en esta tesis poseen una longitud de la vagina en relación a la longitud del pene de  $\frac{1}{2}$ , en Miranda (2016) la relación es de  $\frac{1}{3}$ . Y por otro lado, la longitud del flagelo respecto del epifalo es menor. En ningún ejemplar se observó que sea mayor como lo manifestó Miranda (2016). Tales distinciones podrían deberse a que los ejemplares tratados en ambos casos corresponden en realidad a entidades diferentes, afirmación que requiere de futuros estudios comparados no sólo anatómicos y conquiolares sino también genéticos.

Por las escasas comparaciones que pudimos realizar con la información bibliográfica disponible entre *B. bonariensis* y *B. sporadicus* es probable que estemos refiriéndonos a especies distintas y por lo tanto sus nombres específicos no deberían seguir siendo sinonimizados. No obstante, quedan aún estudios por realizar para la toma de una decisión taxonómica de ese tipo; sin embargo, los resultados presentados en la presente tesis podrán ser utilizados en futuros estudios comparados para afianzar lo dicho hasta el momento por diversos autores, que corresponden a la misma especie, o diferenciar y mantener ambas entidades con status de especie válida.

Con respecto a *B. rushii*, se pudo observar y de esta manera confirmar, que poblaciones procedentes de Buenos Aires y Córdoba, concuerdan en la anatomía de sus partes blandas y que, por lo tanto, corresponden a la misma entidad. En ambas poblaciones y en los ejemplares de mayor tamaño, aquellos que superan los 20 mm de longitud total, las estructuras mostraron igual configuración siendo siempre el conducto hermafrodita recto, ovotestis pequeño y los conductos de la bursa copulatrix, hermafrodita y espermioviducto de calibre reducido; estas características podrían deberse a que corresponden a individuos pre-adultos. Sin embargo, especies de otros géneros de Bulimulidae también presentan características similares en cuanto al grosor de los conductos, entre los que podemos mencionar *Berendtia taylori*, *Spartocentrum vanduzeei*, *Rabdotus inscendens* (Christensen y Miller, 1975); *Bostryx planissimus* (Breure, 1978); de esta manera, el estado de desarrollo de los ejemplares aquí estudiados, su correspondencia a individuos pre-adultos o adultos, sólo podrá ser confirmado mediante futuros estudios histológicos donde se pueda caracterizar citológicamente la línea espermatogénica y ovogénica.

Como se mencionó en el capítulo anterior, *B. rushii* también ha sido comparada con otras especies. Parodiz (1944) manifestó la similitud con *Rhinus argentinus* pero la diferenció de ésta última por carecer de una superficie con cerdas y por su distribución. Además, la comparó y diferenció de *Bulimulus durus* por aspectos de la conchilla, protoconcha y distribución. Asimismo, Cuezco et al. (2013) denotaron la similitud de la conchilla y protoconcha de ambas especies destacando la importancia de realizar análisis de partes blandas. Por este motivo, el aporte anatómico presentado en esta tesis para la especie en cuestión será de gran utilidad a la hora de realizar futuros estudios comparados con la especie antes mencionada.

Por último, para *B. vesicalis* la totalidad de las descripciones anatómicas dadas a conocer aquí constituyen el primer aporte.

Como se mencionó, la literatura previa en relación al análisis anatómico de *B. bonariensis* y *B. rushii* es parcial o puntual y nula en el caso de *B. vesicalis*, por lo tanto

lo presentado en este capítulo constituye el primer abordaje desde las descripciones originales (Rafinesque, 1833; Pfeiffer, 1853; Pilsbry, 1897).

El aporte al conocimiento de las especies, desde la morfología interna, especialmente a nivel del sistema reproductor y en particular del complejo peniano sumado a la histología en especial del pene aporta una útil variación adicional (Breure, 1979). Por este motivo, se realizaron cortes histológicos seriados en las tres especies consideradas en esta tesis, lo cual denotó y afianzó las diferencias interespecíficas previamente manifiestas desde lo anatómico.

En el análisis histológico se manifestaron, en algunos casos, diferencias sustanciales a nivel del epitelio que tapiza la luz de los distintos sectores que conforman el complejo peniano, respecto de las estructuras glandulares o musculares no se manifestaron grandes variaciones con excepción de *B. rushii* que presenta a lo largo de toda la estructura un parénquima compacto y uniforme. Por esta razón las comparaciones dadas a continuación se encuentran restringidas al epitelio interno.

En *B. vesicalis* se pudo apreciar que el complejo peniano, a la altura del flagelo, posee una luz central tapizada por un epitelio cilíndrico ciliado. Este tipo de epitelio también se observó en *B. corumbaensis* (Lanzieri y Rezende, 1965) y *D. papyraceus* (Rezende, 1967) coincidiendo con la descripción de esta estructura realizada por Van Mol (1971); sin embargo, en otra especie de la familia como *B. conspersus* Lopez y Pino (1998) manifestaron un epitelio del mismo tipo, pero no ciliado.

*B. bonariensis* y *B. vesicalis* a nivel del epifalo poseen una luz con forma de estrella tapizado por un epitelio cilíndrico ciliado al igual que *B. corumbaensis* (Lanzieri y Rezende, 1965) y *D. papyraceus* (Rezende, 1967). En *B. rushii* se observó una luz con forma de cruz y tapizada por un epitelio cúbico pluriestratificado. En esta porción del complejo peniano todas las observaciones, tanto las propias como las realizadas por otros autores, difieren del patrón común descripto por Van Mol (1971).

A nivel del pene *B. bonariensis* y *B. vesicalis* presentan una luz tapizada por un epitelio cilíndrico no ciliado al igual que lo observado en *B. conspersus* (Lopez y Pino, 1998), *B. corumbaensis* (Lanzieri y Rezende, 1965) y *D. papyraceus* (Rezende, 1967). La ubicación de la luz del pene, central en la base del mismo, luego lateralizada en dirección al epifalo y rodeada de divertículos penianos es una característica común en las especies mencionadas y en *B. limnoides* (Van Mol, 1971), con excepción de *B. conspersus*. El número de divertículos penianos es variable al comparar estas especies, contribuyendo de esta manera a la caracterización de cada una de ellas. En el caso de *B. rushii* no se han encontrados divertículos penianos, característica que también se observó en los

esquemas de la especie *Sphaeroconcha araozi* (Breure, 1978) denotando, de esta manera, que es una condición que puede presentarse en ejemplares de esta familia.

Los caracteres presentados en este capítulo para *B. bonariensis*, *B. vesicalis* y *B. rushii* constituyen el primer abordaje anatómico exhaustivo que permitió no solo poner de manifiesto características que diferencian y delimitan cada una de las especies de manera sustancial, revalidando las entidades catalogadas por Cuezco et al. (2013) sobre la base de conchillas. Al mismo tiempo, también se demostró que dentro de lo que se consideraba *B. bonariensis* por el área de distribución y los caracteres conquiolares es en realidad una reunión de varias especies. Esto se evidenció en una gran variedad de estructuras copuladoras de morfología claramente diferente, las cuales comparten la variabilidad de morfologías observadas a nivel conquiolar. Por lo tanto, sólo pueden ser reconocidas mediante el análisis de la anatomía interna y específicamente en la estructura copuladora. De esta manera, los ejemplares cuya anatomía difieren del complejo peniano “A” corresponden a morfotipos o entidades distintas, las cuales pertenecen a especies aún no descritas para la ciencia.

**PARTE 1.-**  
**ESTUDIOS MORFO-ANATÓMICOS**  
**CAPÍTULO 1.3.-**  
**ANÁLISIS GENÉTICOS**



### 1.3.A. INTRODUCCION

El uso de herramientas anatómicas y/o morfológicas fueron y son elementos claves de la variabilidad biológica utilizados en la clasificación de los organismos a nivel no sólo de especie, sino también de grupos taxonómicos superiores. No obstante, las técnicas que aportan información en cuanto a la variabilidad genética constituyen un complemento a las aplicadas hasta la actualidad (López Soriano, 2004). De esta manera, la evidencia a nivel molecular se está utilizando cada vez con mayor frecuencia en la delimitación de especies (Köhler y Johnson, 2012). Tal como los autores manifestaron, para analizar el grado de variación de la especie en cuestión, es necesario tener material proveniente del área de distribución completa sumado a una combinación de información morfológica y molecular.

En la familia Camaenidae, específicamente para las especies de *Amplirhagada* Köhler y Johnson (2012) demostraron que los caracteres más importantes para la delimitación de especies son la morfología del pene y la divergencia de marcadores mitocondriales. De esta manera, observaron que los caracteres a nivel conchival son un elemento parcialmente útil en la taxonomía de ese grupo.

Con respecto a *Bulimulus*, como venimos mencionando, la fuente de caracteres más utilizada en descripciones y re-descripciones de especies es, en su gran mayoría, sólo a nivel de la morfología externa de la conchilla. Sin embargo, como sucede en muchos gasterópodos terrestres, estos caracteres pueden no modificarse en el proceso evolutivo o verse afectado por evolución paralela (Barker, 2001). Por otro lado, se suma que la información anatómica en especies continentales es escasa. Por este motivo, existe una necesidad manifiesta de obtener datos anatómicos en combinación con moleculares a lo largo del rango de distribución que permita determinar el porcentaje umbral, o nivel de divergencia de las especies del grupo y de esta manera diferenciarlas. Asimismo, para comprender las relaciones filogenéticas y los patrones zoogeográficos (Breure, 2016 b).

Se destaca que para este género en GenBank® se encuentran disponibles algunas secuencias, que corresponden aproximadamente al 10% de las especies que lo componen. La gran mayoría de ellas, fueron aplicadas en estudios de relaciones filogenéticas dentro de la superfamilia (Breure et al., 2010; Breure y Romero, 2012).

En relación a una aplicación de índole taxonómica, son escasos los estudios de *Bulimulus* en este sentido. Breure (2016 b) estudió las secuencias de especies de *Bulimulus* nativas en la región caribeña y procedente de localidades donde había ejemplares introducidos de origen desconocido. En este caso, el análisis molecular no

sólo se aplicó como una herramienta en la delimitación de especies, sino que también persiguió identificar el origen de aquellos ejemplares que se encontraron en áreas donde representantes del género habían ingresado recientemente. Considerando lo antes dicho y teniendo en cuenta la amplia distribución de *B. bonariensis*, según la bibliografía disponible, es necesario acompañar la variación anatómica que se observó en el capítulo anterior con información de base genética. De esta forma se podrá, por un lado, poner a prueba la hipótesis de que existe una correspondencia entre lo anatómico y molecular para delimitar todo un conjunto de especies que hasta el momento eran imposibles de reconocer únicamente por examen conquiolar. Por otro lado, el definir y delimitar las entidades presentes en el territorio argentino es valorable no sólo para fortalecer el conocimiento de dichas entidades, sino que también la información generada podrá ser aplicada en la identificación de ejemplares en áreas fuera del rango de su ocupación.

Entre otras de las diversas aplicaciones de la información genética se encuentra el análisis de poblaciones a los fines de la conservación, sobre todo al considerar la rápida degradación de ciertos ecosistemas (Ramirez y Ramirez, 2013). Considerando que *B. rushii* y *B. vesicalis* se encuentran en las listas de especies terrestres prioritarias para la conservación (Clavijo y Scarabino, 2013), es de suma importancia que se caractericen no sólo desde lo morfológico y anatómico sino también, en lo posible, desde los atributos genéticos a fin de comenzar a identificar haplotipos y áreas de urgente protección para las especies en cuestión.

Por lo antes expuesto, el presente capítulo tiene como objetivo abordar estudios genéticos de las tres entidades, con el fin de contribuir a la diferenciación de especies de *Bulimulus* y, de esta manera, corroborar si las diferencias observadas en las secuencias genéticas de los genes COI y 16S acompañan a las variaciones anatómicas interespecíficas.

### 1.3.B. MATERIALES Y METODOS

#### 1.3.B.1. Material estudiado

Del material disponible para la realización de la presente tesis (**Parte 1.-, Capítulo 1.1.-, Tabla 1.1.1**), empleado para analizar la estructura conquiolar (**Capítulo 1.1.-, Tabla 1.1.2**) y las partes blandas (**Capítulo 1.2.-, Tabla 1.2.1**), se seleccionaron para abordar el actual capítulo 29 ejemplares identificados como *B. bonariensis*, 2 ejemplares de *B. vesicalis* y 3 ejemplares de *B. rushii* (**Tabla 1.3.1**).

**Tabla 1.3.1**

*Material implementado en el análisis genético*

ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	LOCALIDAD/ PROVINCIA	ID DEL LOTE/ EJEMPLAR	LOCALIDAD/ PROVINCIA
<b><i>B. bonariensis</i></b>			
MLP-Ma 15167	Fcio. Varela/Bs. As	IBS-Ma 362-1	Avellaneda/Santa Fé
MLP-Ma 15169/f	Fcio. Varela/Bs. As	IBS-Ma 362-2	Avellaneda/Santa Fé
MLP-Ma 15166	Fcio. Varela/Bs. As	IBS-Ma 362-3	Avellaneda/Santa Fé
MLP-Ma 15168/b	Fcio. Varela/Bs. As	IBS-Ma 363	Avellaneda/Santa Fé
MLP-Ma 15168/c	Fcio. Varela/Bs. As	IBS-Ma 393	Posadas/Misiones
MLP-Ma 15168/d	Fcio. Varela/Bs. As	MLP-Ma 15184/a	V. del Dique/Córdoba
MLP-Ma 15160/a	Chascomús/Bs. As.	MLP-Ma 15188/b	Larroque/Entre Ríos
MLP-Ma 15160/b	Chascomús/Bs. As.	MLP-Ma 15188/c	Larroque/Entre Ríos
MLP-Ma 14629/b	La Plata/Bs. As.	MLP- Ma 14522	V. Gral. Belgrano/Córdoba
MLP-Ma 14629/e	La Plata/Bs. As.	MLP-Ma 14544/e	Larroque/Entre Ríos
MLP-Ma 15178/a <b>k</b>	Resistencia/Chaco	<b><i>B. rushii</i></b>	
MLP-Ma 15183/a	Miramar/Córdoba	MLP-Ma 15159/a <b>k</b>	Cabildo/Bs. As.
MLP-Ma 15183/b	Miramar/Córdoba	MLP-Ma 15159/e	Cabildo/Bs. As.
MLP-Ma 15186/b	Mercedes/Corrientes	MLP-Ma 15159/i <b>k</b>	Cabildo/Bs. As.
MLP-Ma 15186/c <b>k</b>	Mercedes/Corrientes		
MLP-Ma 14825/b	Ituzaingó/Corrientes	<b><i>B. vesicalis</i></b>	
MLP-Ma 14825/c	Ituzaingó/Corrientes	MLP-Ma 14685/b	Colastiné/Santa Fé
MLP-Ma 14643	La Plata/Bs. As.	MLP-Ma 15157 <b>k</b>	Atalaya/Bs. As.
IBS-Ma 486	Posadas/Misiones		

Con la letra “**k**” se denota las muestras cuya extracción de ADN se realizó mediante Kit.

#### 1.3.B.2. Procesamiento de las muestras

Luego de relajar y sacrificar los ejemplares, tal como se explicó previamente en la **Parte 1.-, Capítulo 1.2.-, apartado 1.2.B.2.**, se resguardaron muestras de tejido de la masa muscular del pie de cada individuo con el fin de realizar los estudios genéticos. Las muestras, de aproximadamente 2 mm<sup>3</sup>, se conservaron en microtubos de 1,5 ml con 1 ml

de alcohol etílico absoluto, el cual fue remplazado a los diez días. Las muestras fueron resguardadas a -20°C hasta el momento de proceder con la extracción de ADN.

### 1.3.B.3. Extracción de ADN genómico total

Se realizó la extracción de ADN genómico total a partir de tejido proveniente del pie, en las muestras indicadas con la letra “K” en la **Tabla 1.3.1**, la extracción fue mediante Kit Qiagen siguiendo el protocolo del fabricante.

En las muestras restantes se aplicó el protocolo de CTAB estándar (Sambrook et al., 1989):

- Enjuague de la muestra: Se transfirió el tejido a un microtubo de 1,5 ml estéril libre de ADNAsas y ARNAsas, agregó 1 ml de agua ultrapura (HPLC) y se mezcló con movimientos de ascenso y descenso del líquido utilizando micropipeta, luego se empleó un vortex de 15 seg de duración.

- Disgregación: Se adicionaron 500 µl de solución de hidratación (100 mM Tris/HCl y 20 mM EDTA a pH 7,5) y con el uso de un tip se disgregó el tejido.

- Digestión: Al microtubo se le adicionaron 500 µl de buffer CTAB (2 %p/v de CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2 %p/v de 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA y 100 mMTris/HCl a pH 7.5) y 10 µl de proteinasa K (5 mg/ml). Fue sellado con parafilm y se incubó en baño termostático a 56°C durante 24 horas “*over nighth*” (ON).

- Extracción Orgánica: Luego de la incubación y de verificar la total digestión del tejido se realizaron tres lavados orgánicos con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) procediendo de la siguiente manera: agregado de cloroformo/alcohol isoamílico hasta completar 1,5 ml y se centrifugó 5 min a 10.000 g, luego se trasvaso la fase acuosa (fase superior) a un nuevo microtubo para realizar el siguiente lavado, se descartó la fase orgánica (fase inferior).

- Precipitación: Al finalizar el tercer lavado, se trasvasó la fase acuosa (fase superior) a un nuevo microtubo, en función de la cantidad recuperada se añadió 2/3 (v/v) de alcohol isopropílico. Luego se homogeneizó por inversión y colocó a -20°C durante al menos una hora. Posteriormente, se centrifugó por 10 min a 10.000 g y descartó el alcohol isopropílico mediante un ligero volcado del mismo. El microtubo conteniendo el *pellet* de ADN se dejó secar, en posición horizontal, a temperatura ambiente por 24 horas o hasta no observar gotículas de alcohol en el interior del microtubo.

- Rehidratación: El ADN genómico total fue re-suspendido en *buffer* de hidratación (100 mM Tris/HCl y 1 mM EDTA a pH 7,5) durante 24 horas a temperatura ambiente, sellado con parafilm. Luego, se empleó un vortex, se centrifugó durante 5 min a 10.000 *g* y guardó a 4 °C hasta el momento del chequeo mediante electroforesis horizontal.

- Testeo de extracción: Para verificar la presencia de ADN en el producto de extracción y el rendimiento del mismo se realizaron electroforesis horizontal (5 V/cm) en gel de agarosa al 1% (p/v) teñida con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) (Green y Sambrook, 2012). La corrida del material genético se realizó a 90V constante durante 45 min junto a marcadores, *DNA Ladder* de 1 Kpb (Productos Bio-Lógicos, Argentina), con el fin de constatar la cantidad y condición del ADN obtenido. Posteriormente, los geles fueron trasladados a un transiluminador (UVP-TM-20) donde se expusieron a luz UV y fotografiaron.

#### 1.3.B.4. Amplificación de genes mitocondriales

De aquellos ejemplares que fue posible realizar una extracción de ADN genómico total de buen rendimiento e integridad, se utilizaron alícuotas para el empleo de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y de esta manera obtener amplificaciones de dos marcadores mitocondriales. Los cuales fueron: el gen ribosomal 16S (16S-ARNr) y el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI).

El *primer* o cebador utilizado para la amplificación del gen COI fue el de uso universal para invertebrados (Folmer et al., 1994)

LCO 1490 5' -GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'

HCO 2198 5' -TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'

Mientras que para el gen 16S, se empleó un cebador específico para moluscos (Jaramillo Roldán et al., 2014).

16SF-104 5' - GAC TGT GCT AAG GTA GCA TAA T -3'

16SR-472 5' - TCG TAG TCC AAC ATC GAG GTC A -3'

En ambos casos, los mismos fueron provistos por Biodynamics S.R.L. o Macrogen Inc.

La mezcla de reacción utilizada en la amplificación de los genes mencionados se da en la **Tabla 1.3.2**. La elaboración de la mezcla de reacción y la combinación con las alícuotas de ADN a amplificar se realizó bajo Cabina Ivema C9. Luego, las

amplificaciones propiamente dichas se realizaron en termocicladores Ivema T18, bajo los perfiles térmicos de ciclado indicados en la **Tabla 1.3.3**.

**Tabla 1.3.2**

*Composición de la mezcla de reacción utilizada en la amplificación de 16S ARNr y COI*

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN FINAL	
	16S ARNr	COI
<i>Buffer</i>	[1X]	[1X]
$Cl_2Mg$	[2 mM]	[2,5 mM]
<i>Mix dNTPs</i>	[0,2 mM]	[0,05 mM]
<i>Cebador forward</i>	[0,2 $\mu$ M]	[0,1 $\mu$ M]
<i>Cebador reverse</i>	[0,2 $\mu$ M]	[0,1 $\mu$ M]
<i>Taq Polimerasa*</i>	[1,2 U]	[1,2 U]
Templado de ADN	[50-100 ng]	[50-100 ng]
H2O ultrapura	c.s.	c.s.
Volumen Final	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l

Se especifica entre corchetes la concentración final por reacción. \*Pegasus Taq DNA Polymerase (Productos Biológicos®, #EA0101).

*Abreviaturas:* cantidad suficiente (c.s), microlitro ( $\mu$ l), micromolar ( $\mu$ M), milimolar (mM), nanogramo (ng), unidades (U).

**Tabla 1.3.3**

*Perfiles de ciclado térmico*

ETAPA	COI	16S
<b>Desnaturalización inicial</b>	94°C (3 min)	-
<b>Ciclos aplicados</b>	5	35
<b>Desnaturalización</b>	94°C (30 seg)	94°C (30 seg)
<b>Hibridación</b>	45°C (40 seg)	48°C (30 seg)
<b>Extensión</b>	72°C (1 min)	72°C (1 min)
<b>Ciclos aplicados</b>	35	-
<b>Desnaturalización</b>	94°C (30 seg)	-
<b>Hibridación</b>	51°C (40 seg)	-
<b>Extensión</b>	72°C (1 min)	-
<b>Extensión final</b>	72°C (10 min)	72°C (10 min)

Posteriormente, se evaluó el resultados de las PCR mediante una electroforesis horizontal (5 V/cm) en geles de agarosa al 1,5 % (p/v) teñidos con bromuro de etidio (0,5 mg/ml) (Green y Sambrook, 2012). La corrida de los productos de PCR se realizó a 90V constante durante 45 min junto a marcadores, *DNA Ladder* de 100 pb de precisión

(Productos Bio-Lógicos, Argentina). Los geles se trasladaron al transiluminador donde se expusieron a luz UV, observaron y fotografiaron.

### **1.3.B.5. Purificación y secuenciación**

Las amplificaciones obtenidas se purificaron, con el fin de eliminar contaminantes que pudieran interferir con la reacción de secuenciación. De esta manera, los productos de PCR exitosos fueron purificados a partir de solución, mediante el uso del kit comerciales AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer) siguiendo el protocolo del fabricante.

Luego, los productos de PCR ya purificados se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a la empresa de biotecnología Macrogen, Inc. ubicada en Corea del Sur.

Los electroferogramas, correspondientes a las secuencias sentido y anti-sentido, fueron editados para remover los cebadores mediante el uso de los programas Chromas Lite 2.66 (Technelysium Pty Ltd.). Posteriormente, para obtener las secuencias consenso, se utilizó el programa BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999). Por otra parte, mediante inspección visual de las secuencias y con los valores de calidad aportados por el servicio de secuenciación se evaluó la calidad de las mismas para cada marcador e individuo.

### **1.3.B.6. Análisis Bioinformático**

Las secuencias obtenidas, para el gen COI, fueron alineadas utilizando el programa Clustal X 2.1 (Larkin et al., 2007), al cual se aplicó los parámetros dados por defecto.

Respecto del marcador mitocondrial 16S ARNr el alineamiento se realizó mediante el programa *on-line* MAFFT v7 (Kato y Standley, 2013), el cual es recomendado para este tipo de marcador que usualmente presenta gaps de tamaños variables (Fontaneto et al., 2015). En el cual se aplicó la estrategia por método de refinamiento iterativo G-INS-i recomendado para secuencias con homología global.

Los alineamientos se analizaron mediante el software DnaSP 6.12.01 (Rozas et al., 2017) para cuantificar el número de haplotipos, el cual indica el número de secuencias dentro de una muestra que difieren en al menos una base.

### 1.3.B.6.a. Distancia genética

La divergencia entre dos secuencias de nucleótidos puede considerarse una medida de distancia genética (Nei y Kumar, 2000). Ese grado de divergencia puede ser calculado de manera simple como distancia genética no corregida, suponiendo que las sustituciones nucleotídicas ocurridas son igualmente probables. De esta manera, se mide como la proporción  $p$  de sitios distintos entre dos secuencias dadas o la simple proporción de sitios nucleotídicos en las cuales dos secuencias son diferentes (Martínez Lage y González Tizón, 2004). Debido a que las probabilidades de mutación de cualquier base por otra no son iguales, hay modelos para calcular las distancias genéticas de forma corregida, donde se admiten probabilidades diferentes en las sustituciones según el tipo de base involucrada. El modelo aquí aplicado corresponde al de sustitución nucleotídica de Kimura dos Parámetros (K2P) y ambos tipos de distancia genética tanto para COI como para 16S fueron estimadas mediante MEGA X (Kumar et al., 2018).

### 1.3.B.6.b. Abordaje Filogenético

Posteriormente, las entidades de *Bulimulus* que pudieron ser secuenciadas fueron analizadas mediante abordajes filogenéticos, separados para cada marcador. Los árboles fenéticos y filogenéticos se reconstruyeron a partir de un método basado en matrices de distancia, *Neighbor-Joining* con el programa MEGA X mediante el modelo K2P a partir de 1000 réplicas de *bootstrap*. Y un segundo método basado en estado de carácter, Inferencia Bayesiana, mediante el programa Mr. Bayes 3.2 (Ronquist et al., 2012). Con dos corridas simultaneas, cuatro cadenas de Markov, que fueron corridas 1 millón de generaciones con una frecuencia de muestreo cada 100 generaciones y con los parámetros del mejor modelo, GTR+I para COI y HKY+G para 16S ARNr, seleccionado en jModelTest 2.1.7 (Darriba et al., 2012) como el modelo de evolución molecular que mejor se ajusta al conjunto de datos bajo el Criterio de Información de Akaike e Inferencia Bayesiana. Las probabilidades posteriores fueron obtenidas después de descartar las primeras 1.001 muestras de cada corrida, por lo cual el consenso final se basa en 18.000 árboles. Los valores de soporte de nodos se expresaron como probabilidades. Como grupo externo se utilizaron las secuencias disponibles en GenBank para *Megalobulimus oblongus lorentzianus* (16S ARNr: KT951967.1; COI: KT951893.1) por ser una subespecie nativa procedente de Buenos Aires.

### 1.3.B.6.c. Delimitación de especies

Adicionalmente se utilizaron dos métodos de delimitación molecular de especies con el fin de poner a prueba lo observado desde la anatomía del complejo peniano manifiesto en el **Capítulo 1.2.-** y los resultados obtenidos en los abordajes filogenéticos.

Por un lado, se llevó adelante el análisis ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) a través de su servidor en línea (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>). Este modelo agrupa las secuencias en base a las distancias genéticas con la intención de detectar diferencias entre distancias intra e interespecíficas. Asume que las distancias genéticas entre individuos de la misma especie son menores que la distancia entre individuos de especies diferentes (Puillandre et al., 2012). Se aplicó con una distancia intraespecífica mínima (Pmin) de 0.001 y una distancia intraespecífica máxima (Pmax) de 0.1, el parámetro *barcode gap width* se utilizó con la configuración predeterminada (1.5) y los modelos evolutivos fueron K2P y Jukes-Cantor (JC69) (Jukes y Cantor, 1969).

Además, se utilizó el método  $\kappa/\theta$  que se basa en el concepto de especie genético evolutivo (EGSC). El cual aplica la teoría de la genética de poblaciones a las secuencias de ADN para determinar si las mismas provienen de una, dos o más especies (Birky, 2013). Mediante este método, se identifica a las especies como muestras de poblaciones que evolucionaron de manera independiente el tiempo suficiente como para formar grupos (clados) separados (Schön et al., 2012). La obtención de los parámetros se realizó siguiendo a Schön et al. (2012). Finalmente, aquellos grupos o clados comparados que tengan un valor de  $\kappa/\theta \geq 4$  son consideradas especies diferentes con una probabilidad  $\geq 0,95$ .

### 1.3.C. RESULTADOS

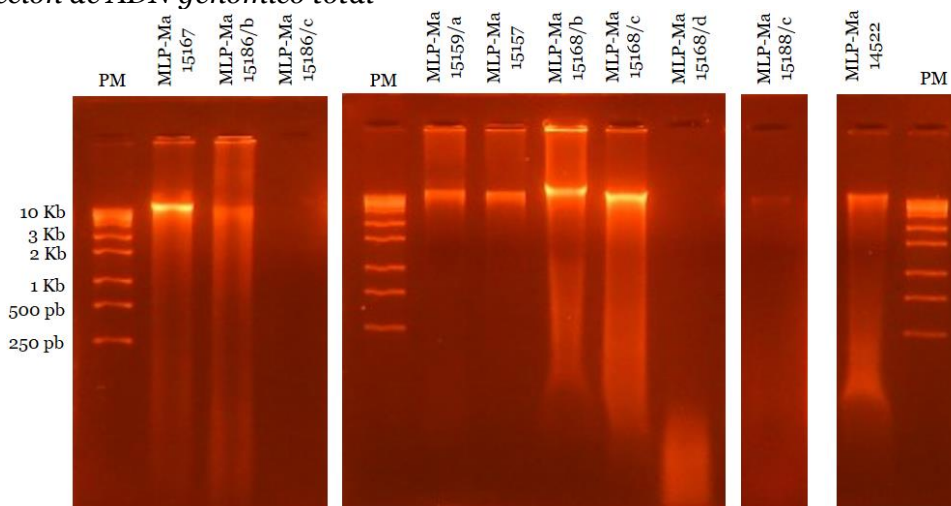
#### 1.3.C.1. Extracción de ADN genómico total

Mediante el protocolo CTAB fue posible realizar la extracción de ADN de ejemplares determinados como *B. bonariensis* procedente de seis provincias. Respecto de *B. vesicalis* y *B. rushii* se pudo extraer ADN, mediante Kit, de un único ejemplar correspondiente a cada especie.

En la mayoría de las muestras tratadas se pudo realizar una extracción exitosa que se evidenció mediante el chequeo por electroforesis. Donde se apreció muestras con muy buen a excelente rendimiento e integridad (**Fig. 1.3.1**) (MLP-Ma 15167, MLP-Ma 15169/f, MLP-Ma 15166, MLP-Ma 15168/b, MLP-Ma 15168/c, MLP-Ma 14629/b, MLP-Ma 15178/a, MLP-Ma 15183/a, MLP-Ma 15183/b, IBS-Ma362-1, IBS-Ma362-2, IBS-Ma362-3, IBS-Ma363, IBS-Ma 393, MLP-Ma 14544/e, MLP-Ma 15159/a, MLP-Ma 15157); muestras con bajo rendimiento (IBS-Ma 486, MLP-Ma 15188/c); algunas muestras con buen rendimiento pero con degradación (MLP-Ma 15160/a, MLP-Ma 14522) y otras con alto nivel de degradación (MLP-Ma 15186/b, MLP-Ma 15184/a, MLP-Ma 15188/b, MLP-Ma 14685/b) todas las mencionadas fueron utilizadas en la técnica de PCR. Por otra parte, un grupo de muestras no mostraron evidencia de ADN (MLP-Ma 15168/d, MLP-Ma 15160/b, MLP-Ma 14629/e, MLP-Ma 15186/c, MLP-Ma 14825/b, MLP-Ma 14825/c, MLP-Ma 14643, MLP-Ma 15159/e, MLP-Ma 15159/i). El criterio bajo el cual se interpretó el producto de extracción se muestra en la **Figura 1.3.1**.

**Figura 1.3.1**

#### Extracción de ADN genómico total



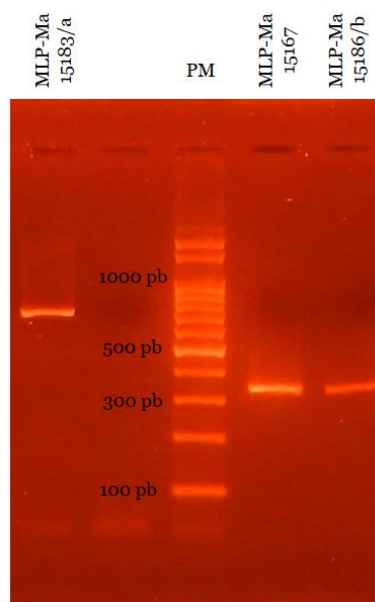
Electroforesis en gel de agarosa al 1%. PM: DNA Ladder 1kb (Productos Bio-Lógicos).

### 1.3.C.2. Amplificación de genes mitocondriales

El nivel de éxito en la amplificación de los genes fue mayor en 16S (20 secuencias) que en COI (13 secuencias). De esta manera, se obtuvieron fragmentos de 700 pb y 350 pb (**Fig. 1.3.2**). Luego de la edición, las secuencias consenso tuvieron una longitud de 655 pb para el gen COI y entre 283-289 en el caso del gen 16S.

#### Figura 1.3.2

*Amplificación de regiones parciales de los genes COI y 16S*



Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. PM: *Ladder* 100 pb precisión (Productos Bio-Lógicos), a la izquierda del *Ladder* gen COI y a la derecha gen 16S.

### 1.3.C.3. Análisis y edición de secuencias

Los electroferogramas obtenidos para cada individuo y para cada marcador mitocondrial, fueron analizados en el sentido de cada *primer*, en paralelo para constatar la complementariedad de las secuencias y los valores de calidad. La gran mayoría de las secuencias mostraron picos con buena separación entre ellos y homogeneidad de altura a lo largo las mismas. Al igual que una complementariedad del 100% entre las secuencias sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*). A modo de ejemplificar, en la **Figura 1.3.3** se muestra parte de los electroferogramas obtenidos para el ejemplar MLP-Ma 15166.

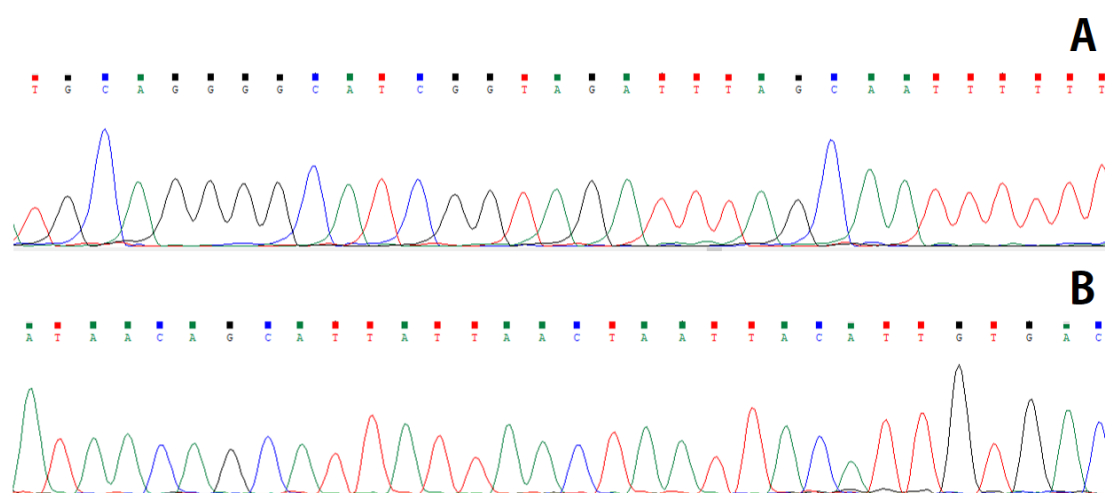
Por otra parte, en relación a MLP-Ma 15159/a, la secuencia correspondiente mostró una gran cantidad de solapamientos en los picos y áreas intercaladas donde se

manifestaron picos de poca altura y otros muy elevados por lo cual la correcta identificación de los nucleótidos fue imposible.

Luego del análisis y edición se contó con un total de 33 secuencias (ver **Anexo**), de las cuales 13 corresponden al marcador COI (con número constante de nucleótidos, 655) y 20 secuencias corresponden al marcador 16S ARNr (cuyo número de nucleótidos es variable, entre 283 – 289).

### Figura 1.3.3

*Electroferogramas parciales de MLP-Ma 15166*



Se muestra parte de los electroferogramas correspondientes al marcador mitocondrial. **A-** COI. **B-** 16S.

#### 1.3.C.4. Análisis Bioinformático

De las 33 secuencias obtenidas se encontraron nueve haplotipos para el gen COI, cuatro dentro del morfotipo 1 (*B. bonariensis*), uno en el morfotipo 2 y cuatro en el morfotipo 3. En relación al gen 16 S se identificaron trece haplotipos, cuatro en el morfotipo 1, cuatro en el morfotipo 3 y uno para cada morfotipo restante.

##### 1.3.C.4.a. Distancias genéticas

Las distancias genéticas no corregidas (distancia *p*) y corregidas (K2P) para los marcadores COI y 16S se agruparon por morfotipo y se muestran en la **Tabla 1.3.4** y **Tabla 1.3.5** respectivamente. Considerando las estimaciones de varios invertebrados los cuales contemplan hasta una tasa del 2,2 % por millón de años (Städler et al., 2005), nótese que las distancias aquí calculadas superan ampliamente y en todos los casos el

5 %. Las distancias  $p$  y K2P, para ambos marcadores, comparando todas las secuencias obtenidas se presentan en la **Tabla 1** y **Tabla 2** de la sección **Anexo**.

**Tabla 1.3.4**

*Distancias genéticas basadas en el marcador COI*

	Mt. 1	Mt. 2	Mt. 3
<b><i>B. bonariensis</i></b>			
<b>Mt. 1</b>			
MLP-Ma 15166			
MLP-Ma 15167			
MLP-Ma 15168/b	-	27,83	28,18
MLP-Ma 15168/c			
MLP-Ma 14629/b			
MLP-Ma 15169/e			
<b>Mt. 2</b>			
MLP-Ma 15160/a	23,21	-	25,95
<b>Mt. 3</b>			
MLP-Ma 15178/a			
MLP-Ma 15183/a			
MLP-Ma 15183/b			
IBS-Ma 185	23,21	21,78	-
IBS-Ma 363			
IBS-Ma 393			

Los valores están expresados en porcentaje. La diagonal separa las distancias  $p$  (abajo) de las K2P (arriba).

*Abreviaturas:* morfotipo (Mt).

**Tabla 1.3.5***Distancias genéticas basadas en el marcador 16S*

	Mt. 1	Mt. 2	Mt. 3	Mt. 4	Mt. 5	Mt. 6	Mt. 7	<i>B. vesicalis</i>
<b><i>B. bonariensis</i></b>								
<b>Mt. 1</b>								
MLP-Ma 15166								
MLP-Ma 15167	-	36,57	25,00	27,98	25,91	25,02	25,32	27,43
MLP-Ma 15168/b								
MLP-Ma 15168/c								
MLP-Ma 14629/b								
MLP-Ma 15169/e								
<b>Mt. 2</b>								
MLP-Ma 15160/a	28,93	-	39,33	35,97	37,77	39,11	40,74	37,13
<b>Mt. 3</b>								
MLP-Ma 15178/a								
MLP-Ma 15183/a								
MLP-Ma 15183/b	21,26	30,60	-	20,13	18,89	14,05	11,54	21,50
IBS-Ma 185								
IBS-Ma 363								
IBS-Ma 393								
<b>Mt. 4</b>								
IBS-Ma 362-1								
IBS-Ma 362-2	23,32	28,57	17,61	-	7,76	20,74	21,17	8,52
IBS-Ma 362-3								
<b>Mt. 5</b>								
MLP-Ma 15188/c	21,91	29,64	16,67	7,34	-	21,18	20,19	8,9
<b>Mt. 6</b>								
MLP-Ma 14544/e	21,28	30,47	12,80	18,09	18,44	-	14,44	22,61
<b>Mt. 7</b>								
MLP-Ma 14522/a	21,48	31,43	10,66	18,37	17,67	13,12	-	24,00
<b><i>B. vesicalis</i></b>								
MLP-Ma 15157/a	22,97	29,29	18,67	8,04	8,39	19,5	20,49	-

Los valores están expresados en porcentaje. La diagonal separa las distancias *p* (abajo) de las K2P (arriba).  
 Abreviaturas: morfotipo (Mt).

### 1.3.C.4.b. Abordaje Filogenético

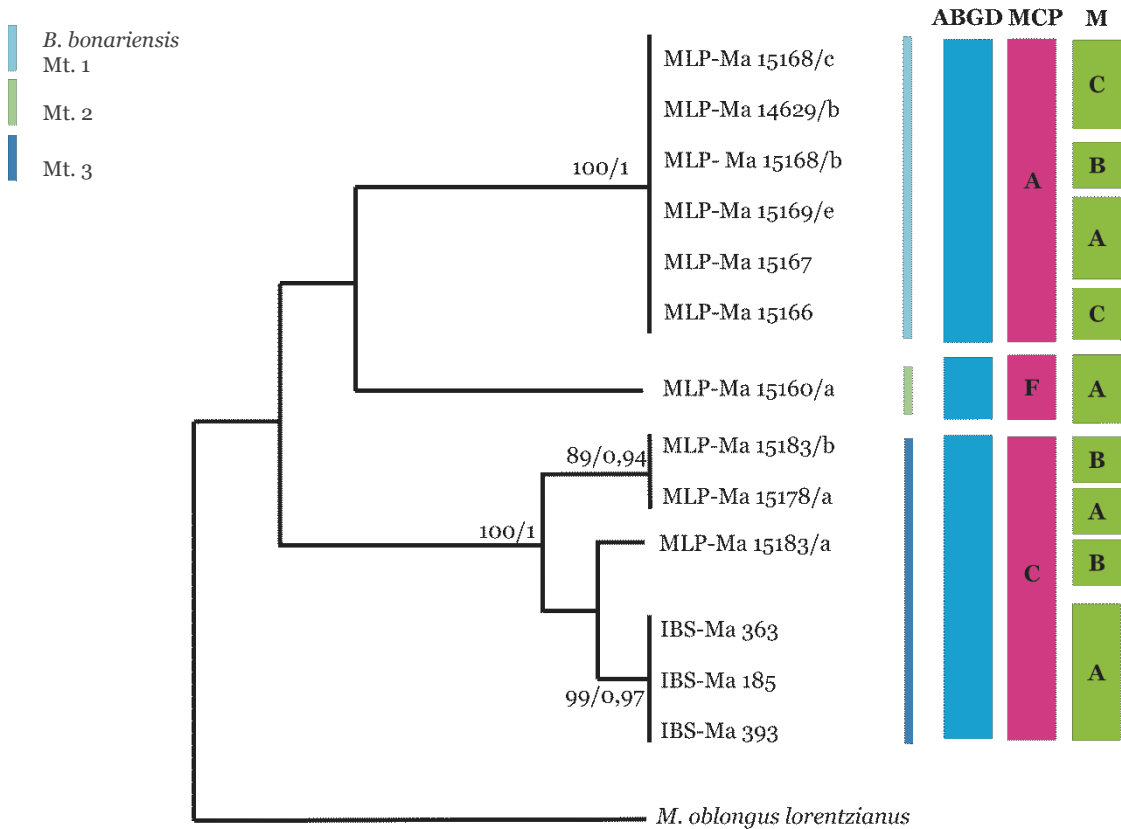
Los árboles obtenidos para el marcador COI a partir del método de reconstrucción fenética (NJ) y filogenética (IB) resultaron en igual topología. Mostrando tres agrupamientos, por una lado ejemplares de *B. bonariensis* colectados en Florencio Varela, diferenciado de uno de los individuos procedente de Chascomús y separados de ejemplares de Misiones, Córdoba y Chaco (**Fig. 1.3.4**).

Por otra parte, los árboles obtenidos para el marcador 16S ARNr a partir de ambos métodos (NJ e IB) también resultaron en igual topología. La disponibilidad de mayor número de secuencias para este gen hizo posible no sólo afianzar los resultados

obtenidos para el gen COI, sino también apoyar y reafirmar lo observado desde la morfología del complejo peniano en el **Capítulo 1.2.- (Fig. 1.3.5)**.

**Figura 1.3.4**

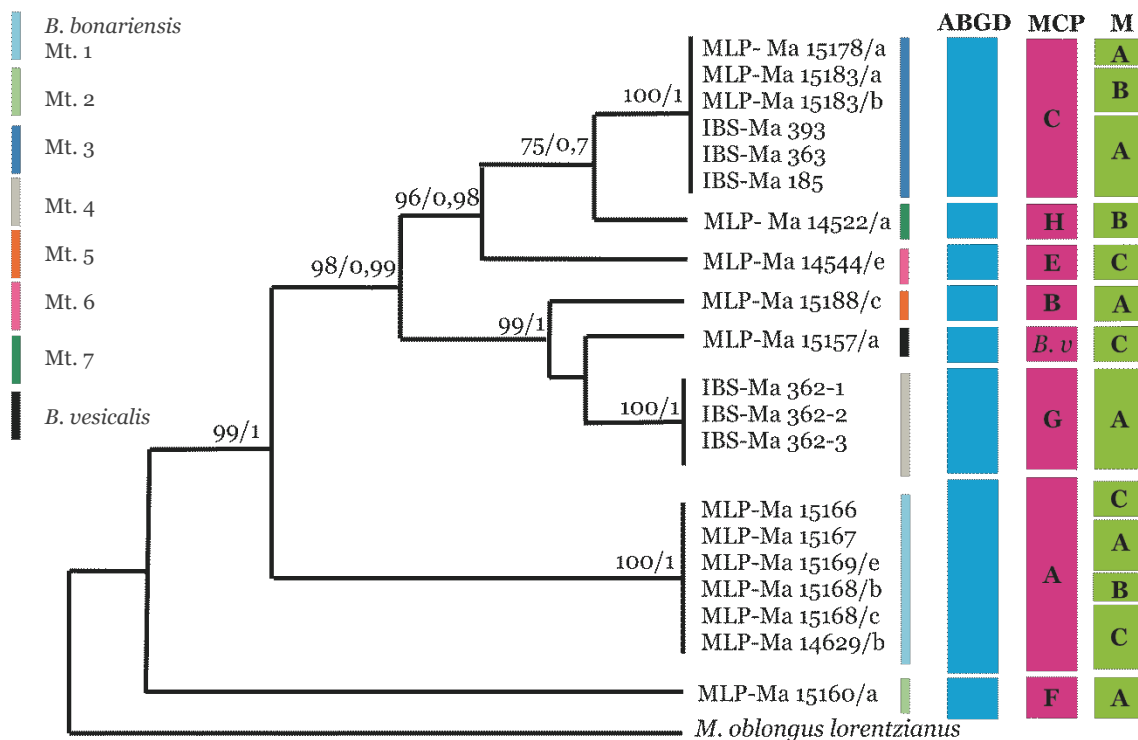
*Árbol basado en la región parcial del gen COI*



En los nodos se indican los valores de *bootstrap* (>70) obtenidos para el árbol de NJ, así como la probabilidad *a posteriori* para IB (>0,7). A la derecha en celeste se representan los resultados del análisis ABGD; en rosa MCP (Morfología del complejo peniano, ver **Fig. 1.2.12, Capítulo 1.2.-**) y en verde M (Morfología conquiolar, ver **Fig. 1.1.4-Fig. 1.1.6, Capítulo 1.1.-**).

**Figura 1.3.5**

Árbol basado en la región parcial del gen 16S ARNr



En los nodos se indican los valores de *bootstrap* (>70) obtenidos para el árbol de NJ, así como la probabilidad *a posteriori* para IB (>0,7). A la derecha en celeste se representan los resultados del análisis ABGD; en rosa MCP (Morfología del complejo peniano, ver **Fig. 1.2.12, Capítulo 1.2.-**) y en verde M (Morfología conquiolar, ver **Fig. 1.1.4-Fig. 1.1.6, Capítulo 1.1.-**). *B. v* corresponde a la morfología del complejo peniano de *B. vesicalis* indicada en la **Fig. 1.2.25 (Capítulo 1.2.-)**.

### 1.3.C.4.c. Delimitación de especies

Mediante el método ABGD se pudo sustentar lo observado desde el estudio anatómico a nivel de la estructura del complejo peniano. Los resultados del presente análisis se volcaron gráficamente en los árboles dados en la **Figura 1.3.4** y **Figura 1.3.5**. La visualización de los mismos se puede apreciar en el apartado **Anexo Figura 1** y **Figura 2**.

Por otra parte, los grupos testeados mediante el método  $\kappa/\theta$ , para ambos genes, que arrojaron un valor  $\geq 4$  (**Tabla 1.3.6** y **Tabla 1.3.7**) corresponden a especies diferentes. Por lo tanto, fue posible corroborar mediante la aplicación del concepto de especie genético evolutivo lo observado desde la anatomía del complejo peniano.

**Tabla 1.3.6**Resumen de los resultados  $\kappa/\theta$  testeados en base al set de datos del gen COI

Grupos testeados	$\kappa$	$\theta$	$\kappa/\theta$
<b>Mt. 1 (<i>B. bonariensis</i>) y Mt. 2</b>	0,27830	0,00061	455,34
<b>Mt. 1 (<i>B. bonariensis</i>) y Mt. 3</b>	0,28180	0,01507	18,69
<b>MLP-Ma 15183/b+ 15178/a y MLP-Ma 15183/a+ IBS- Ma 363+ 185+ 393</b>	0,01741	0,00927	1,40

Abreviaturas: morfotipo (Mt).

**Tabla 1.3.7**Resumen de los resultados  $\kappa/\theta$  testeados en base al set de datos del gen 16S ARNr

Grupos testeados	$\kappa$	$\theta$	$\kappa/\theta$
<b>Mt. 3 y Mt. 7</b>	0,115419	0,001411	81,79
<b>Mt. 3 y Mt. 6</b>	0,140499	0,001411	99,56
<b><i>B. vesicalis</i> y Mt. 4</b>	0,085193	0,003359	25,35
<b>Mt. 5 y Mt. 4</b>	0,077552	0,003359	23,08
<b>Mt. 1 (<i>B. bonariensis</i>) y Mt. 2</b>	0,365702	0,001340	272,87
<b>Mt. 1 (<i>B. bonariensis</i>) y Mt. 4</b>	0,279820	0,003359	83,29
<b>Mt. 1 (<i>B. bonariensis</i>) y Mt. 3</b>	0,250004	0,001411	177,17

Abreviaturas: morfotipo (Mt).

### 1.3.D. DISCUSIÓN

Como se mencionó previamente en la Introducción, para los *Bulimulus* de la Argentina sólo existe disponible hasta la actualidad en GenBank una secuencia correspondiente a *B. gracilis*. De este modo, las secuencias obtenidas durante el abordaje del presente capítulo constituye el primer análisis genético enfocado exclusivamente en algunas especies argentinas. Vale destacar que también constituyen las primeras secuencias aportadas del gen 16S para el género.

Como previamente se trató durante el desarrollo del **Capítulo 1.1.-** en relación a *B. bonariensis* se pudo reconocer que existen tres morfologías a nivel de la conchilla claramente diferentes entre sí. Además, en el desarrollo del **Capítulo 1.2.-** se demostró que existen diferentes morfotipos de *B. bonariensis* los cuales se manifestaron por distintas configuraciones de complejo peniano, cuyos ejemplares comparten la misma variabilidad de estructura conquiolar. En el desarrollo del presente capítulo, se pudo reafirmar que las diferencias observadas en la anatomía se encuentran respaldadas por disimilitudes genéticas calculadas mediante distancias genéticas, pero también mediante abordajes filogenéticos y con el tratamiento de dos métodos de delimitación de especie en uno de los cuales se aplica el concepto de especie genético evolutivo. Así, las diferencias anatómicas manifiestas en el complejo peniano y la correspondencia de dichos ejemplares con secuencias dispares que acompañan tales disimilitudes, demuestran que los morfotipos presentados constituyen especies distintas. De esta manera, se sustenta que los abordajes anatómicos tienen buen peso para discriminar especies y más aún si son acompañados de secuencias que la respalden.

Con respecto a *B. vesicalis*, la secuencia obtenida para el gen 16S quedó diferenciada de otras por un porcentaje de al menos 8,04 % sin embargo, dicha secuencia mostró encontrarse en medio de otras, confirmando así la pertenencia al mismo complejo de especies. Los abordajes filogenéticos realizados a partir de ambos genes muestran que la población de Chascomús, morfotipo 2, se encuentra más relacionada con la de Florencio Varela, morfotipo 1, que con las procedentes del norte del país; sin embargo, el  $\kappa/\theta$  calculado mostró ser el de mayor valor entre los grupos testeados. El morfotipo 3 tiene una distribución amplia encontrándose en Chaco, Córdoba y Misiones y además mostró estar relacionada al Morfotipo 7, también procedente de Córdoba; sin embargo, el  $\kappa/\theta$  calculado fue menor al compararse con el Morfotipo 1 que al comparar 1 con 2. Entre los morfotipos 1-2 y 3-7 se encuentran otros morfotipos e incluso la especie *B. vesicalis*, la cual como dijimos previamente estaría incluida dentro del complejo de especies. Aunque aquí se presenta un comienzo en el análisis de las hipótesis

filogenéticas relacionando especies argentinas, en la medida que se continúe avanzando en la secuenciación de mayor número de ejemplares, probablemente estas relaciones vayan modificándose y se podrá ir avanzando en la mejor comprensión de la historia evolutiva del género.

Desafortunadamente, no fue posible obtener el mismo número de secuencias para el gen COI que el amplificado para 16S. Esto se debe a que la secuencia del primer gen mencionado es más extensa en cuanto al número de bases que lo componen y a que el modo de conservación del material tanto propio como el proveniente de colectas previas no fue el adecuado para evitar la acidificación y por lo tanto la degradación del ADN (Hajibabaei et al., 2005).

En relación a *B. rushii*, no fue posible obtener información genética debido a la antigüedad del material disponible y a la conservación del mismo, aunque quedó demostrado que en entidades de este género la comparación de estructuras anatómicas resultan de gran utilidad al momento de delimitar especies. Será interesante, disponer a futuro de material fresco para enriquecer las relaciones filogenéticas de especies así como la variabilidad intraespecífica.

Como se mencionara, la difícil identificación de ejemplares de *Bulimulus* en base a la morfología externa únicamente se vio manifiesta sobre todo en ejemplares asociados a *B. bonariensis*, lo cual también manifestó Breure (2016 b). Por su parte, la dificultad asociada a la identificación de especies de este género también la demostró Breure (2016 b), donde muestras reconocidas como *B. sporadicus* provenientes tanto de Paraguay como de Houston y Florida en U.S.A. mostraron ser genéticamente distintas.

En otra especie de *Bulimulus* como *B. guadalupensis* sucede una situación similar, debido a que desde el análisis morfológico no se pudo demostrar la existencia de diferenciación infraespecífica (Breure, 1974). El mismo autor en ulteriores análisis moleculares también manifestó dificultades asociadas a la limitación de la especie desde este ángulo, a lo que se sumó que los datos de localidad fueron poco informativos (Breure, 2016 b), probablemente la escasa información a nivel anatómico no permitió la toma de una decisión sobre su posición taxonómica. En el caso de *B. diaphanus*, Breure (1974) también manifestó diferencias a nivel morfológico externo, reconociendo dos subespecies. Sin embargo, en análisis moleculares (Breure, 2016 b) encontró grupos polifiléticos y la posibilidad de la existencia de especies crípticas. Por lo planteado se considera que en especies de *Bulimulus*, tanto las tratadas en la presente tesis doctoral como las recién mencionadas requieren de un análisis y descripción de caracteres no solo conquiolares, sino también anatómicos y en lo posible moleculares que abarquen el

rango de extensión de cada especie tratada. Lo dicho es imprescindible no solo para una correcta delimitación de las entidades, sino también para facilitar el reconocimiento de individuos que se registran fuera del área de extensión del género.

Teniendo en cuenta que en GenBank hay secuencias pertenecientes a nueve especies que aún no han sido identificadas; considerando la aparición de poblaciones de *Bulimulus* en países donde se registraron recientemente introducciones como se registró hasta el momento en Chile (Castillo com. pers., 2019); India, Tailandia, China, Singapur y norte de Australia (Breure, 2016 a); Caribe y Estados Unidos (Breure, 2016 a; b) en cuyo país se está llevando adelante un seguimiento del avance de las poblaciones mediante la página <https://www.jaxshells.org/gallery5.htm>. La amplificación de genes de especies en las áreas de distribución nativa será de gran utilidad al momento de dar un primer paso en la asignación de dichos ejemplares a determinada especie.

Si bien hay ciertos grupos, como Succineidae y Limacidae, donde sólo mediante análisis de ADN es posible determinar la identidad de las especies (Barrientos, 2003); hay otros, como las tres especies tratadas en la presente tesis, en las que tradicionalmente la delimitación de entidades se fundamentó en la comparación de características conquiolares, que aún hoy sigue siendo una herramienta indispensable. Quedó demostrado, de lo expuesto y de los resultados obtenidos en este capítulo, que para una mejor comprensión de la taxonomía de este grupo y para una delimitación más precisa de las especies es necesario contar con información anatómica y molecular que la respalde.

## PARTE 1. COMPLEMENTO.-

### DIAGNOSIS DE LAS ESPECIES ESTUDIADAS

A continuación se reúnen los caracteres más conspicuos de las especies y morfotipos analizados en el transcurso de la **Parte 1.-** de la presente tesis **Capítulos 1.1.-, 1.2.- y 1.3.-**

#### **1.A. *Bulimulus bonariensis* (Rafinesque, 1833)**

1.A.1. Diagnosis: Se encontraron tres morfologías de conchilla con los siguientes estados de caracteres; espira de mediano a gran desarrollo; último anfracto ocupa ~70% y la abertura ~45-50 % de la longitud total; periostraco brillante beige a marrón con bandas más oscuras o rojizas. La cavidad pericárdica es ~1/3 más extensa que el riñón y dirigida 50% posteriormente. El ventrículo de tamaño ligeramente mayor que la aurícula. Riñón ocupa ~1/5 del área pulmonar. Bulbo bucal con un par de músculos ventrales del bulbo bucal que se originan en la parte anterior cerca de la boca y se dirige en dirección postero-central y se insertan ventral al odontóforo. Ganglios pedales fusionados y a ambos lados fusionados los pleurales, con pequeña escotadura que diferencia el par ganglionar pleural del pedal. Ovotestis constituida por 3-4 lóbulos; conducto de la bursa copulatrix delgado cerca de la bursa y luego se ensancha casi al triple del diámetro.

1.A.2. Distribución: Uruguay y Argentina (Buenos Aires, Chaco, Córdoba, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta, Santiago del Estero, Santa Fe, Tucumán).

Según la morfología del complejo peniano e información genética se identificaron morfotipos:

#### **1.A.1.a. *B. bonariensis* propiamente dicho/ Morfotipo 1**

Diagnosis: Morfología del complejo peniano “A” longitud del flagelo 1/2 del epifalo y más angosto que éste; epifalo de igual longitud al pene y 1/3 del ancho; pene ancho cerca al epifalo y angosto próximo a la vaina del pene, que es 1/2 de la longitud total peniana. Flagelo limitado por musculatura circular, con células glandulares Epifalo con abundante musculatura circular, luz tapizada por epitelio cilíndrico con cilios de corta longitud, con células glandulares subepiteliales. Epitelio del vaso deferente cúbico con

cilios largos. Luz del pene central en la base del complejo peniano y luego pasa a ubicarse lateral, tapizada por epitelio cilíndrico alto. Periféricamente, rodeado de divertículos penianos con luz tapizada de epitelio cilíndrico. Se identificaron 4 haplotipos en el gen COI y 4 para el gen 16 S (MLP-Ma 15166, MLP-Ma 15167, MLP-Ma 15168/b, MLP-Ma 15168/c, MLP-Ma 14629/b, MLP-Ma 15169/e).

Distribución: Buenos Aires

#### **1.A.1.b. Morfotipo 2**

Diagnosis: Morfología del complejo peniano “F” flagelo  $\frac{1}{2}$  del epifalo; epifalo  $\frac{1}{2}$  de la longitud total peniana; pene próximo al epifalo es el doble del ancho, hacia la vaina se adelgaza. 1 haplotipo tanto para el gen COI como 16 S (MLP-Ma 15160/a).

Distribución: Buenos Aires (Chascomús)

#### **1.A.1.c. Morfotipo 3**

Diagnosis: Morfología del complejo peniano “C” flagelo corto  $\frac{1}{8}$  de la longitud del epifalo; epifalo extenso más largo que la longitud total peniana; pene  $\frac{3}{4}$  del largo del epifalo y el ancho es constante a lo largo de toda la longitud peniana. Con 4 haplotipos tanto para el gen COI como 16 S (MLP-Ma 15178/a, MLP-Ma 15183/a, MLP-Ma 15183/b, IBS-Ma 185, IBS-Ma 363, IBS-Ma 393).

Distribución: Chaco, Córdoba y Misiones

#### **1.A.1.d. Morfotipo 4**

Diagnosis: Morfología del complejo peniano “G” longitud del flagelo aproximadamente igual a la del epifalo y  $\frac{1}{2}$  de su ancho; epifalo ligeramente más largo que el pene sin considerar la vaina; pene próximo al epifalo es el doble de ancho que éste y se afina hacia la vaina que es  $\frac{1}{2}$  de la longitud total peniana. Se identificó un haplotipo en el gen 16 S (IBS-Ma 362-1, IBS-Ma 362-2, IBS-Ma 362-3).

Distribución: Corrientes, Misiones y Santa Fe

#### **1.A.1.e. Morfotipo 5**

Diagnosis: Morfología del complejo peniano “B” longitud del flagelo  $\frac{3}{4}$  del epifalo; epifalo  $\frac{1}{2}$  de la longitud total peniana y  $\frac{1}{4}$  del ancho; pene próximo al flagelo

con forma ovalada y esta parte ocupa la mitad de la longitud total peniana, la vaina del pene es  $\frac{1}{2}$  de ancho que la parte antes mencionada. Se identificó un haplotipo en el gen 16 S (MLP-Ma 15188/c).

Distribución: Entre Ríos

#### **1.A.1.f. Morfotipo 6**

Diagnosis: Morfología del complejo peniano “E” flagelo aproximadamente igual de largo que el epifalo; epifalo igual longitud que el pene sin la región de la vaina; el pene en la parte próxima al epifalo es el doble de ancho que éste y en la región de la vaina del pene es ligeramente más ancha. 1 haplotipo para el gen 16 S (MLP-Ma 14544/e).

Distribución: Entre Ríos

#### **1.A.1.g. Morfotipo 7**

Diagnosis: Morfología del complejo peniano “H” longitud del flagelo  $\frac{1}{2}$  del epifalo; epifalo aproximadamente igual de largo que la longitud total peniana; pene es el doble de ancho al epifalo en la región proximal a éste, luego se adelgaza y mantiene el mismo grosor hasta el final de la vaina del pene. 1 haplotipo para el gen 16 S (MLP-Ma 14522/a).

Distribución: Córdoba

#### **1.A.1.h. Morfotipo 8**

Diagnosis: Morfología del complejo peniano “D” longitud del flagelo  $\frac{1}{3}$  del epifalo; epifalo igual longitud que total peniana y  $\frac{1}{2}$  del ancho; pene en su parte próxima al epifalo y hasta la vaina del pene con igual grosor aproximado y en la región de la vaina del pene  $\frac{1}{2}$  de ancho.

Distribución: Córdoba y Corrientes

### **1.B. *Bulimulus rushii* Pilsbry, 1897**

1.B.1. Diagnosis: Conchilla de contorno globoso; espira corta (población de Córdoba) - elongada (población de Buenos Aires); último anfracto ocupa ~50-60% de la longitud total y se encuentra atravesado por una línea espiral más clara; abertura ~45-55 % de la longitud total, mayor longitud del espacio parietal, longitud y ancho de la

abertura en la población de Córdoba; periostraco amarillento a blanquecino. Protoconcha con líneas gruesas a modo de costillas axiales, que discurren en zigzag con distancia entre ellas, ángulos menos agudos y líneas espirales. Glándula digestiva de gran desarrollo ocupa  $\sim 5$  vueltas y  $\frac{1}{4}$ . Pulmón extenso, ocupando la última vuelta y  $\sim \frac{1}{4}$  de la precedente. Cavidad pericárdica dispuesta casi del lado derecho del animal, el diámetro mayor de la misma es  $\sim \frac{1}{3}$  más largo que el riñón, encontrándose la aurícula por delante. El ventrículo casi el doble de tamaño que la aurícula. Calibre de la vena pulmonar de menor grosor en el último tramo  $\sim \frac{1}{7}$ . Vasos pulmonares del lado izquierdo sólo en el último tercio. Con vaso del collar paralelo al borde nuczal y cerca del pneumostoma se bifurca dando un vaso secundario del collar. Mandíbula más abierta con placas más largas que anchas. Bulbo bucal, ventro-lateralmente con dos pares de músculos ventrales del bulbo bucal cada par se origina en la parte anterior del bulbo y luego cada par se divide en dos músculos. Además, con un par de cortos músculos peribucales accesorios que discurren desde la parte ventral del odontóforo. Ganglio pedal único con ganglios pleurales fusionados a ambos lados. Ovotestis conformada por 5 lóbulos muy pequeños; conducto hermafrodita recto y largo. Glándula del albumen sólo dos veces el tamaño del receptáculo seminal; espermioviducto delgado; conducto de la bursa copulatrix delgado. Flagelo de longitud aproximadamente igual al epifalo. El límite superior del epifalo es el punto de separación del músculo retractor del complejo peniano y el límite inferior el lugar de inserción. El ancho no posee una clara diferenciación con el pene. La inserción del músculo retractor del pene posicionado a mitad del complejo. Vaina del pene delgada y poco conspicua. Longitud de la vaina del pene y pene es el doble del epifalo. Vaso deferente con abertura de posición terminal al flagelo. Luz del flagelo tapizada por epitelio cúbico pluriestratificado y vaso deferente con luz tapizada por epitelio cúbico. Flagelo conformado por parénquima compacto sin células musculares. Pene con luz irregular tapizada por el mismo tipo celular al flagelo. Aurícula ubicada por delante del riñón.

1.B.2. Distribución: Uruguay y Argentina (Buenos Aires, Córdoba, Corrientes y Entre Ríos).

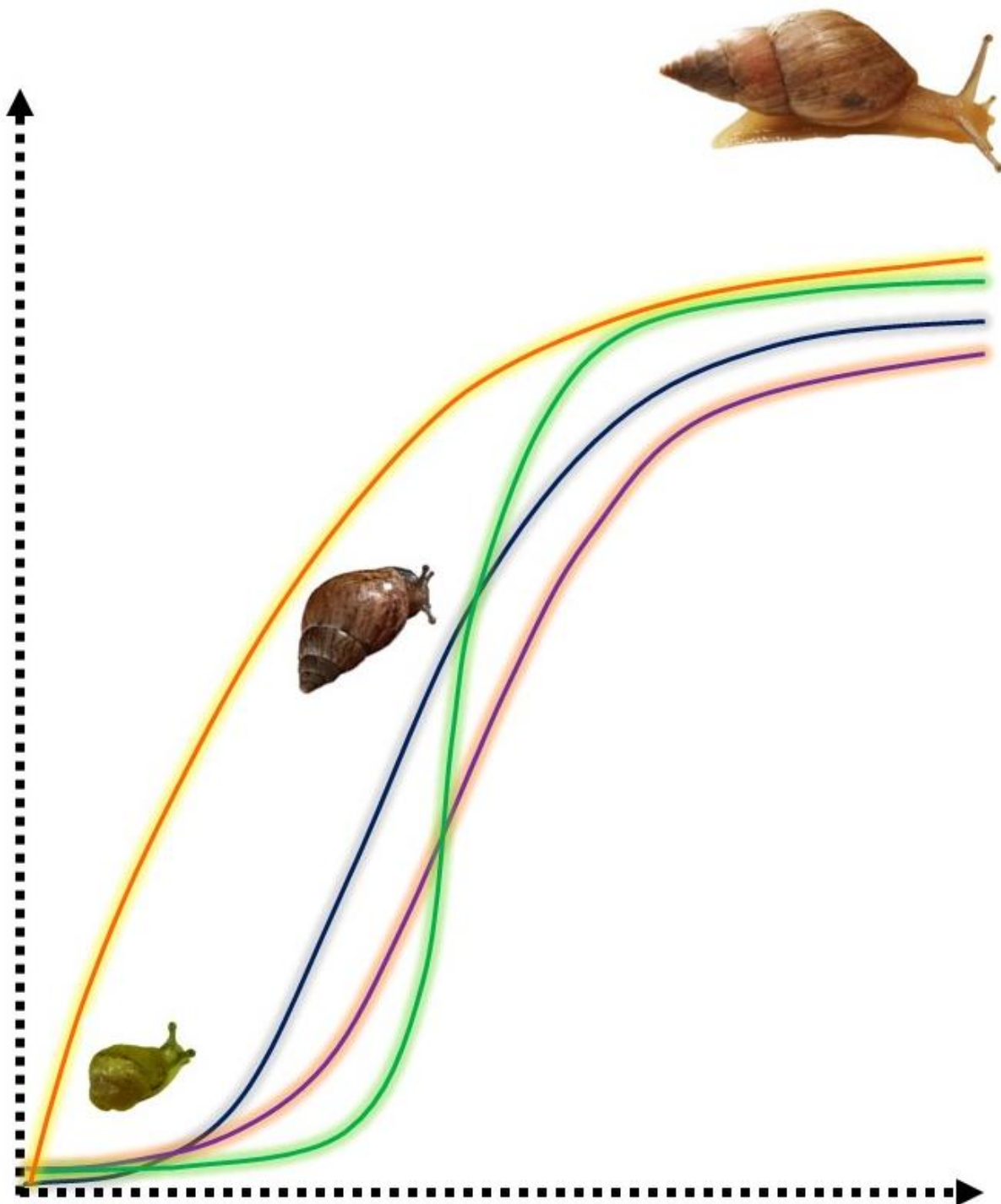
### 1.C. ***Bulimulus vesicalis*** (Pfeiffer, 1853)

1.C.1. Diagnosis: Espira de mediano desarrollo ocupando menos de  $\frac{1}{3}$  de la longitud total; anfractos planos a ligeramente convexos, el último ocupa más del 60% y la abertura 50% de la longitud total de la conchilla. Cavidad pericárdica con diámetro mayor aproximadamente igual al riñón, diámetro menor  $\sim \frac{1}{2}$  más grande. Aurícula de mayor tamaño respecto del ventrículo, vena pulmonar de mayor calibre cerca a la

aurícula y se adelgaza gradualmente en dirección al pneumostoma. El riñón con forma de triángulo isósceles ocupa  $\sim 1/4$  del área pulmonar. Bulbo bucal redondeado. Par de músculos ventrales del bulbo bucal, se disponen desde el tegumento próximo al borde externo de la mandíbula y cada uno de ellos se dirige hacia la región ventrolateral. Sistema nervioso central con mayor longitud de conectivos cerebro- pleural. Conducto de la bursa copulatrix delgado en el tramo cercano a la bursa, luego se ensancha al doble de su diámetro. Flagelo  $1/3$  del epifalo. Epifalo tres veces la longitud del pene; pene de contorno ovalado. En esta especie el flagelo con luz tapizada por epitelio cilíndrico alto bien muscular desprovista de células glandulares. Epifalo con luz tapizada por epitelio cilíndrico con cilios cortos y abundantes células glandulares, externamente limitado por musculatura circular. Vaso deferente tapizado por epitelio cúbico con largos cilios. A la altura del pene luz tapizada por epitelio cúbico. Divertículos penianos con luz tapizada por epitelio cilíndrico alto. Pene de luz replegada y con epitelio cilíndrico alto; vaso deferente con epitelio cúbico provisto de largos cilios. Se identificó 1 haplotipo para el gen 16 S (MLP-Ma 15157/a).

1.C.2. Distribución: Brasil, Uruguay y Argentina (Buenos Aires, Entre Ríos y Santa Fe).

**PARTE 2.-**  
**ESTUDIOS POBLACIONALES EN**  
***Bulimulus bonariensis***  
**CAPÍTULO 2.1.-**  
**CRECIMIENTO EN BIOMASA**



### 2.1.A. INTRODUCCIÓN

Las poblaciones bióticas conforman la unidad básica en la estructura trófica del ecosistema. El aumento y la reducción del tamaño poblacional son los parámetros básicos más importantes que se encuentran determinados por procesos de reclutamiento, crecimiento individual y mortalidad (Brey, 1999).

El crecimiento individual se define como el incremento de la masa corporal (biomasa) de un organismo con respecto al tiempo. Es un patrón individual determinado por factores genéticos y ambientales, similar entre individuos de una misma población en un determinado lugar (Brey, 2001). Teniendo en cuenta la biología de la especie estudiada, el crecimiento en gasterópodos puede ser cuantificado de diversas maneras, por ejemplo en peso como lo realizado por García et al. (2006) en *Cornu aspersum*. Siendo la forma más habitual de medición del crecimiento en babosas por ejemplo *Deroceras reticulatum* y *D. laeve* (Clemente et al., 2007). También puede realizarse por medición de sus partes duras, como el grosor del labio en *Megalobulimus paranaguensis* (Fontenelle y Miranda, 2012), el diámetro de la conchilla en *Powelliphanta augusta* (James et al., 2013), o midiendo el largo total de la misma como en *Bulimulus tenuissimus* (Silva et al., 2008; 2009; 2013) y *Leptinaria unilamellata* (Carvalho et al., 2009), o utilizando ambas variables como se ha utilizado en *Megalobulimus maximus* (Rengifo Vásquez et al., 2004). También, por análisis de marcas de crecimiento internas en la conchilla de algunos caracoles marinos como en el caso de *Odontocymbiola magellanica* (Bigatti et al., 2007). Otras estructuras utilizadas son el diámetro del estatolito larval (Richardson et al., 2005). Incluso, se ha puesto a prueba el uso de conteo y mediciones de las estrías presentes en el opérculo por ejemplo de *Buccinanops cochlidium* (Averbuj et al., 2015).

Partiendo de la base de estudios del crecimiento individual, durante el transcurso de un tiempo, se puede ajustar la información obtenida a modelos teóricos de crecimiento. Dentro de los modelos más utilizados se encuentran el logístico (García et al., 2006; Clemente et al., 2007; Nicolai et al., 2010), logístico inverso (Haddon et al., 2008), Gompertz (Bigatti et al., 2007; Gaitán-Espitia y Nespolo, 2014) y von Bertalanffy (Staikou, 1998; Richardson et al., 2005; Fontenelle y Miranda, 2012; Carvalho da Silva y Omena, 2014; Benbellil-Tafoughalt y Koene, 2015; entre otros), siendo éste último el modelo más aplicado en el estudio del crecimiento en gasterópodos. También, para evaluar el grado de ajuste de los modelos se han realizado análisis de manera combinada (Helidoniotis et al., 2011; James et al., 2013; Averbuj et al., 2015).

Analizar características poblacionales tales como el patrón de crecimiento, la determinación de la edad de maduración, época reproductiva, longevidad, mortalidad, entre otros, es de suma importancia debido a que determina la dinámica de una población y ésta última, de alguna manera, modelará su evolución (Stearns, 2000). Por otro lado, estudiar las características del ciclo vital de las poblaciones y el determinar sus estrategias de vida son de gran utilidad al momento de comparar aspectos de la biología reproductiva, realizar análisis taxonómicos, filogenéticos, comportamentales, ecológicos y de protección de las especies y comunidades (Carvalho et al., 2008).

El objetivo de este capítulo del trabajo de tesis doctoral es realizar el seguimiento de una población de *B. bonariensis* nacida bajo condiciones de laboratorio, analizar el patrón de crecimiento y evaluar el modelo de mejor ajuste. Al mismo tiempo, explorar aspectos poblacionales básicos como la supervivencia, mortalidad y realizar una estimación de la edad y talla de la primera reproducción.

## 2.1.B. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1.B.1. Colecta

Durante la realización de relevamientos prospectivos se colectaron, mediante extracción manual, 10 individuos adultos de *B. bonariensis* en un campo privado del área rural de Villa San Luis (34°50'58,2'' S 58°15'38'' O), partido de Florencio Varela, provincia de Buenos Aires.

### 2.1.B.2. Mantenimiento de los individuos en el laboratorio

Los ejemplares se transportaron al laboratorio SERByDE -Unidad de Servicios en Bioensayos y Diagnósticos Ecotoxicológicos- (División Zoología Invertebrados, Museo de La Plata, UNLP). Se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio (75-85% humedad, 23-25°C y fotoperiodo programado en 12 horas de luz artificial y 12 horas de oscuridad), en un terrario de vidrio (15 x 15 x 10cm), debidamente acondicionado recreando su hábitat natural, con carpeta de hojas secas y vegetación. El sustrato de tierra previamente fue esterilizado a 120°C durante 1 hora siguiendo a Silva et al. (2009).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Meireles et al. (2008), la población inicial y sus descendientes se alimentaron *ad libitum* con una dieta mixta. Se les suministró lechuga (*Lactuca sativa* Linné, 1758) y alimento balanceado elaborado específicamente para gasterópodos terrestres, siguiendo la composición nutricional sugerida por Barbado (2003): harina de maíz 26,5 %, harina de trigo 26 %, harina de soja 15 %, carbonato de calcio 15 %, harina de hueso 15 %, sal 10,5 %, vitaminas y minerales 2%.

Los individuos adultos fueron revisados diariamente y a medida que se observaron puestas, éstas fueron separadas del progenitor para ser mantenidas en terrarios más pequeños (10 x 10 x 7 cm). Al eclosionar los juveniles se los midió y se mantuvieron bajo las condiciones descriptas anteriormente.

### 2.1.B.3. Parámetros biológicos de las puestas

Se realizó un seguimiento de las puestas con el fin de explorar algunas características de las mismas. Siguiendo a Daguzan et al. (1981) se tomaron los siguientes parámetros:

- Coeficiente de fecundidad: número de huevos por puesta.

- Coeficiente de eclosión: número de juveniles que nacen.
- Tasa de natalidad: número de juveniles que nacen/número de huevos en la puesta y multiplicado por 100.
- Tasa de mortalidad embrionaria: número de embriones abortados/ número de huevos en la puesta y multiplicado por 100.
- Duración de la incubación: tiempo en días hasta su eclosión.

#### **2.1.B.4. Modelos de crecimiento**

El parámetro biométrico utilizado para el presente estudio fue la longitud total de la conchilla de cada animal, la cual se midió desde el día de nacimiento de los juveniles (día cero) y cada 9 días durante el primer mes de vida. Luego, las mediciones se realizaron quincenalmente (Meireles et. al., 2008) bajo microscopio estereoscópico, Leica modelo EZ4, con ocular micrométrico hasta un tamaño de 6 mm y los individuos mayores a esta talla con calibre tipo Vernier milimétrico (precisión de 0,01 mm). El crecimiento fue estudiado hasta que pereció el último individuo.

Posteriormente, los datos de longitud modal ( $L_m$ ) calculados en el transcurso del tiempo mostraron un patrón de crecimiento que fue evaluado bajo distintos modelos, con el fin de determinar cuál de ellos explica de una manera más precisa el crecimiento individual de esta población.

##### **2.1.B.4.a. Modelo de von Bertalanffy**

El modelo de von Bertalanffy (1938) fue el primero puesto a prueba debido al gran número de especies de gasterópodos, muchos de ellos terrestres, que han evidenciado un patrón de crecimiento con un alto grado de ajuste a este modelo y que se encuentra descrito por la siguiente fórmula:

$$L_t = L_{\max} (1 - e^{-k(t-t_0)})$$

##### **2.1.B.4.b. Modelo Logístico**

El patrón de crecimiento observado también se ajustó a este modelo (Brody, 1945), siendo la ecuación:

$$L_t = L_{\max} / (1 + e^{(b-k*t)})$$

### 2.1.B.4.c. Modelo de Gompertz

Por último se evaluó el grado de ajuste al modelo de Gompertz (1825) que se encuentra definido por la siguiente ecuación:

$$L_t = L_{\max} * e^{-e^{-k(t-t_0)}}$$

Los parámetros de los modelos evaluados se describen como:  $L_t$ = longitud modal al tiempo  $t$  (mm);  $L_{\max}$ = longitud máxima asintótica (mm) o longitud máxima esperada;  $e$ = base del logaritmo natural;  $b$ = fase con valores más pequeños antes de iniciar la pendiente;  $k$ = constante de crecimiento;  $t$ = tiempo;  $t_0$ = tiempo hipotético donde la longitud es igual a “cero”.

En el modelo de von Bertalanffy el parámetro longitud máxima asintótica se obtuvo aplicando el método de Walford (1946), el cual consiste en graficar  $L_{t+1}$  en función de  $L$  para el tiempo  $t$  y calcular el valor de la ordenada en el cual intersectan la recta y la bisectriz. Para obtener la constante  $k$  se realizó la transformación lineal de la ecuación logarítmica. Se calculó la regresión entre  $\ln(1 - (L_t / L_{\max} - 1))$  (variable dependiente) y  $t$  (variable independiente), donde  $k t_0$ = es la ordenada al origen ( $a$ ) y  $(b) = (-k)$  la pendiente. Para luego hallar  $L_t$  que es la longitud al tiempo  $t$ .

Para el cálculo de los parámetros de los modelos Logístico y de Gompertz, se partió de los estimados para el modelo de von Bertalanffy descritos anteriormente. En el programa SPSS Statistics se introdujeron como valores iniciales y éste mediante un proceso iterativo proporcionó los parámetros que fueron estimados mediante el uso del algoritmo de Levenberg-Marquadt.

Las curvas teóricas fueron contrastadas con los valores observados. Con el fin de verificar el grado de ajuste de las curvas de crecimiento a los modelos, se utilizó el programa SPSS Statistics con el cual se aplicaron test no paramétricos ( $\chi^2$  y prueba de Wilcoxon), donde los grados de libertad corresponden al número de  $L_m - 1$ . Además, se calculó la pendiente de la recta entre los valores observados y esperados ( $b$ ), los coeficientes de correlación ( $r$ ) y de determinación ( $r^2$ ) por medio de un análisis de regresión lineal.

Sumado a que la elección del modelo, con mejor ajuste al patrón de crecimiento observado, se basó en dos criterios estadísticos adicionales. Por un lado, se identificó el modelo con el valor mínimo negativo de log-Likelihood (LL), donde la función se asocia a incrementos de longitud total de la conchilla y como segundo criterio estadístico se obtuvo y comparó los valores del Criterio de Información de Akaike (CIA), donde el

menor valor indica un ajuste más adecuado y parsimonioso al modelo ajustado (Averbuj et al., 2015; Haddon et al., 2008; Helidoniotis et al., 2011)

Con el objetivo de definir cuál de los modelos explica de una manera más precisa el crecimiento individual de *B. bonariensis* se realizó en primera instancia un análisis integrado de los individuos de todas las puestas tomando al conjunto de puestas como una cohorte. También se realizó un análisis de cada grupo de individuos, pertenecientes cada uno a una determinada puesta de manera individual, para verificar que el modelo que mejor explica el patrón observado es el mismo, en las condiciones de laboratorio dadas. Posteriormente, para verificar si hubo diferencias significativas entre los modelos, aplicados en los grupos/puestas, se realizó un ANOVA de una vía sobre los parámetros longitud máxima asintótica y constante de crecimiento.

Para finalizar, se realizó una comparación del rendimiento en el crecimiento con tres especies exóticas presentes en el país: *Lissachatina fulica*, *Cornu aspersum* y *Rumina decollata*, para lo cual se aplicó el índice Phi de Munro, donde  $\Phi = \text{Log}(k) + 2\text{Log}(l_{\text{max}})$  (Pauly y Munro, 1984).

#### 2.1.B.5. Tabla de vida

Se implementó una tabla de vida horizontal de los caracoles nacidos en el laboratorio (Rabinovich, 1980; Smith y Smith, 2007), se consideró como día cero el día en el cual los huevos eclosionaron y se agrupó el número de sobrevivientes en clases de edad; cada 9 días durante el primer mes y luego en clases de edad de 14 días. De este modo se obtuvieron valores de supervivencia, supervivencia promedio en intervalos de edad, mortalidad, tasa de mortalidad, expectativa o esperanza de vida.

Donde:

- $x$  = edad en días.
- $n_{(x)}$  = número de individuos vivos a la edad especificada.
- $l_{(x)} = (n_x/n_0)$  cantidad de individuos que sobreviven a la edad ( $x$ ) en función al tamaño inicial de la población. Representa la probabilidad que tiene el individuo al nacer de sobrevivir hasta la edad ( $x$ ).
- $d_{(x)} = (n_{(x+1)} - n_{(x)})$  corresponde a la mortalidad. Es la diferencia entre la cantidad de individuos vivos para una edad ( $x$ ) y la siguiente edad ( $x+1$ ).
- $q_{(x)} = (d_{(x)}/n_{(x)})$  es la tasa de mortalidad específica de la edad ( $x$ ). Corresponde a la probabilidad de morir entre las edades ( $x-1$ ) y ( $x$ )

- $L_{(x)} = (n_{(x)} + n_{(x+1)})/2$  cantidad media de individuos vivos durante el intervalo de edad (x) hasta (x+1).
- $T_{(x)} = \sum_x L_{(x)}$  corresponde al total de días que le quedan por vivir o expectativa de vida de los sobrevivientes que han alcanzado la edad (x).
- $e_{(x)} = T_{(x)}/n_{(x)}$  es la esperanza de vida o la cantidad promedio de tiempo que le queda por vivir a los individuos que sobreviven a una edad determinada.

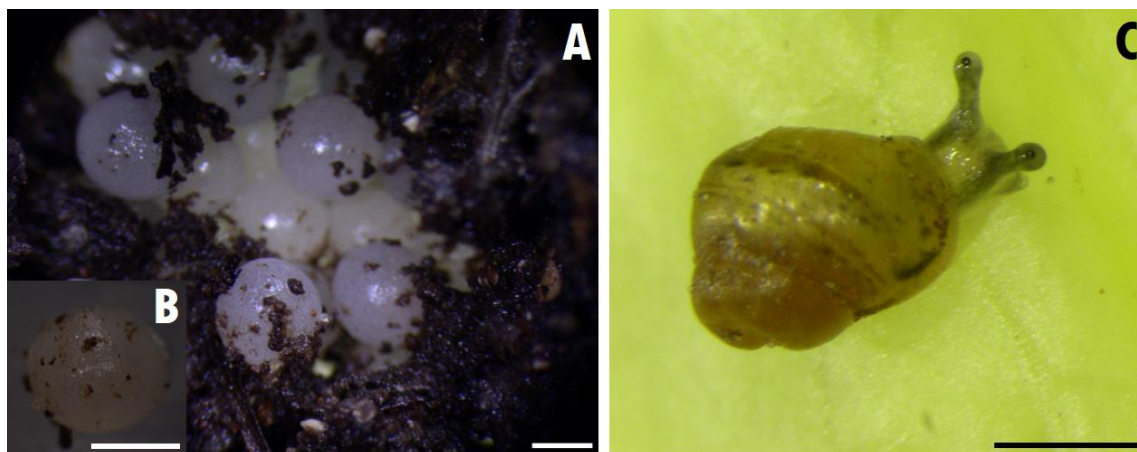
## 2.1.C. RESULTADOS

### 2.1.C.1. Parámetros biológicos de las puestas

Al inicio de la experiencia en el laboratorio los ejemplares adultos, traídos del campo, realizaron un total de 7 oviposiciones que contaron con 125 individuos recién nacidos en total (**Fig. 2.1.1 C**). Las puestas (**Fig. 2.1.1 A**) estaban compuestas por un promedio de 44 huevos (DE = 12,6), donde el número mínimo de huevos fue de 21 y el máximo de 59. Los huevos de aspecto esférico, gelatinosos, con cristales de carbonato de calcio y de color blanquecino tuvieron un diámetro promedio de aproximadamente 1,7 mm (**Fig. 2.1.1 A-B**), unos días previos a la eclosión los huevos se tornaron de un color amarronado evidenciando la conchilla embrionaria. El tiempo de desarrollo hasta su eclosión fue entre 10 - 17 días, siendo en promedio 13,7 días (DE = 2,3 días). La tasa de natalidad, proporción de juveniles que eclosionaron, fue del 41,82 % en promedio (DE = 15,44 %) (**Tabla 2.1.1**).

#### Figura 2.1.1

*Puesta y juvenil de Bulimulus bonariensis*



A- Se observa una de las puestas estudiadas. B- Detalle del huevo. C- Juvenil recién eclosionado. Escala A-C= 1 mm.

**Tabla 2.1.1**

*Parámetros biológicos de las puestas de Bulimulus bonariensis*

Puesta	Coefficiente de fecundidad	Coefficiente de eclosión	Tasa de natalidad	Tasa de mortalidad	Duración de la incubación (días)
1	32	17	53,13	46,87	12
2	44	20	45,45	54,55	10
3	50	28	56	44	14
4	48	29	60,42	39,58	12
5	21	8	38,1	61,9	15
6	57	11	19,3	80,7	17
7	59	12	20,34	79,66	16

### 2.1.C.2. Modelos de crecimiento

El crecimiento fue estudiado durante 23 meses, hasta que pereció el último individuo. Luego de realizado el seguimiento, el análisis de crecimiento se aplicó sólo a los caracoles correspondientes a las primeras 5 oviposiciones o puestas, las dos subsiguientes perecieron muy tempranamente por esta razón no fueron incluidas en el análisis.

#### 2.1.C.2.a. Análisis de crecimiento considerando a todos los individuos como una cohorte

Debido a que las cinco puestas eclosionaron con pocos días de diferencia (cada 8-9 días) y que esto sucedió en el transcurso de un mes, se consideró a todos los ejemplares en conjunto como una cohorte y se llevó el inicio de los 5 grupos a tiempo cero. De esta manera, se agruparon los datos de longitud total de la conchilla y se calcularon las longitudes modales con el fin de poner a prueba el grado de ajuste a los distintos modelos.

#### Modelo de von Bertalanffy

Mediante el método de Walford se calculó la longitud máxima asintótica (**Fig. 2.1.2**) la cual fue de 26,849 mm, mientras que la máxima observada fue de 20,73 mm.

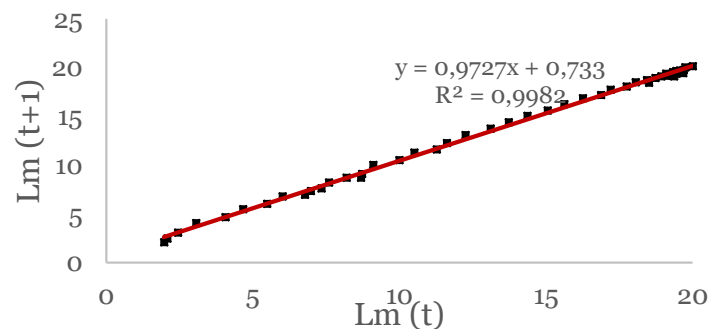
La curva de crecimiento unificada mostró un buen ajuste al modelo de von Bertalanffy (**Fig. 2.1.3**) que con 50 g.l. y  $p=0,05$  tuvo un  $\chi^2= 3,6$ . Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las longitudes modales observadas y las teóricas de acuerdo a la prueba de Wilcoxon con un valor de  $Z=-0,703$  y  $p=0,482$ . La pendiente de la recta entre los valores observados y esperados (b), el coeficiente de

correlación ( $r$ ) y el de determinación ( $r^2$ ) junto a los valores de ambos criterios de información log-likelihood (LL) y Criterio de Información de Akaike (CIA) son dados de manera comparada con los otros modelos en la **Tabla 2.1.2**. La ecuación de crecimiento para este modelo quedó reflejada por la siguiente ecuación:

$$L_t = 26,849(1 - e^{-0,784(t-0,749)})$$

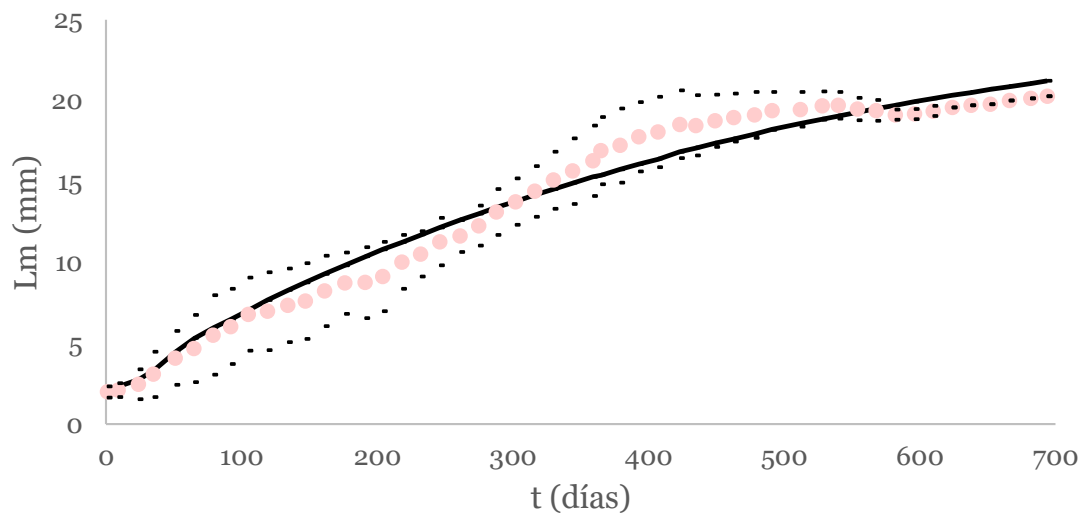
**Figura 2.1.2**

*Método gráfico de Walford*



**Figura 2.1.3**

*Curva de crecimiento ajustada al modelo de von Bertalanffy*



La línea punteada (rosa) corresponde los valores de longitud modal ( $L_m$ ) con su correspondiente  $\pm$  desvío estándar (puntos negros) y la línea continua (negro) corresponde a la curva estimada para este modelo.

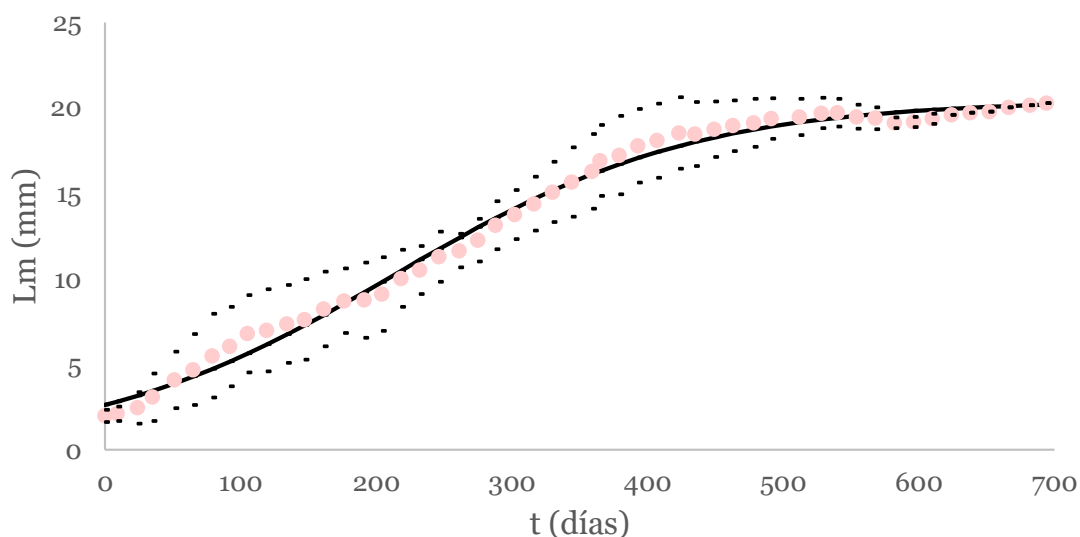
### Modelo Logístico

El grado de ajuste del patrón de crecimiento observado a este modelo fue muy bueno (**Fig. 2.1.4**) para 50 g.l. y  $p=0,05$  tuvo un  $\chi^2=1,83$ . No se encontraron diferencias significativas entre las longitudes modales observadas y las teóricas de acuerdo a la prueba de Wilcoxon con un valor de  $Z=-0,037$  y  $p=0,97$ . La pendiente de la recta entre los valores observados y esperados (b), el coeficiente de correlación (r) y el de determinación ( $r^2$ ) junto a los valores de ambos criterios de información log-likelihood (LL) y Criterio de Información de Akaike (CIA) son dados de manera comparada con los otros modelos en la **Tabla 2.1.2**. La ecuación de crecimiento con los parámetros estimados para este modelo es:

$$L_t = 20,439 / (1 + e^{(1,915 - 0,009 * t)})$$

#### Figura 2.1.4

*Curva de crecimiento ajustada al modelo logístico*



La línea punteada (rosa) corresponde los valores de longitud modal (Lm) con su correspondiente  $\pm$  desvío estándar (puntos negros) y la línea continua (negro) corresponde a la curva estimada para este modelo.

### Modelo de Gompertz

El patrón de crecimiento observado también tuvo un buen ajuste a este modelo (**Fig. 2.1.5**) para 50 g.l. y  $p=0,05$  tuvo un  $\chi^2=1,78$ . No se encontraron diferencias significativas entre las longitudes modales observadas y las teóricas de acuerdo a la prueba de Wilcoxon con un valor de  $Z=-0,309$  y  $p=0,757$ . La pendiente de la recta entre

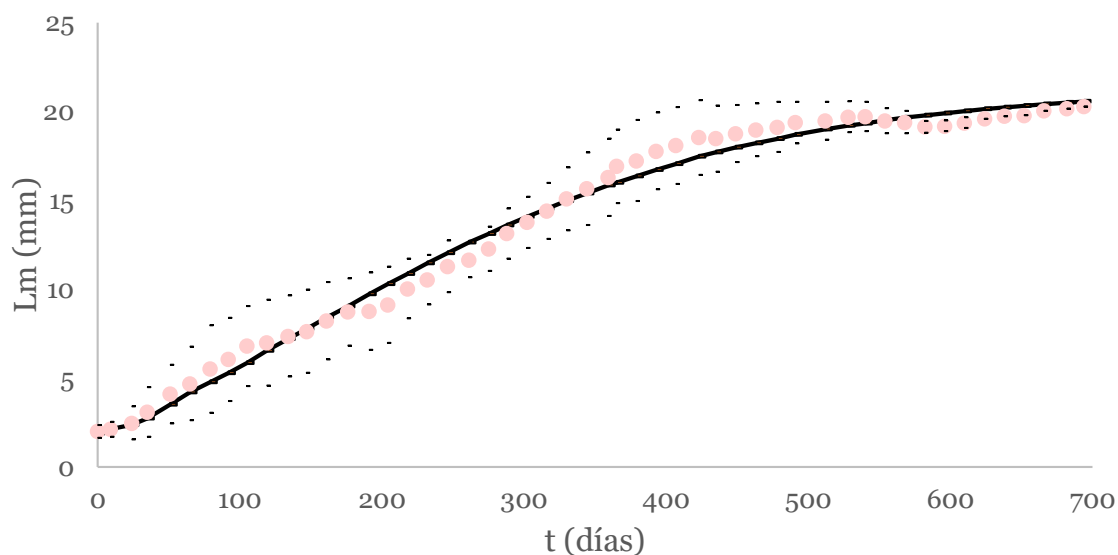
los valores observados y esperados (b), el coeficiente de correlación (r) y el de determinación ( $r^2$ ) junto a los valores de ambos criterios de información log-likelihood (LL) y Criterio de Información de Akaike (CIA) son dados de manera comparada con los otros modelos en la **Tabla 2.1.2**.

La ecuación de crecimiento con los parámetros estimados para este modelo es:

$$L_t = 21,462 * e^{-e^{-2,673(t-2,121)}}$$

**Figura 2.1.5**

*Curva de crecimiento ajustada al modelo de Gompertz*



La línea punteada (rosa) corresponde los valores de longitud modal (Lm) con su correspondiente  $\pm$ desvío estándar (puntos negros) y la línea continua (negro) corresponde a la curva estimada para este modelo.

**Tabla 2.1.2**

*Estadísticos y criterios de información para los modelos de crecimiento aplicados en la cohorte de Bulimulus bonariensis estudiada*

Modelo	b	r	$r^2$	LL	CIA
<b>von Bertalanffy</b>	0,932	0,988	0,976	-205,2	418,8
<b>Logístico</b>	0,992	0,996	0,993	-193,4	395,1
<b>Gompertz</b>	0,989	0,994	0,989	-199,5	407,3

Los tres modelos elegidos pudieron ser ajustados al patrón de crecimiento de los cinco grupos de individuos tratados en conjunto. Se observó que el de mejor ajuste a la cohorte estudiada es el modelo de crecimiento logístico.

En la búsqueda de definir qué modelo explica mejor el patrón de crecimiento y a modo de optimizar la elección del mismo, se realizó un análisis de cada grupo de individuos de forma separada

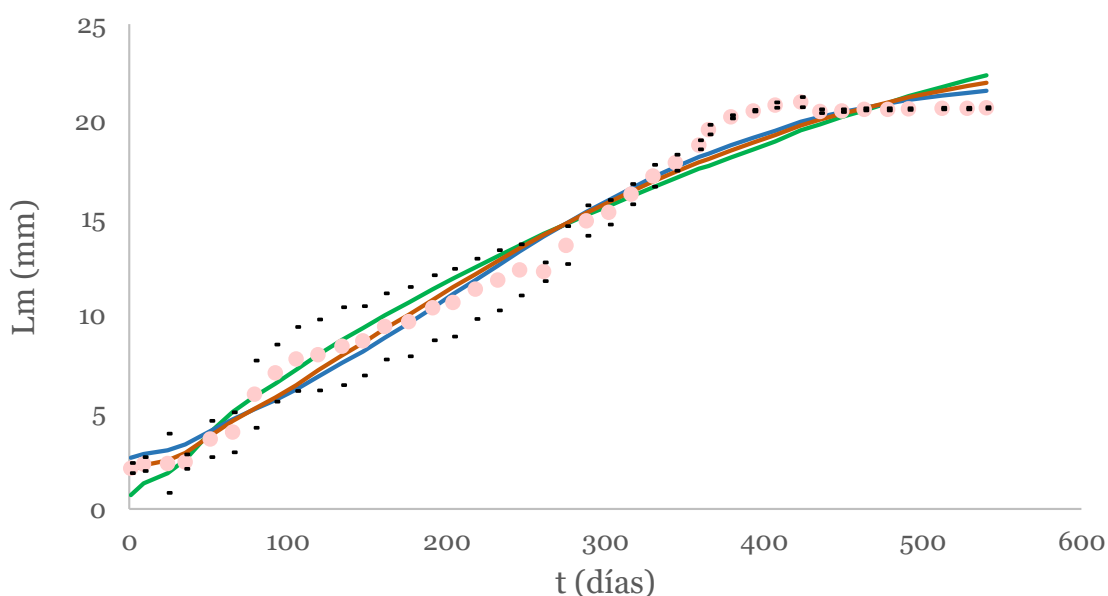
### 2.1.C.2.b. Análisis de crecimiento en los grupos individuales

#### Puesta/Grupo 1

De esta puesta nacieron 17 individuos, que tuvieron una longitud promedio inicial de 2,31 mm y llegaron a vivir un año y medio con una longitud modal máxima alcanzada de 20,68 mm. El patrón de crecimiento (**Fig. 2.1.6**) mostró buen ajuste a los tres modelos (39 g.l. y  $p=0,05$ ) para los cuales se calcularon los siguientes  $\chi^2$ : 6,34 (von Bertalanffy); 3,06 (Logístico); 2,53 (Gompertz). Tampoco se encontraron diferencias significativas de acuerdo a las pruebas de Wilcoxon  $Z=-0,43$ ,  $p=0,667$  (von Bertalanffy);  $Z=0$ ,  $p=1$  (Logístico);  $Z=-0,094$ ,  $p=0,925$  (Gompertz). En la **Tabla 2.1.3** se presentan la pendiente de la recta (b), coeficientes de correlación (r), de determinación ( $r^2$ ) y los valores de ambos criterios de información (LL) y (CIA) junto a la correspondiente fórmula del modelo.

#### Figura 2.1.6

*Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 1*



La línea punteada (rosa) corresponde a los valores de longitud modal (Lm) observados en el Grupo 1 con su correspondiente  $\pm$ desvío estándar (puntos negros). Las líneas continuas corresponden a las curvas estimadas para los modelos: von Bertalanffy (verde), Logístico (azul) y Gompertz (rojo).

**Tabla 2.1.3**

*Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 1*

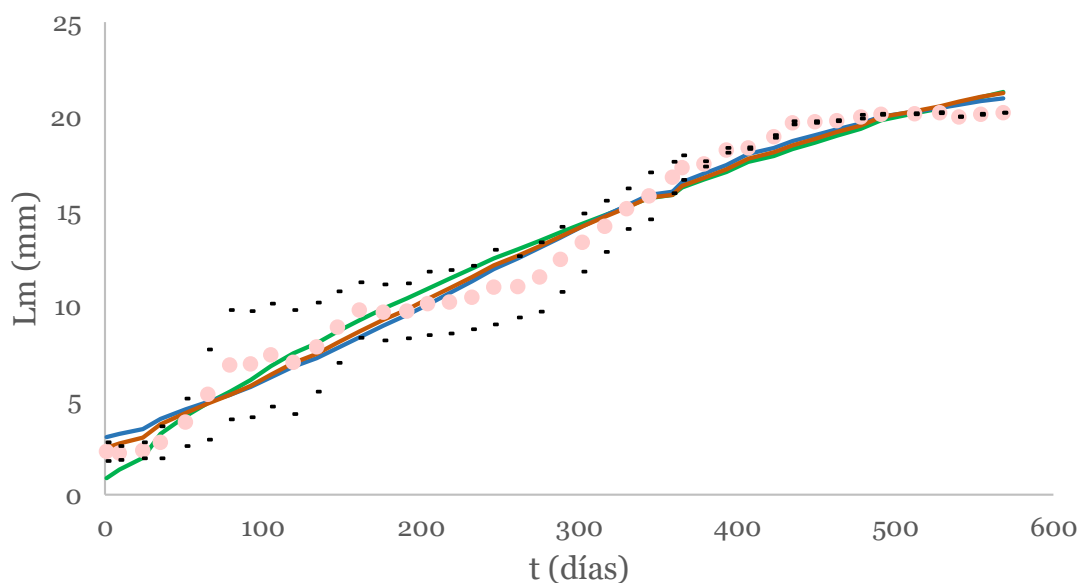
Modelo	b	r	r <sup>2</sup>	LL	CIA	Ecuación
von Bertalanffy	0,973	0,986	0,973	-169,2	347	$Lt=32,664(1-e^{-0,762(t-0,81)})$
Logístico	0,980	0,99	0,983	-164,1	336,7	$Lt=22,41/1+e^{(4,992-3,537*t)}$
Gompertz	0,984	0,99	0,981	-168,7	345,9	$Lt=24,472*e^{-2,708(t-2,123)}$

### Puesta/Grupo 2

En este caso los ejemplares recién nacidos (20) tuvieron una longitud modal de 2,28 mm y se los midió hasta los 20,2 mm al año y medio de vida (**Fig. 2.1.7**). El ajuste a los modelos también fue muy bueno (41 g.l. y  $p=0,05$ ) los  $\chi^2$  calculados fueron de: 5,63 (von Bertalanffy); 3,89 (Logístico); 3,15 (Gompertz). De acuerdo a las pruebas de Wilcoxon tampoco hubo diferencias significativas con  $Z=-0,056$ ,  $p=0,955$  (von Bertalanffy);  $Z=-0,131$ ,  $p=0,896$  (Logístico);  $Z=-0,006$ ,  $p=0,995$  (Gompertz). En la **Tabla 2.1.4** se presentan b, r, r<sup>2</sup> y los valores de ambos criterios de información (LL) y (CIA) junto a la correspondiente fórmula del modelo.

**Figura 2.1.7**

*Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 2*



La línea punteada (rosa) corresponde a los valores de longitud modal (Lm) observados en el Grupo 2 con su correspondiente  $\pm$ desvío estándar (puntos negros). Las líneas continuas corresponden a las curvas estimadas para los modelos: von Bertalanffy (verde), Logístico (azul) y Gompertz (rojo).

**Tabla 2.1.4**

*Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 2*

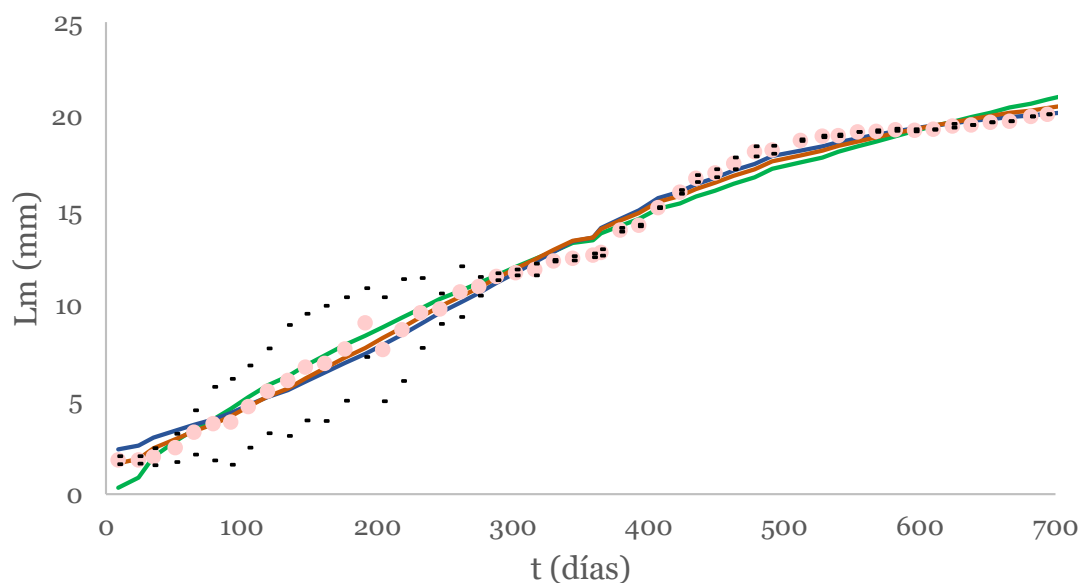
Modelo	b	r	r <sup>2</sup>	LL	CIA	Ecuación
von Bertalanffy	0,989	0,987	0,975	-178,4	365,2	$Lt=32,35(1-e^{-0,665(t-0,82)})$
Logístico	0,977	0,99	0,98	-173,8	356,1	$Lt=22,475/1+e^{(4,318-2,851*t)}$
Gompertz	0,98	0,99	0,98	-176,5	361,4	$Lt=25,207*e^{-2,275(t-1,66)}$

### Puesta/Grupo 3

En este caso, la puesta contó con 28 individuos que midieron en promedio 1,8 mm al nacer y que llegaron a medir 20,24 mm de longitud modal de la conchilla casi a los dos años de vida (**Fig. 2.1.8**). El ajuste (50 g.l. y  $p=0,05$ ) fue muy bueno con los siguientes  $\chi^2$ : 9,11 (von Bertalanffy); 2,2 (Logístico); 1,25 (Gompertz). De acuerdo a las pruebas de Wilcoxon no hubo diferencias significativas con  $Z=-0,572$ ,  $p=0,567$  (von Bertalanffy);  $Z=-0,178$ ,  $p=0,859$  (Logístico);  $Z=0$ ,  $p=1$  (Gompertz). En la **Tabla 2.1.5** se presentan b, r, r<sup>2</sup> y los valores de ambos criterios de información (LL) y (CIA) junto a la correspondiente fórmula del modelo.

**Figura 2.1.8**

*Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 3*



La línea punteada (rosa) corresponde a los valores de longitud modal (Lm) observados en el Grupo 3 con su correspondiente  $\pm$ desvío estándar (puntos negros). Las líneas continuas corresponden a las curvas estimadas para los modelos: von Bertalanffy (verde), Logístico (azul) y Gompertz (rojo).

**Tabla 2.1.5**

*Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 3*

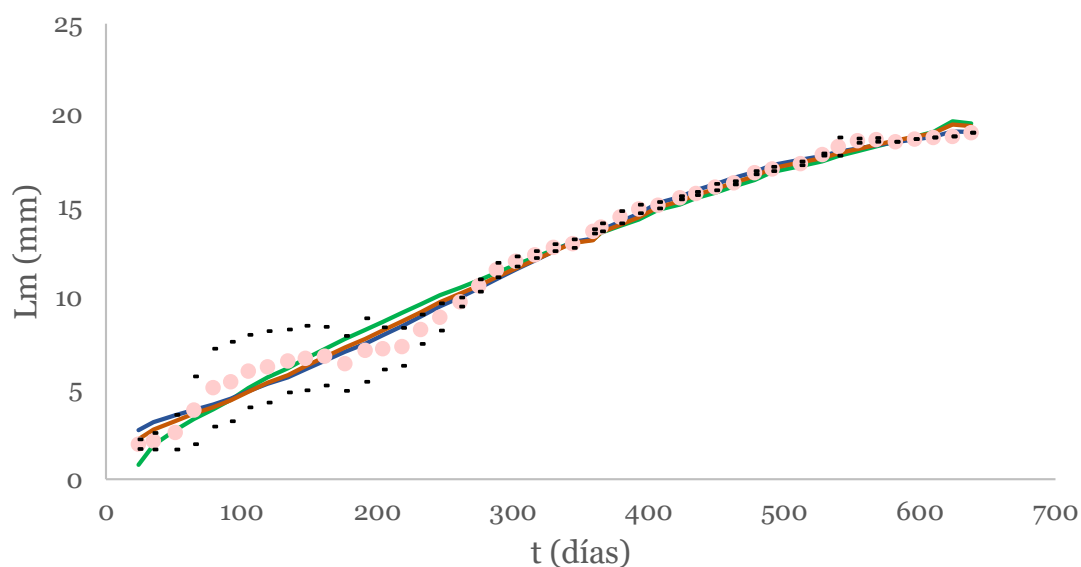
Modelo	b	r	r <sup>2</sup>	LL	CIA	Ecuación
von Bertalanffy	0,982	0,994	0,987	-214,1	436,5	$Lt=31,065(1-e^{-0,586(t-0,86)})$
Logístico	0,984	0,996	0,992	-204,5	417,3	$Lt=20,919/1+e^{(4,554-2,817*t)}$
Gompertz	0,992	0,996	0,993	-209,3	426,9	$Lt=26,261*e^{-2,499(t-1,73)}$

### **Puesta/Grupo 4**

Contó inicialmente con 29 ejemplares neonatos que midieron 1,88 mm de longitud modal. Se midieron hasta que el último ejemplar midió 19 mm, luego de un poco más de año y medio de vida (**Fig. 2.1.9**). El grado de ajuste a los modelos (44 g.l. y  $p=0,05$ ) contaron con los  $\chi^2$  siguientes: 4,27 (von Bertalanffy); 2,38 (Logístico); 2,23 (Gompertz). De acuerdo a las pruebas de Wilcoxon tampoco hubo diferencias significativas con  $Z=-0,926$ ,  $p=0,355$  (von Bertalanffy);  $Z=-0,006$ ,  $p=0,995$  (Logístico);  $Z=-0,497$ ,  $p=0,619$  (Gompertz). En la **Tabla 2.1.6** se presentan b, r, r<sup>2</sup> y los valores de ambos criterios de información (LL) y (CIA) junto a la correspondiente fórmula del modelo.

**Figura 2.1.9**

*Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 4*



La línea punteada (rosa) corresponde a los valores de longitud modal (Lm) observados en el Grupo 4 con su correspondiente  $\pm$ desvío estándar (puntos negros). Las líneas continuas corresponden a las curvas estimadas para los modelos: von Bertalanffy (verde), Logístico (azul) y Gompertz (rojo).

**Tabla 2.1.6**

*Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 4*

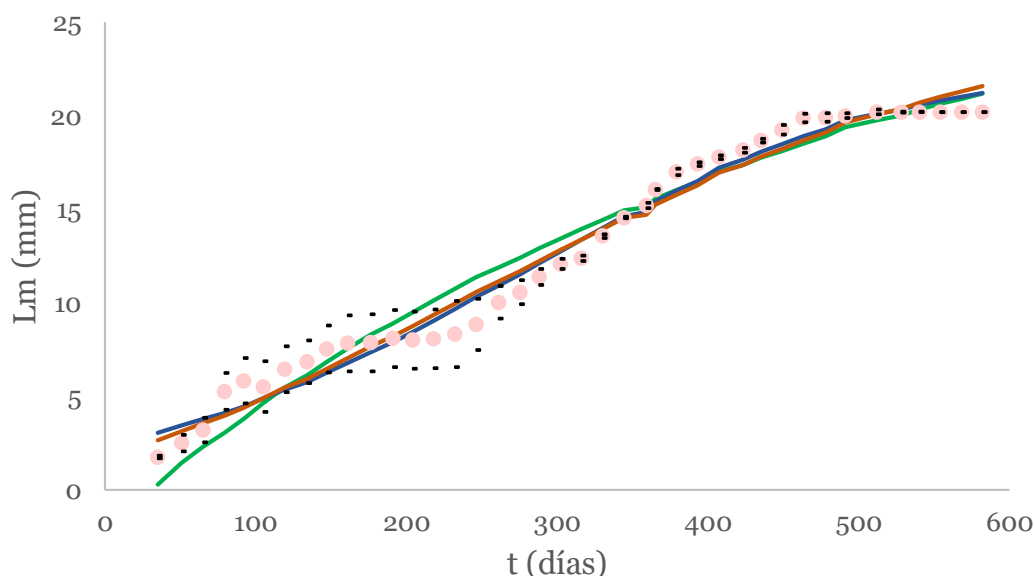
Modelo	b	r	r <sup>2</sup>	LL	CIA	Ecuación
von Bertalanffy	0,991	0,99	0,98	-185,2	378,9	$L_t=30,094(1-e^{-0,596(t-0,87)})$
Logístico	0,989	0,995	0,99	-181,4	371,3	$L_t=20,198/(1+e^{-(4,382-2,733*t)})$
Gompertz	0,991	0,995	0,989	-183,7	375,8	$L_t=26,226 * e^{-2,309(t-1,588)}$

### Puesta/Grupo 5

De esta puesta nacieron 8 individuos que tuvieron una longitud modal de 1,74 mm y que pudieron ser medidos hasta una longitud modal de 20,19 mm al año y medio de vida (**Fig. 2.1.10**). El grado de ajuste a los modelos (39 g.l. y  $p=0,05$ ) tuvo los siguientes  $\chi^2$ : 15,26 (von Bertalanffy); 3,87 (Logístico); 3,96 (Gompertz). De acuerdo a las pruebas de Wilcoxon no hubo diferencias significativas con  $Z=-0,108$ ,  $p=0,914$  (von Bertalanffy);  $Z=-0,188$ ,  $p=0,851$  (Logístico);  $Z=-0,121$ ,  $p=0,904$  (Gompertz). En la **Tabla 2.1.7** se presentan b, r, r<sup>2</sup> y los valores de ambos criterios de información (LL) y (CIA) junto a la correspondiente fórmula del modelo.

**Figura 2.1.10**

*Curvas de crecimiento observada y estimadas para la Puesta/Grupo 5*



La línea punteada (rosa) corresponde a los valores de longitud modal (Lm) observados en el Grupo 5 con su correspondiente  $\pm$ desvío estándar (puntos negros). Las líneas continuas corresponden a las curvas estimadas para los modelos: von Bertalanffy (verde), Logístico (azul) y Gompertz (rojo).

**Tabla 2.1.7**

*Estadísticos, criterios de información y ecuaciones para los modelos aplicados en el Grupo 5*

Modelo	b	r	r <sup>2</sup>	LL	CIA	Ecuación
von Bertalanffy	0,994	0,979	0,959	-169,7	347,9	$Lt=30,324(1-e^{-0,795(t-0,968)})$
Logístico	0,986	0,99	0,98	-166,4	341,4	$Lt=23,055/1+e^{(4,727-2,898^*t)}$
Gompertz	0,98	0,988	0,975	-168,4	345,3	$Lt=26,865^*e^{-e^{-2,392(t-1,58)}}$

Para los cinco grupos el modelo con mayor grado de ajuste al patrón de crecimiento observado fue el modelo logístico, mostrando en todos los casos el mayor coeficiente de correlación y determinación junto con los menores valores de ambos criterios de información, tanto de log-likelihood como el de Akaike. Luego siguió el de Gompertz y por último el de von Bertalanffy.

Por otro lado, entre los valores de longitud máxima asintótica calculada para cada modelo, en los cinco grupos, se encontraron diferencias significativas entre ellos mediante ANOVA de una vía  $F(2, 12)=59,77$   $p<0,05$ . En el test post hoc de Tukey se encontró que la diferencia significativa es la longitud máxima asintótica calculada para el modelo de von Bertalanffy en relación al modelo logístico  $q(p<0,05, 3, 2)=14,94$  y en comparación con el modelo de Gompertz  $q(p<0,05, 3, 2)=10,93$ . No se encontraron diferencias significativas entre los valores de longitud máxima asintótica de los modelos logístico y de Gompertz  $q(p<0,05, 3, 2)=4,004$ .

A su vez, se realizó un ANOVA entre las constantes de crecimiento de los cinco grupos para los tres modelos; no se encontraron diferencias significativas  $F(4, 10)=0,088$   $p=0,983$  y se cumplió la homogeneidad de varianzas (Levene  $F(4, 991)=0,048$   $p=0,994$ ).

Por otra parte, a los fines de comparar modelos de crecimiento en un posible escenario de presencia de *B. bonariensis* y *L. fulica*, *R. decollata* o *C. aspersum* se presentan en la **Tabla 2.1.8** los parámetros longitud máxima asintótica (Lmax), constante de crecimiento (k) e índice de Munro ( $\Phi$ ), calculados para cada modelo en las tres especies exóticas en relación a la especie nativa estudiada. Se indica la fuente de la cual se extrajo la información.

**Tabla 2.1.8***Comparación de parámetros con especies exóticas*

ESPECIE	Lmax	k	$\Phi$	MODELO	FUENTE
<i>Lissachatina fulica</i>	113,3	0,75	3,98	von Bertalanffy	Carvalho da Silva y Omena (2014)
<i>Rumina decollata</i>	29	5,54	3,66	von Bertalanffy	Valores calculados a partir de la Tabla IV Hines (1951)
<i>Bulimulus bonariensis</i>	21,46	0,78	2,55	von Bertalanffy	Esta tesis
<i>Cornu aspersum</i>	40	2,2	3,66	logístico	Nicolai et al. (2010)
<i>Bulimulus bonariensis</i>	20,43	1,9,	2,9	logístico	Esta tesis

**2.1.C.3. Tabla de vida**

*B. bonariensis* ( $n_0=102$ ) mostró una curva de supervivencia cóncava Tipo III (Rabinovich, 1980) (**Fig. 2.1.11**) (**Tabla 2.1.9**). En la población se registró una reducción del 48 % durante los primeros 50 días de seguimiento y sólo el 13,72 % alcanzó el año de vida con una longitud promedio de 16,68 mm. El último ejemplar pereció luego de 23 meses con una longitud total de 20,24 mm, teniendo en cuenta que en poblaciones naturales se ha registrado un tamaño máximo de 29,51 mm podemos decir que ejemplares de esta especie podrían llegar a vivir hasta 3 años, siendo la expectativa de vida calculada en la tabla de vida (**Tabla 2.1.8**) de 1020 días, 2,79 años. El pico máximo de mortalidad ( $d_x$ ) se registró antes del mes de vida (día 24), la tasa de mortalidad ( $q_x$ ) hasta el día 528 fue en promedio de 0,06 (0-0.21) y se registraron dos picos posteriormente los días 540 y 610 respectivamente (**Fig. 2.1.12**). Al superar el mes de eclosión, la esperanza de vida comenzó a aumentar (**Fig. 2.1.13**) y se mantuvo alta entre los 65-302 días de vida, exhibiendo dos picos de 18 los días 176 y 261 respectivamente. Luego del día 330 la esperanza de vida disminuyó.

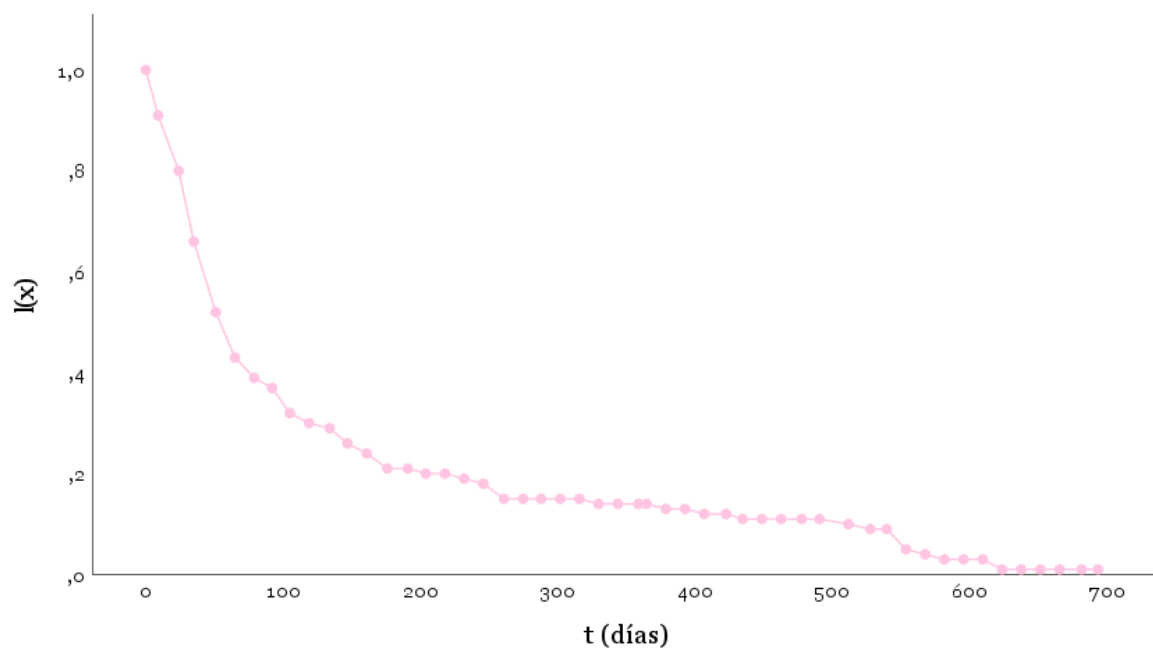
**Tabla 2.1.9***Tabla de vida*

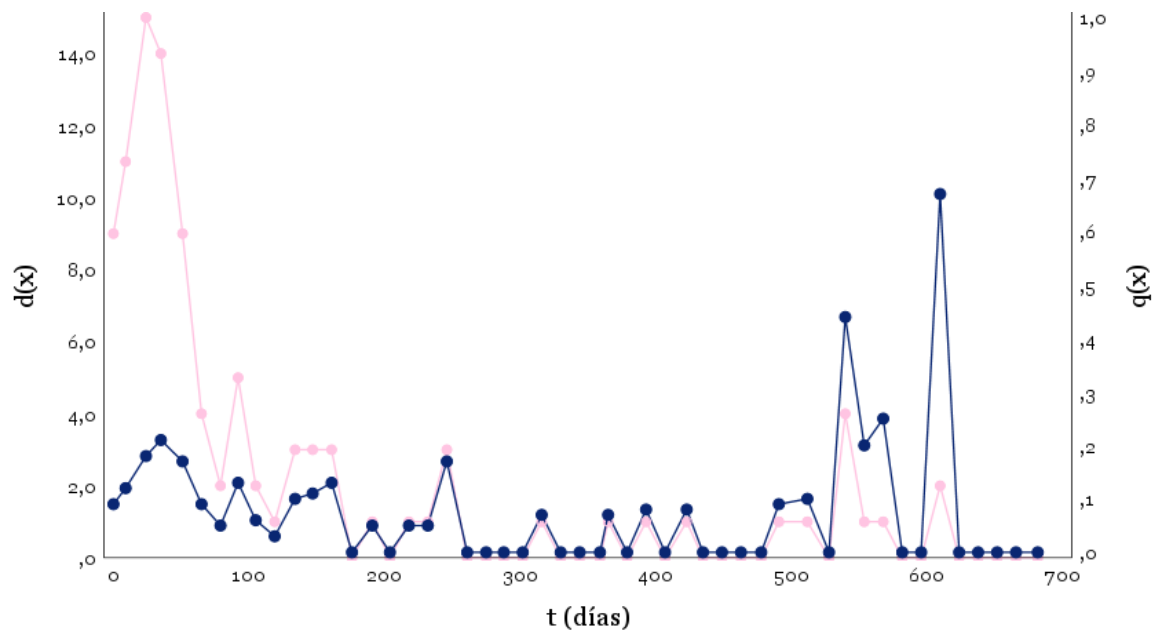
<b>x</b>	<b>n<sub>(x)</sub></b>	<b>l<sub>(x)</sub></b>	<b>d<sub>(x)</sub></b>	<b>q<sub>(x)</sub></b>	<b>L<sub>(x)</sub></b>	<b>T<sub>(x)</sub></b>	<b>e<sub>(x)</sub></b>
<b>0</b>	102	1,00	9	0,09	97,5	1020	10,00
<b>9</b>	93	0,91	11	0,12	87,5	922,5	9,92
<b>24</b>	82	0,80	15	0,18	74,5	835	10,18
<b>35</b>	67	0,66	14	0,21	60	760,5	11,35
<b>51</b>	53	0,52	9	0,17	48,5	700,5	13,22
<b>65</b>	44	0,43	4	0,09	42	652	14,82
<b>79</b>	40	0,39	2	0,05	39	610	15,25
<b>92</b>	38	0,37	5	0,13	35,5	571	15,03
<b>105</b>	33	0,32	2	0,06	32	535,5	16,23
<b>119</b>	31	0,30	1	0,03	30,5	503,5	16,24
<b>134</b>	30	0,29	3	0,10	28,5	473	15,77
<b>147</b>	27	0,26	3	0,11	25,5	444,5	16,46
<b>161</b>	24	0,24	3	0,13	22,5	419	17,46
<b>176</b>	21	0,21	0	0,00	21	396,5	18,88
<b>191</b>	21	0,21	1	0,05	20,5	375,5	17,88
<b>204</b>	20	0,20	0	0,00	20	355	17,75
<b>218</b>	20	0,20	1	0,05	19,5	335	16,75
<b>232</b>	19	0,19	1	0,05	18,5	315,5	16,61
<b>246</b>	18	0,18	3	0,17	16,5	297	16,50
<b>261</b>	15	0,15	0	0,00	15	280,5	18,70
<b>275</b>	15	0,15	0	0,00	15	265,5	17,70
<b>288</b>	15	0,15	0	0,00	15	250,5	16,70
<b>302</b>	15	0,15	0	0,00	15	235,5	15,70
<b>316</b>	15	0,15	1	0,07	14,5	220,5	14,70
<b>330</b>	14	0,14	0	0,00	14	206	14,71
<b>344</b>	14	0,14	0	0,00	14	192	13,71
<b>359</b>	14	0,14	0	0,00	14	178	12,71
<b>365</b>	14	0,14	1	0,07	13,5	164	11,71
<b>379</b>	13	0,13	0	0,00	13	150,5	11,58
<b>393</b>	13	0,13	1	0,08	12,5	137,5	10,58
<b>407</b>	12	0,12	0	0,00	12	125	10,42
<b>423</b>	12	0,12	1	0,08	11,5	113	9,42
<b>435</b>	11	0,11	0	0,00	11	101,5	9,23
<b>449</b>	11	0,11	0	0,00	11	90,5	8,23
<b>463</b>	11	0,11	0	0,00	11	79,5	7,23
<b>478</b>	11	0,11	0	0,00	11	68,5	6,23
<b>491</b>	11	0,11	1	0,09	10,5	57,5	5,23
<b>512</b>	10	0,10	1	0,10	9,5	47	4,70
<b>528</b>	9	0,09	0	0,00	9	37,5	4,17
<b>540</b>	9	0,09	4	0,44	7	28,5	3,17
<b>554</b>	5	0,05	1	0,20	4,5	21,5	4,30
<b>568</b>	4	0,04	1	0,25	3,5	17	4,25
<b>582</b>	3	0,03	0	0,00	3	13,5	4,50

Continuación **Tabla 2.1.9**

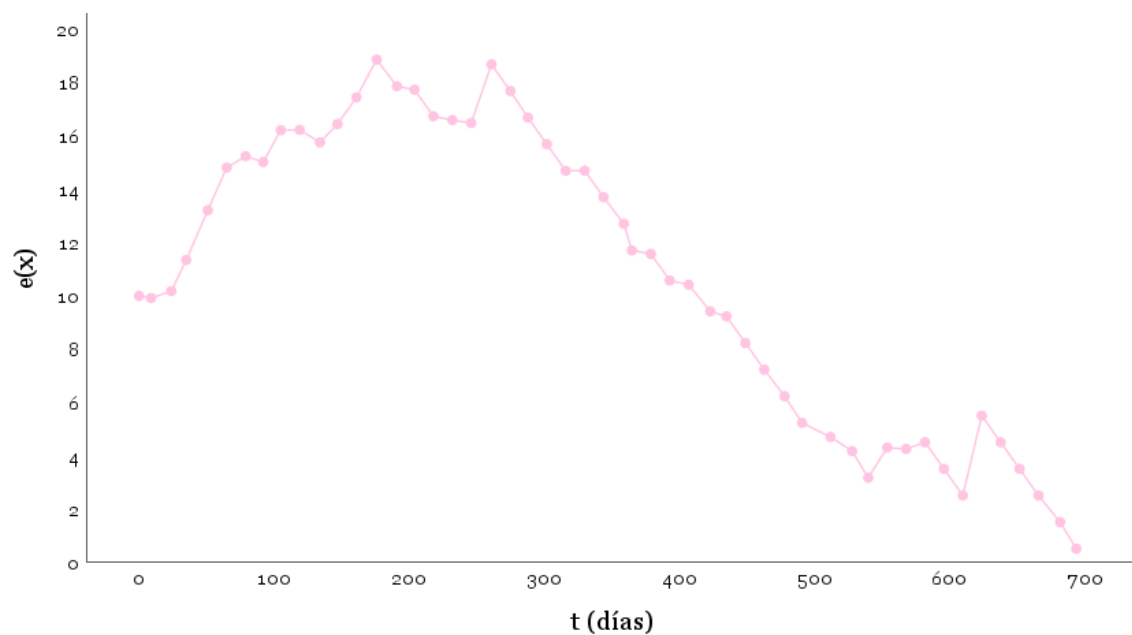
x	n <sub>(x)</sub>	l <sub>(x)</sub>	d <sub>(x)</sub>	q <sub>(x)</sub>	L <sub>(x)</sub>	T <sub>(x)</sub>	e <sub>(x)</sub>
596	3	0,03	0	0,00	3	10,5	3,50
610	3	0,03	2	0,67	2	7,5	2,50
624	1	0,01	0	0,00	1	5,5	5,50
638	1	0,01	0	0,00	1	4,5	4,50
652	1	0,01	0	0,00	1	3,5	3,50
666	1	0,01	0	0,00	1	2,5	2,50
682	1	0,01	0	0,00	1	1,5	1,50
694	1	0,01		0,00	0,5	0,5	0,50

En la tabla de vida horizontal de *B. bonariensis* se representan los siguientes estadísticos: x= edad representada en días; n<sub>(x)</sub>= número de individuos a la edad x; l<sub>(x)</sub>= supervivencia; d<sub>(x)</sub>= mortalidad; q<sub>(x)</sub>= tasa de mortalidad; L<sub>(x)</sub>= supervivencia promedio en el intervalo de edad; T<sub>(x)</sub>= expectativa de vida; e<sub>(x)</sub>= esperanza de vida.

**Figura 2.1.11***Curva de supervivencia*

**Figura 2.1.12***Mortalidad*

Se representan los valores de mortalidad ( $d(x)$ : en rosa) y la tasa de mortalidad ( $q(x)$ : en azul) de *B. bonariensis* a lo largo del tiempo en días.

**Figura 2.1.13***Esperanza de vida*

## 2.1.D. DISCUSIÓN

En los moluscos terrestres, uno de los aspectos de la historia de vida se encuentra relacionado al número de huevos por puesta, lo cual es variable en las distintas especies. Incluso dentro de una especie existen variaciones en función al tamaño, edad del progenitor y factores ambientales (Heller, 2001).

*Megalobulimus maximus* por ejemplo, posee un reducido número de huevos en las puestas, ya que oscilan entre 1-2 (Rengifo Vásquez et al., 2004). En Argentina, dentro de las especies exóticas podemos citar a *Deroceras reticulatum* para la cual se ha registrado un promedio de 3 huevos, *D. laeve* que ovipone alrededor de 6 huevos (Clemente et al., 2007) y *Rumina decollata* en la que se observaron entre 3-13 huevos con un promedio de 8 (Álvarez González et al., 2019). Entre las especies exóticas con elevado número de huevos encontramos a *Cornu aspersum* cuyas oviposiciones son de 118 huevos promedio (Daguzan et al., 1981) y *Lissachatina fulica* cuyas puestas oscilan entre 10 y 400 huevos (Armiñana García et al., 2020).

Dentro de la familia Bulimulidae aunque son escasos los estudios sobre ciclos de vida, crecimiento y reproducción existen algunos trabajos en representantes neotropicales. En *B. tenuissimus* el promedio de huevos por puesta para individuos pareados fue de 48,3 (Silva et al. 2008) y de 35,9 cuando el sustrato era humedecido diariamente (Silva et al., 2009), encontrándose en ese rango lo observado en el presente estudio para *B. bonariensis* (44). En otro Bulimulidae como *Bostryx conspersus*, Ramírez (1988) contabilizó un tamaño de nidada inferior (10-34). No obstante, en un representante de la familia de mayor tamaño como *Placostylus* las puestas varían entre 25 y 450 huevos con un promedio de 205 (Brescia et al., 2008).

En cuanto al tiempo promedio hasta la eclosión en *B. tenuissimus* es diez días superior (23,62) (Silva et al., 2008) que en *B. bonariensis* (13,7), para *B. conspersus* también se observó un tiempo de incubación mayor (19,56) (Ramírez, 1988), incluso en *Placostylus* el intervalo es de 22 días en promedio (Brescia et al., 2008). No obstante, *B. tenuissimus* mostró poseer una tasa de natalidad promedio entre 39 % (Silva et al., 2008) y 53 % (Silva et al., 2013), encontrándose *B. bonariensis* con 41,82 % dentro de dichos valores. Por lo tanto, es una característica que se debe destacar y tener en consideración al momento de explicar el surgimiento de poblaciones en determinados cultivos (Frana y Massoni, 2007, 2011; Peralta, 2016). Por otro lado, este parámetro también es importante al momento de comparar con especies tales como *L. fulica* y *R. decollata* cuya tasa de natalidad es en ambos casos considerablemente superior, entre 90 % y 63 % respectivamente (Armiñana García et al., 2020; Álvarez González et al., 2019), en C.

*aspersum* se registró un 31,8 % de natalidad (Daguzan et al., 1981). Sumado a que los juveniles de *L. fulica* eclosionan a los 11 días, a diferencia de otras especies exóticas que poseen un mayor tiempo de desarrollo como *Deroceras* con 16 días de incubación (Clemente et al., 2007), *C. aspersum* 22 días y *R. decollata* entre 25 (Hines, 1951) y 40 días (Álvarez González et al., 2019).

Otros rasgos importantes en la historia de vida son los modelos de crecimiento, el tiempo de desarrollo y la longitud del adulto (Benbellil-Tafoughalt y Koene, 2015). El crecimiento de *B. bonariensis*, en primera instancia, se estudió en todos los grupos de manera conjunta como una cohorte, mostrando un muy buen ajuste a los tres modelos planteados siendo el modelo logístico el más explicativo del patrón observado. García et al. (2006) para *C. aspersum* también observaron un buen ajuste a varios modelos tales como el de raíz cuadrada, exponencial, lineal y logístico siendo este último el de mayor coeficiente de correlación, lo cual fue corroborado por Nicolai et al. (2010). Por otro lado, aunque Silva et al. (2009) no analizaron el patrón de crecimiento de *B. tenuissimus*, el aspecto de las curvas presentadas siguen una tendencia sigmoidea.

Posteriormente, en el análisis de cada grupo también se observó un buen grado de ajuste a los tres modelos, siendo los de mayor ajuste el modelo logístico y el de Gompertz. Sin embargo, teniendo en cuenta los coeficientes de correlación, determinación y ambos criterios de información el modelo logístico explicó, en todos los casos, de manera más precisa el patrón de crecimiento.

Por otro lado, es relevante destacar que los modelos de crecimiento matemático brindan herramientas y resultados numéricos que permiten interpretar mejor los procesos biológicos, así como también obtener parámetros que posibilitan llevar adelante comparaciones. En este sentido, con respecto a la constante de crecimiento no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. El otro parámetro común biológicamente importante es la longitud máxima asintótica. En material depositado en la Colección Malacológica del Museo de La Plata se observó que el ejemplar de mayor tamaño mide 30,22 mm de longitud total de la conchilla (MLP-Ma 2315). En poblaciones naturales, la mayor longitud total medida en un individuo muestreado, para la realización del **Capítulo 2.2.-** de la presente tesis, fue de 29,51 mm. Durante el estudio de crecimiento del grupo como una cohorte se observó que el modelo de von Bertalanffy arrojó un valor de longitud máxima asintótica de 26,84 mm. Sin embargo, con el modelo logístico la longitud máxima asintótica calculada fue inferior (20,43 mm). No obstante, es importante resaltar que el análisis minucioso de cada grupo particular, permitió por un lado afianzar el modelo logístico como modelo más explicativo sino que también mostró que el modelo de von Bertalanffy sobreestimó en cuatro de los cinco grupos los

valores de longitud máxima asintótica, ya que fueron superiores a los 30 mm, sólo el grupo 4 arrojó un valor enmarcado dentro de una longitud real de los individuos de la población experimental. El modelo logístico fue el que predijo longitudes asintóticas más bajas y el de Gompertz no solo posee un buen ajuste sino que también los valores del parámetro longitud máxima fueron cercanos a los reales observados tanto en campo como en material de colección.

Además, el modelo de Gompertz implica un crecimiento sigmoideo con tres fases un crecimiento lento inicial, un ascenso hasta un punto de inflexión y un nuevo aumento hasta llegar a una asíntota, similar a un modelo logístico y diferenciable de este último por la ubicación del punto de inflexión localizado entre el 35-40 % en el de Gompertz y en el 50 % en el logístico (Mínguez, 2016). Este motivo sustenta la alta correlación entre estos dos modelos y los patrones de crecimiento observados, más similares a una curva sigmoidea que a una parabólica como la del modelo de von Bertalanffy. Por lo expuesto, podemos concluir que ambos modelos tanto el logístico como el de Gompertz son los que mejor explican el patrón de crecimiento. El logístico resultó el más explicativo desde el ángulo matemático y el de Gompertz el que ajustó mejor el parámetro longitud máxima.

Por otro lado, una herramienta muy útil es el índice de rendimiento  $\phi$  (Pauly y Munro, 1984), el cual permite comparar la eficiencia del crecimiento entre especies mediante la disponibilidad de parámetros en diferentes conjuntos de datos. De esta manera, se pudo comprobar que *B. bonariensis* posee una eficiencia del crecimiento inferior en relación a las tres especies exóticas con las cuales se comparó, *L. fulica*, *C. aspersum* y *R. decollata*. Por lo antes expuesto, se destaca la importancia de poner a prueba la aplicación de diferentes modelos ya que no sólo se revela otro aspecto de la historia de vida sino que también permite que otros autores puedan realizar comparaciones por medio del uso de éste y otros de los estadísticos mencionados.

Una curva de crecimiento logístico se encuentra conformada por una etapa temprana de crecimiento exponencial, un crecimiento lineal en el cual la energía se enfoca en el mantenimiento, una disminución del crecimiento y una asíntota al llegar a la senescencia (Karkach, 2006). En la curva del grupo analizado como cohorte y en las curvas de cada grupo individual la segunda fase de la misma, entre los días 200-300 cuando miden alrededor de 10 mm, se caracterizaron por una alta esperanza de vida, un descenso en la mortalidad y un notorio mantenimiento del tamaño corporal. Esta última observación se debe a una leve reducción de la tasa de crecimiento con posterior repunte de la curva, también observado por Silva et al. (2008) en *B. tenuissimus*. Durante ese lapso de tiempo la energía se encuentra concentrada no sólo en el mantenimiento del cuerpo y crecimiento sino también en el esfuerzo reproductivo (Carvalho et al., 2009).

En el **Capítulo 2.2.-** de la presente tesis doctoral y mediante una metodología diferente, se calculó la talla de madurez gonádica que se estableció, por medio de un análisis de regresión logística, en 12 mm de longitud total de la conchilla momento en el cual hay un descenso en la tasa de crecimiento. Durante la experiencia en laboratorio, se pudo seguir el crecimiento de cada grupo y de esta manera instaurar una edad, en días, según la longitud promedio de la conchilla. De esta manera, podemos inferir que la madurez gonadal, cuando llegan a la longitud de 12 mm y desciende levemente la tasa de crecimiento la alcanzan luego de los 200 días de vida. Por lo cual, los individuos que nacen son capaces de reproducirse recién a partir del año siguiente de nacidos. La aproximación de la talla de la primera reproducción es de 16,68 mm, valor obtenido al promediar las longitudes modales al año de vida, momento en el cual hay un segundo descenso, aunque más leve, de la tasa de crecimiento. En *B. tenuissimus* Silva et al. (2008) manifestaron que, entre los días 180 y 200 del experimento (cuando miden entre 15 y 18 mm), el crecimiento se desaceleró pero no se detuvo luego de la primera puesta, tanto en caracoles agrupados como dispuestos en pareja. Por lo cual, en esta especie el tamaño de la primera reproducción la alcanzaría más tempranamente que *B. bonariensis*. A diferencia de lo que sucede en *C. aspersum*, que alcanza la madurez sexual a las 13 semanas de nacidos (Nicolai et al., 2010) y antes del año de vida en el caso de *L. fulica* (Armiñana García et al., 2020).

En relación al tiempo de vida, Heller (1990) clasifica a los moluscos en dos categorías: los que poseen una vida corta, especies que viven menos de dos años, donde enmarca el género *Bulimulus* y los de vida larga, aquellos que viven más de dos años y que se reproducen en al menos dos estaciones. En cuanto al tiempo de desarrollo, bajo condiciones de laboratorio, fue posible criarlos durante casi dos años lo cual coincide con lo expuesto por Heller (1990), pero teniendo en cuenta las longitudes máximas registradas en poblaciones naturales, las mediciones sobre material de colección y la expectativa de vida calculada en el presente estudio (1020 días = 2,79 años) podemos ajustar el tiempo de vida de la especie y concluir que ejemplares de *B. bonariensis* llegan a vivir entre dos y tres años.

Incluso Silva et al. (2008, 2013) sostienen que *B. tenuissimus* es una especie de vida larga con mayor éxito reproductivo en ejemplares que alcanzan un mayor tamaño. Durante el experimento que las autoras realizaron en 2008, la población se mantuvo hasta que pereció el último ejemplar con 20,6 mm de longitud promedio, al igual que en *B. bonariensis* ya que durante el mismo tiempo de estudio los individuos llegaron a medir en promedio 20,24 mm. En un segundo experimento, Silva et al. (2013) lograron

que ejemplares de *B. tenuissimus*, mantenidos en grupos, llegaran a una longitud de 22,8 mm a los 990 días.

Por otro lado, según Karkach (2006) dentro de los moluscos, los gasterópodos y especies de la Familia Strombidae siguen curvas de modelos como exponencial, logístico, de Richard, Gompertz, von Bertalanffy o sigmoidea de Brody (1945) aplicables al tipo de crecimiento determinado. Según la definición de este último autor, en un crecimiento determinado dicho proceso se detiene al alcanzar la madurez sexual o se continúa durante un tiempo después, en contraposición a un crecimiento indeterminado que se define como una continuación del crecimiento luego de alcanzar la madurez. Lo cual fue observado en *B. tenuissimus* por Silva et al. (2008). Dadas las similitudes de esta última especie con *B. bonariensis*, sumado al tamaño en longitud de madurez gonádica calculado para la especie en cuestión, podemos concluir que *B. bonariensis* también posee un crecimiento indeterminado, al igual que otras especies de gasterópodos terrestres como por ejemplo *L. fulica* (Armiñana García et al., 2020), *Bradybaena similis* (Carvalho et al., 2008), *Habroconus semenlini* (Silva et al., 2009) y *Subulina octona* (D'ávila y de Almeida Bessa., 2005).

Luego de lo expuesto, podemos reflexionar respecto a los modelos matemáticos que se están implementando en la actualidad y desde hace ya tiempo. Hernandez-Llamas y Ratkowsky<sup>2</sup> (2004) manifestaron la necesidad de reconsiderar el uso de modelos de crecimiento sobre todo en peces, crustáceos y moluscos. Además de la necesidad de implementar nuevos. Al conocer aspectos básicos de la historia de vida de la especie en estudio, como por ejemplo poseer un crecimiento indeterminado, debemos comenzar a abrir paso a la aplicación de otras curvas de crecimiento que muy probablemente sean más explicativas, como multifásico y polinomial, mencionadas por Karkach (2006) y que son específicas para el tipo de crecimiento indeterminado.

Por otro lado, *B. bonariensis* mostró una curva de supervivencia tipo III típica de estrategias r con una alta mortalidad en el primer mes de vida, como ha sido observado en *Polymita brocheri* (Rodríguez-Potrony et al., 2020), en la cual a su vez al finalizar el período de cría sólo el 12 % de la población sobrevivió. Una alta tasa de mortalidad durante el primer año de vida con una supervivencia semejante fue observada por Staikou (1998) en *Cepaea vindobonensis*. En especies de *Placostylus* se registró una alta mortalidad juvenil de al menos 60 % (Brescia et al., 2008). También se registró una alta mortalidad en etapas tempranas en *B. similis* (Carvalho et al., 2008) y *Cornu aspersum* (Daguzan et al., 1981).

En *B. tenuissimus* la mortalidad, al finalizar la experiencia en laboratorio, varió entre 35 % en el grupo que fue humedecido diariamente (Silva et al., 2009) y 60 % en el

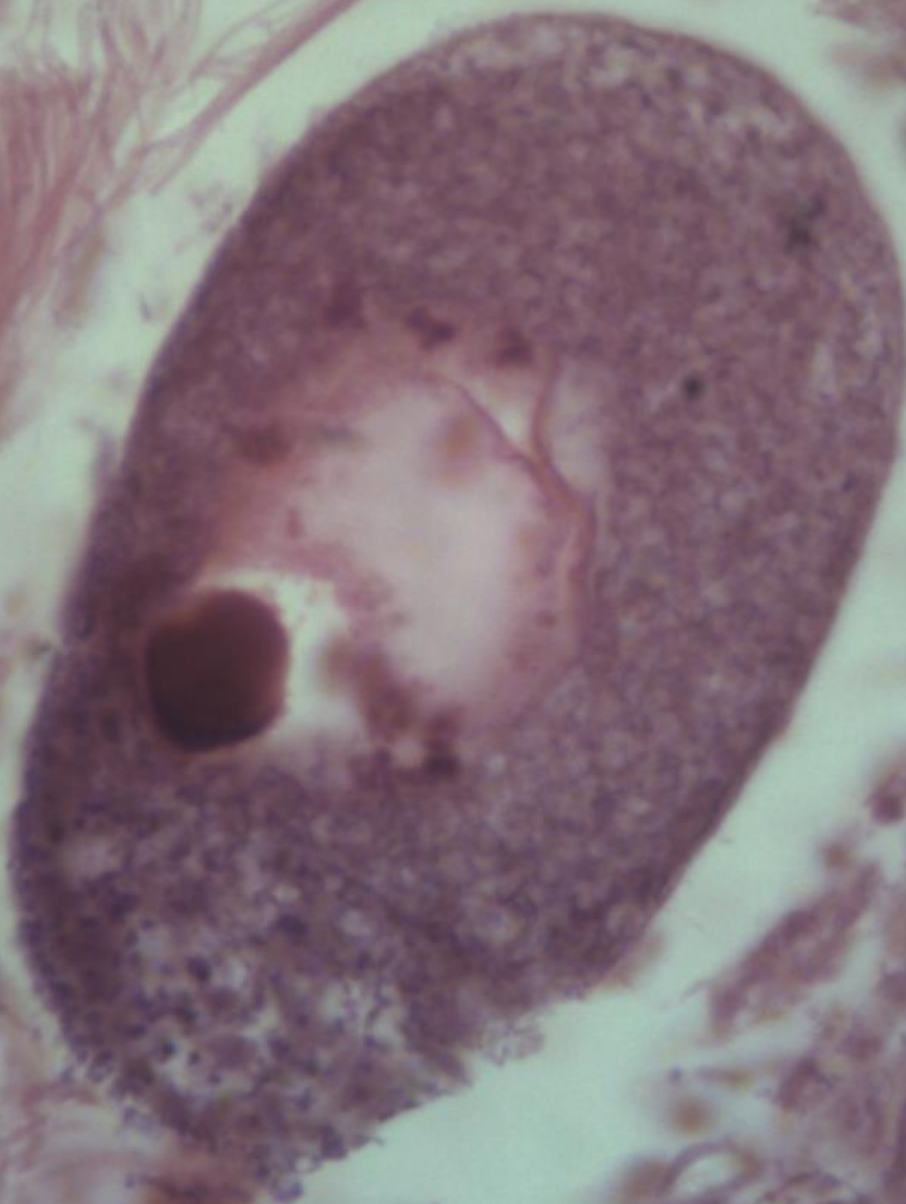
grupo criado con una dieta combinada Meireles et al. (2008), en *B. bonariensis* el seguimiento se realizó hasta que pereció el último individuo. Lo antes mencionado se contrapone a lo que sucede en otros gasterópodos terrestres con una estrategia k como *L. unilamellata* (Carvalho et al., 2009) y que han mostrado una alta tasa de supervivencia como *M. maximus* con 91,7 % (Rengifo Vásquez et al., 2004) y 85 % para *P. augusta* (James et al., 2013).

Es importante encarar estudios comparativos para poder establecer patrones evolutivos dentro de cada grupo debido a que las diferencias en el crecimiento cumplen una función muy importante en la evolución de las especies (Brey, 1999). Conocer, por ejemplo, la tasa de mortalidad permite comprender cómo la misma remodela la historia de vida para invertir más energía en las clases de edades que contribuyan a la reproducción, siendo producto de esto una mayor esperanza de vida en la época reproductiva (Stearns, 2000). Además, un amplio rango de distribución impacta en los procesos biológicos de los organismos afectando a la reproducción y supervivencia, lo cual se traduce en una variación fenotípica dentro de las especies, impulsando la evolución de la diversidad biológica (Gaitán-Espitia y Nespolo, 2014).

En América del Sur, son escasos los trabajos relacionados a ciclos de vida, crecimiento y reproducción de especies de *Bulimulus* (Meireles et al., 2008, 2010; Silva et al., 2008, 2009, 2013). Es importante continuar abordando estudios con este enfoque en distintas especies de gasterópodos terrestres no solo por ser especies plaga (Clemente et al., 2007), de importancia sanitaria y económica (Silva et al., 2013) o de cultivo comercial (Daguzan et al., 1981; Rengifo Vásquez et al., 2004) sino también por su relevancia ecológica (Staikou, 1998) y de conservación (Brescia et al., 2008; James et al., 2013; Rodríguez-Potrony et al., 2020), ya que las especies invasoras atentan con la pérdida de biodiversidad (Carvalho da Silva y Omena, 2014).

De esta manera, durante el desarrollo de este capítulo de la tesis se pudo contribuir a delinear patrones poblacionales básicos en *B. bonariensis*, que podrán ser tomados a futuro como elemento de comparación.

**PARTE 2.-**  
**ESTUDIOS POBLACIONALES EN**  
***Bulimulus bonariensis***  
**CAPÍTULO 2.2.-**  
**CICLO GAMÉTICO Y MADUREZ GONADAL**



### 2.2.A. INTRODUCCIÓN

La reproducción es el evento por el cual una especie se perpetúa en el tiempo y la población de la misma aumenta en un momento determinado.

La reproducción sexual está conformada por una serie de eventos temporales que pueden ser mensuales, estacionales o anuales según la especie, que se continúan uno a otro y en la mayoría de las especies se repiten, siendo de esta manera, una actividad cíclica. Se inicia con una etapa en la cual la gónada está indiferenciada o en reposo, en ese momento el organismo acumula nutrientes para ser usados durante el proceso; se continúa con la gametogénesis propiamente dicha caracterizada por la proliferación de células germinales y diferenciación de las gametas. Luego, hay una fase de madurez seguida por acumulación de ovocitos y espermatozoides; posteriormente o en simultáneo a la fase de madurez hay una etapa de evacuación o liberación y se concluye en un nuevo período de reposo, post evacuación o post liberación (Baqueiro y Stuardo, 1977).

Asociado al análisis del ciclo gamético, hay parámetros que ayudan a comprender la biología reproductiva. Uno de ellos es la edad o talla de primera madurez gonadal, que se refiere a la talla en la cual el 50 % de la población (LT<sub>50</sub>) se encuentra madura. Otros parámetros, son la frecuencia reproductiva, la proporción sexual, el mes o estacionalidad de evacuación. Varios autores han realizado, por métodos estereométricos, estudios que permiten calcular el volumen de la fracción gamética y la fecundidad parcial (Weibel y Gómez, 1962). También es frecuente el uso de índices, como el índice gonadosomático para especies que poseen variaciones de la masa gonadal respecto del peso de su cuerpo (Zetina-Zárate, 2000). Gabbott y Walker (1971) mencionaron el uso de índices de condición para caracterizar el ciclo sexual, valores elevados corresponden a períodos de madurez o liberación de gametas. Sin embargo, su aplicación principal es la determinación del estado de salud del organismo como respuesta al estrés.

Los estudios de la actividad gonádica constituyen una fuente importante de información, debido al aporte complementario que da al conocimiento del ciclo de vida, biología reproductiva, dinámica y estructura poblacional. De esta manera, la información obtenida puede ser aplicada en generar un manejo de la población en aquellas especies que poseen explosiones demográficas y realizar predicciones sobre los períodos de reclutamiento. En gasterópodos que forman parte de recursos pesqueros un análisis de este tipo permite obtener datos necesarios para promover esquemas de manejo sustentables, como los realizados en *Turbinella angulata* y *Busycon perversum* (Valencia et al., 2013). También contribuye a diseñar estrategias para evitar su

sobreexplotación, como en el caso de *Buccinanops cochlidium* (Averbuj et al., 2010) o evaluar la factibilidad de continuar una pesca artesanal, como por ejemplo en *Zidona dufresnei* (Giménez et al., 2005) y *Melongena corona* (Zetina-Zárate et al., 2000).

En otros casos, los estudios del ciclo gamético contribuyeron a generar medidas de conservación como sucedió en *Leptaxis caldeirarum* (Rodrigues y Medeiros, 2005). También, ayudaron a comprender la biología de especies amenazadas, por ejemplo en *Helicodonta obvoluta* (Maltz, 2003) y en *Pomacea patula catemacensis* (Carreón-Palau et al., 2003). No obstante, son escasos los trabajos que analizan la actividad gonádica con el fin de destacar la importancia del rol que cumple la especie a nivel ecológico, como por ejemplo Vélez-Arellano et al. (2011) en *Tegula aureotincta*.

En gasterópodos terrestres, los estudios en relación a ciclos gaméticos son escasos y referidos a especies puntuales, muchas veces alejadas filogenéticamente como sucede en *Arion ater* (Arionidae); *Lissachatina fulica* (Achatinidae); *Neohelix major* (Polygyridae); *Scutalus tupacii* (Bulimulidae); *Helix pomatia* (Helicidae); *H. obvoluta* (Helicodontidae); *Megalobulimus abbreviatus* (Strophocheilidae); *Vertigo pusilla* (Vertiginidae); *Vestia* Hesse, 1916 (Clausiliidae); *Oxychilus (Atlantoxychilus) spectabilis* (Oxychilidae); *Cerion mumia chrysalis* (Cerionidae) (Parivar, 1978; Ngowsiri et al., 1989; Cuezco, 1990; Cuezco, 1993; Juchno, 1999; Maltz, 2003; Horn et al., 2005; Mazurkiewicz y Pokryszko, 2005; Maltz y Sulikowska-Drozd, 2010; Ferreira et al., 2012; Suárez, 2015).

El objetivo, en este capítulo de la tesis, es analizar el ciclo gamético de *B. bonariensis* e identificar la talla de maduración gamética utilizando criterios histológicos durante el transcurso de dos años, con el fin de generar un aporte al conocimiento de una especie de la Familia Bulimulidae.

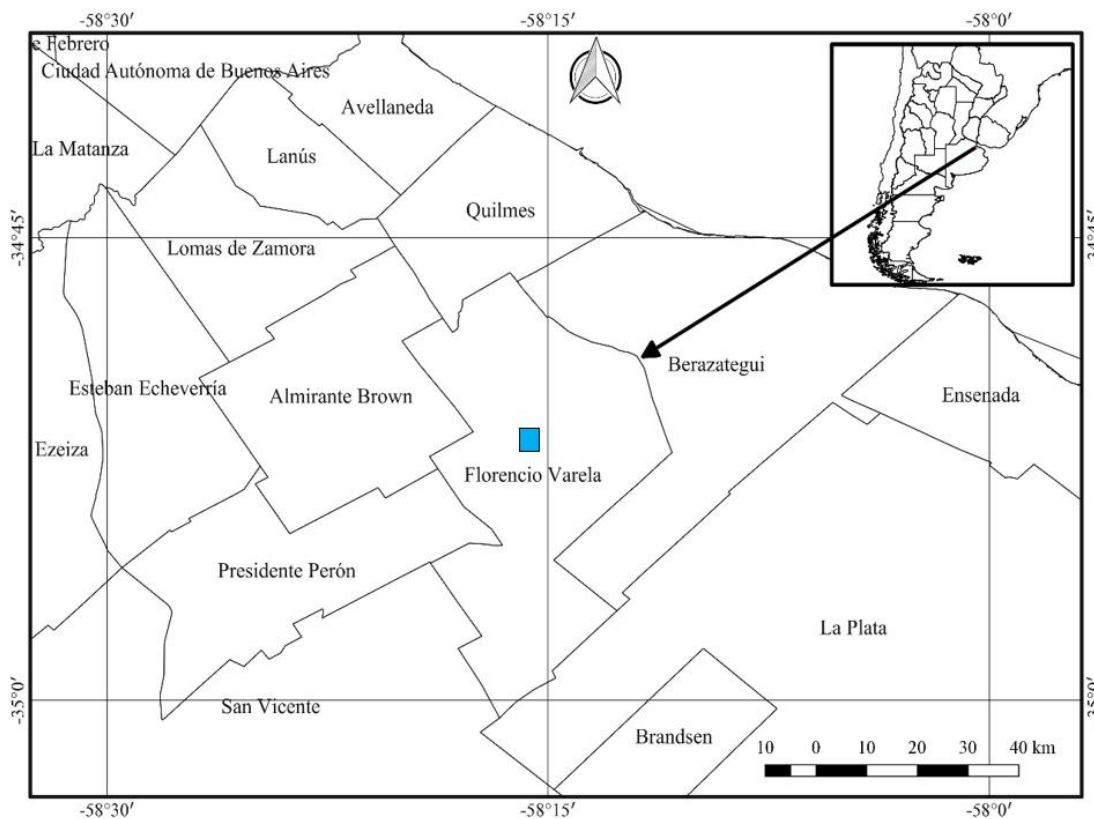
## 2.2.B. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.B.1. Muestreos

Se realizaron relevamientos de forma prospectiva en diversos sitios pertenecientes a la localidad de Florencio Varela, provincia de Buenos Aires. Partiendo de estos muestreos preliminares, se seleccionó de dicha localidad, un campo privado del área rural de Villa San Luis (**Fig. 2.2.1**) ( $34^{\circ}51'7,617''$  S  $58^{\circ}15'53,932''$  O) como lugar de muestreo (**Fig. 2.2.2**) por hallar una población estable de *B. bonariensis*.

**Figura 2.2.1**

*Sitio de colecta de ejemplares de Bulimulus bonariensis para el estudio de ciclo gamético y madurez gonadal*



### Figura 2.2.2

*Ambiente en el cual se realizaron los muestreos de Bulimulus bonariensis*



Los muestreos fueron realizados desde marzo de 2018 hasta diciembre de 2019, en períodos posteriores a precipitaciones fuertes o durante las lloviznas en horas tempranas o nocturnas, ya que la alta humedad del ambiente permite que los gasterópodos estén más activos (Barrientos, 2003). Las visitas al campo se realizaron con la intención de obtener material de forma mensual. No obstante, debido a las variaciones de las condiciones climáticas, hubo meses en los cuales no se obtuvieron muestras, otros en los cuales la colecta fue muy satisfactoria y otros meses en los que se colectó material en más de una ocasión. Por este motivo, las muestras obtenidas tuvieron que organizarse para un análisis estacional.

Siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuezco (2010), con modificaciones, se realizaron muestreos previos de tipo cuantitativos colectando 10 muestras del suelo superficial con una cuadrícula de armazón de madera de 100 cm X 100 cm, explorando hasta 5 cm de profundidad. Metodología que tenía como fin prospectar posturas e individuos juveniles que se encontraran entre 3 a 5 cm de profundidad, muchas veces también a los adultos, cuando las condiciones ambientales fueran desfavorables (períodos de bajas precipitaciones). Esta estrategia tuvo que ser reemplazada, debido a la escasa numerosidad de individuos capturados en relación al esfuerzo que implicaba. En su lugar, se realizaron muestreos cuantitativos siguiendo a De Winter y Gittenberger (1998) con modificaciones, el cual incluyó la delimitación de un área de muestreo de 15 x 15 metros en el terreno; esta parcela rotó en las distintas fechas de colecta en tres áreas del campo estudiado. El material se recolectó de forma manual y fue realizado durante 2 horas revisando cuidadosamente todos los microhábitats que la parcela incluía.

### **2.2.B.2. Procesamiento de las muestras**

El material se transportó al laboratorio en recipientes rígidos, debidamente etiquetados, siguiendo las recomendaciones de Barrientos (2003). La relajación y sacrificio de los ejemplares se realizó según se indicó en el **Capítulo 1.2**, apartado **1.2.B.2** de la presente tesis doctoral.

### **2.2.B.3. Mediciones**

La longitud total de la conchilla de cada animal, se midió con calibre tipo Vernier milimétrico (precisión de 0,01 mm). Luego de realizado el proceso de disección y observación anatómica, se midió el complejo peniano bajo microscopio estereoscópico (LEICA EZ4) con ocular micrométrico desde la base de la vaina del pene hasta el extremo del flagelo. Los preparados histológicos fueron observados y fotografiados bajo microscopio óptico (LEICA DMLS) Los diámetros ovocitarios se midieron utilizando el programa de análisis digital FIJI.

### **2.2.B.4. Procesamiento histológico**

#### **2.2.B.4.a. Fijado, conservación y deshidratación**

Con el fin de realizar el análisis histológico de la gónada, se realizaron disecciones de los ejemplares siguiendo la metodología descrita en el **Capítulo 1.2.-** apartado **1.2.B.2.a.**; esto permitió también contribuir, con algunos ejemplares, a las descripciones anatómicas.

Se aislaron las partes blandas correspondientes a la espira del caracol, esto incluyó el ovotestis, órgano objeto de estudio y glándula digestiva acompañante para evitar daños por manipulación. Además, se observó el aspecto general del sistema reproductor con el fin de determinar si existe algún tipo de variación, en alguna de las estructuras que los componen, a lo largo de un ciclo gonadal anual.

Las estructuras separadas se procesaron siguiendo a Gabe (1968) con modificaciones, se fijaron en una solución de Raillet-Henry durante 12 horas y posteriormente se conservaron en etanol 70 % hasta su procesamiento histológico.

Cada pieza fue deshidratada en una secuencia creciente de alcoholes según se detalla:

1. Etanol 70°.
2. Etanol 96° 2 hs.
3. Etanol 96° 2 hs.
4. Etanol 96° 2 hs.
5. Etanol 100° 60 min.
6. Etanol 100° 60 min.
7. Etanol 100° 60 min.
8. Alcohol butílico 45 min.
9. Alcohol butílico 45 min.
10. Alcohol butílico 45 min.

#### **2.2.B.4.b. Inclusión y montaje**

Para el presente estudio se incluyó entre el 50-70 % de los ejemplares por estación, según fue necesario. La inclusión de las estructuras, se realizaron mediante 2 baños de 24 horas a 56-58°C en parafina sintética en pellets Histoplast®. Posteriormente, los tacos se dejaron a temperatura ambiente para un enfriado homogéneo durante al menos 5 días, y luego se realizó el armado y tallado de los tacos sobre cubos de madera de 1 cm<sup>3</sup>. Los cortes se realizaron a 7 µm de espesor utilizando un microtomo tipo Minot de rotación, y se fueron apoyando sobre una capa de agua a 40°C para que la muestra quede bien estirada. Para el pegado de la muestra sobre los vidrios portaobjetos se utilizó una solución de albúmina y timol. De cada ejemplar se realizaron un promedio de 16 cortes histológicos por portaobjeto, y se obtuvieron de 4 a 8 preparados según la longitud total del animal.

#### **2.2.B.4.c. Tinción**

Se dejaron secando en bandejas con disposición horizontal durante 2 hs para luego proceder a su tinción con hematoxilina de Mayer - eosina en solución acuosa. Fueron montados en bálsamo sintético para microscopía.

1. Desparafinado en xileno 10 min.
2. Etanol 100° 1 min.
3. Etanol 96° 1 min.
4. Etanol 80° 1 min.

5. Agua destilada 1 min.
6. Hematoxilina 7 min.
7. Lavado en agua corriente (con 2 gotas de amoníaco) 1 baño rápido.
8. Eosina 3-5 min.
9. Etanol 80° (con 2 gotas de ácido acético glacial) 1 min.
10. Etanol 96° (con 2 gotas de ácido acético glacial) 1 min.
11. Etanol 100° (con 2 gotas de ácido acético glacial) 1 min.
12. Montaje definitivo.

### **2.2.B.5. Estructura gonadal**

En la **Parte 1.-** de la presente tesis doctoral **Capítulo 1.2.-** se describió en detalle la ubicación y morfología de la gónada hermafrodita u ovotestis.

Mediante la observación de los preparados histológicos se caracterizaron los estadios de desarrollo gonádico.

### **2.2.B.6. Ciclo gametogénico**

#### **2.2.B.6.a. Estadios del desarrollo gonadal**

Se estudió el desarrollo del ciclo gametogénico de *B. bonariensis* a través de un ciclo anual, durante los dos años muestreados de forma consecutiva (2018-2019).

El establecimiento de los diferentes estadios gonadales se realizó en base a datos cualitativos de tipo descriptivo y consistió, fundamentalmente en la observación de las preparaciones histológicas. Para el estudio del ciclo gametogénico se consideraron los siguientes estadios de acuerdo a Averbuj et al. (2010):

1-Proliferación, 2-Crecimiento, 3-Pre-Evacuación, 4-Evacuación, 5-Reabsorción.

#### **2.2.B.6.b. Clasificación de las células germinales**

Con el fin de complementar la descripción del ciclo gamético de *B. bonariensis* se realizó una clasificación de las células germinales, para lo cual se partió de los criterios propuestos por Maltz y Sulikowska-Drozd (2010), considerándose a los tipos celulares de la siguiente manera: **0.-** cuando el tipo celular está ausente; **0.5.-** cuando en el corte hay 1-2 grupos de células o 1-2 ovocitos; **1.-** varios grupos de células o de 3-6 ovocitos; **2.-** más de diez grupos de células o más de seis ovocitos.

Además, para determinar los estadios de desarrollo de la línea germinal femenina se consideraron los diámetros ovocitarios acorde a Griffond y Bolzoni-Sungur (1986).

#### **2.2.B.6.c. Variación morfológica en relación al desarrollo gonadal**

Se observó el aspecto del sistema reproductor en general con el fin de verificar si algún componente del mismo manifestaba variaciones morfológicas.

#### **2.2.B.6.d. Talla de primera madurez gonadal**

Con el objetivo de conocer la longitud total de la conchilla (LT) o talla mínima a la cual se alcanza la madurez reproductiva, se clasificaron los cortes de manera binaria: 0.- perteneciente a individuos con gónada indiferenciada o inmaduros (presencia de células germinales indiferenciadas y de ovocitos pre- vitelogénicos) y 1.- pertenecientes a individuos maduros (presencia de ovocitos vitelogénicos y estadios de espermiogénesis). Luego, los datos fueron agrupados cada 5 mm y se calculó la Proporción de Madurez Gonádica (PMG) para cada conjunto de datos. Mediante un análisis de regresión logística, con el programa PAST 3.25, se graficó la talla en la cual el 50 % de los individuos se encuentran maduros. Para finalizar, se evaluó el ajuste del modelo con el programa IBM SPSS Statistics versión 22.

Con el fin de verificar si puede ser considerado otro parámetro de madurez, se estudió la relación entre la longitud total del complejo peniano (LCP) y la longitud total (LT) por medio de un análisis de regresión simple con el programa PAST 3.25.

## 2.2.C. RESULTADOS

### 2.2.C.1. Muestreos

De los trabajos de campo realizados, se obtuvo material de 15 muestreos dando un total de 169 ejemplares, que fueron agrupados estacionalmente. Durante el año 2018 se colectaron el siguiente número de individuos: 25 (otoño), 14 (invierno), 28 (primavera), 21 (verano). En el año 2019 se colectaron los siguientes individuos: 26 (otoño), 13 (invierno), 17 (primavera), 25 (verano).

### 2.2.C.2. Estructura gonadal

La gónada u ovotestis, desde un estado del desarrollo celular indiferenciado (**Fig. 2.2.3 A**), hasta un estado maduro (**Fig. 2.2.3 B**) se encuentra constituida por acinos o folículos (**Fig. 2.2.3 B: f**) dispuestos paralelamente entre sí y agrupados en lóbulos uno detrás de otro.

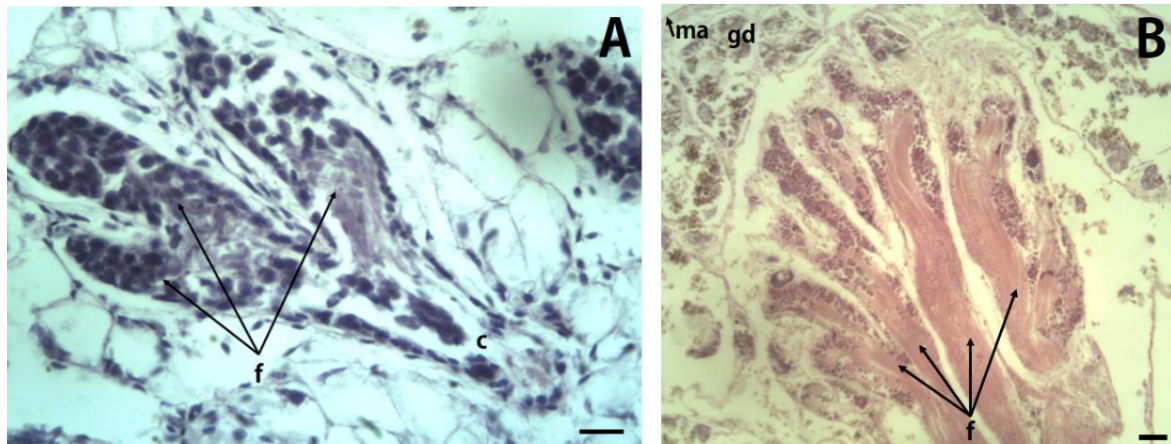
Los distintos estadios de la línea germinal masculina se encuentran ubicados en relación al epitelio, que limita cada folículo a lo largo de todo el recorrido del mismo y, en la medida que se van desarrollando se orientan hacia el lumen. En el proceso de espermatogénesis se identificaron: espermatogonias con forma cuadrangular  $\sim 20 \mu\text{m}$  de longitud, con núcleo de gran tamaño  $\sim 7\text{-}8 \mu\text{m}$  y abundante citoplasma, dispuestas en ramilletes (**Fig. 2.2.4 A, F: eg**) o paralelas entre sí (**Fig. 2.2.4 C, L**) siempre en contacto directo con el epitelio del folículo. Los espermatocitos primarios tienen aspecto redondeado ( $7\text{-}10 \mu\text{m}$  de diámetro), poseen grandes núcleos con cromatina dispersa dando aspecto granuloso y ocupando casi por completo el cuerpo celular (**Fig. 2.2.4 A, C, D: es1**), los espermatocitos secundarios tienen forma redondeada de diámetro similar a los primarios, pero se caracterizan por tener el núcleo condensado ubicado en el centro de la célula y un citoplasma claramente diferenciado (**Fig. 2.2.4 C, D: es2**). Se observaron distintos estadios de espermatidas: las denominadas tempranas tienen un cuerpo celular alargado con un núcleo redondo. Este último, pasa a ubicarse en un extremo de la célula y el citoplasma se desplaza hacia el lado opuesto para luego dar origen a la cola del espermatozoide (**Fig. 2.2.4 C, D, F, G: esp1**). Este tipo celular y los mencionados previamente se encuentra en contacto con el epitelio del folículo o directamente se ubican rodeando a las células de Sertoli, que cumplen la función de sostén y nutrición de todos los estadios en desarrollo gametogénico (**Fig 2.2.4 A, D, E, G: S**). En las espermatidas tardías el núcleo adquiere forma ovalada y se comienza a diferenciar la cola (**Fig. 2.2.4 C, D, E, F: esp2**). Los espermatozoides maduros tienen

la zona nuclear o cabeza bien definida, de aspecto alargado en contacto con la pared folicular o la célula de Sertoli, se disponen siempre en paquetes y con sus largas colas o flagelos dirigidos hacia el lumen del folículo (**Fig. 2.2.4 D, E, F, G, H, K, L: ez**).

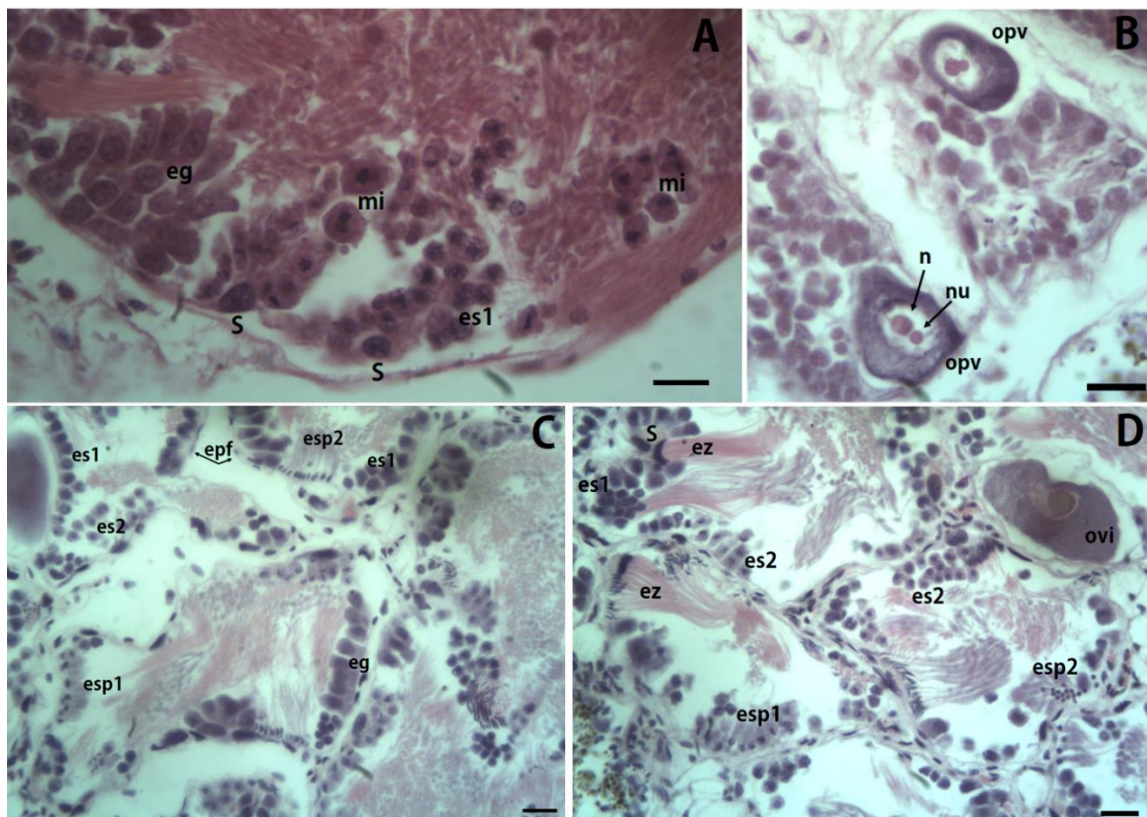
La línea germinal femenina se desarrolla en los extremos terminales de los folículos o acinos, a diferencia de lo que sucede con la línea gametogénica masculina.

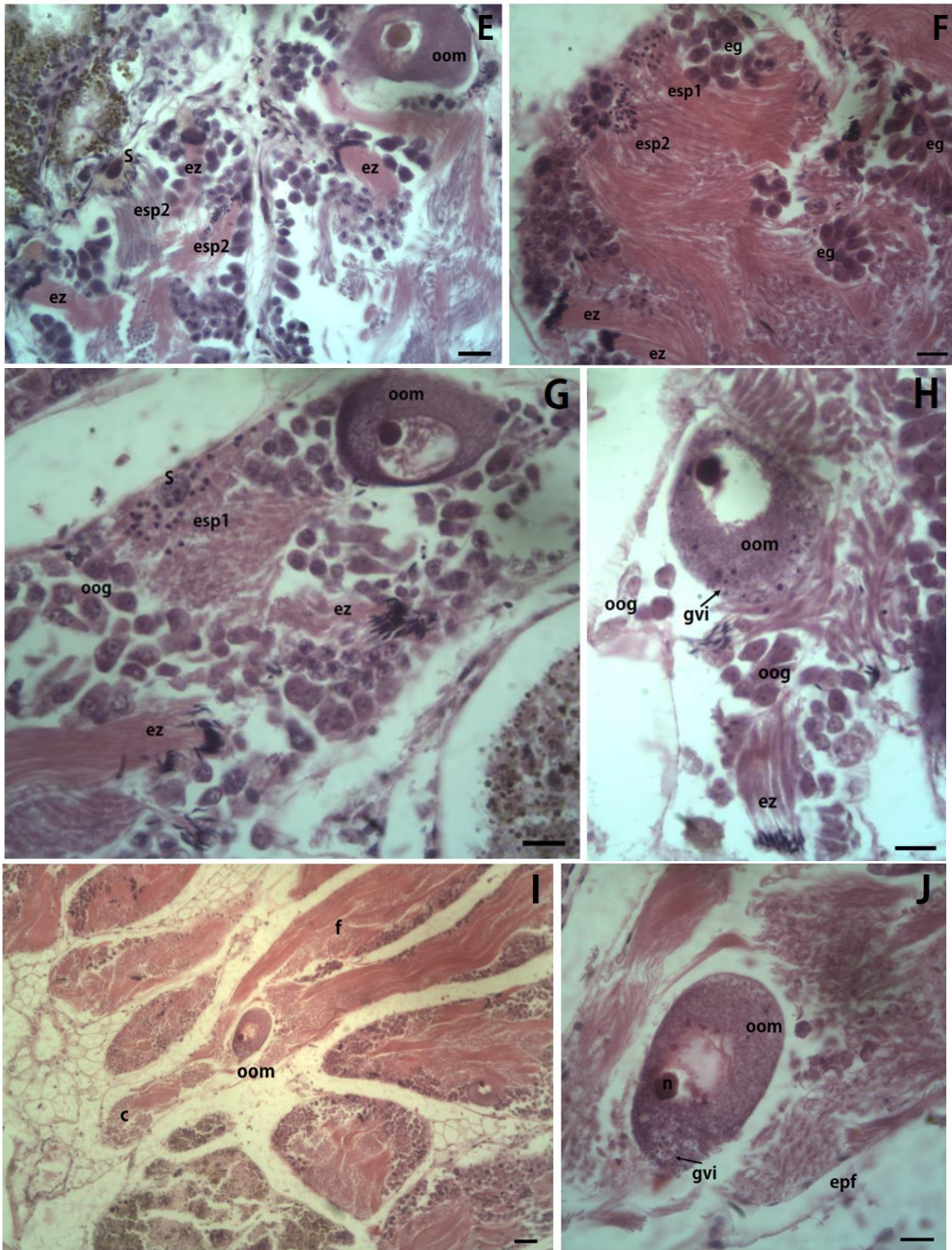
Las ovogonias se caracterizan por ser células redondeadas de ~10-15  $\mu\text{m}$  de longitud siempre en contacto con las paredes del folículo o unidas a él por un pedicelo, cuando están presentes es en baja numerosidad (**Fig. 2.2.4 G, H: oog**). Luego, dan lugar a ovocitos con núcleos más condensados que comienzan a acumular gránulos de vitelo en el citoplasma y en la medida que avanzan en el desarrollo aumentan su tamaño hasta superar las 130  $\mu\text{m}$ . Durante todo momento se encuentran en contacto directo con las paredes del folículo, únicamente los ovocitos maduros se observaron en la luz del mismo o descendiendo por los conductos.

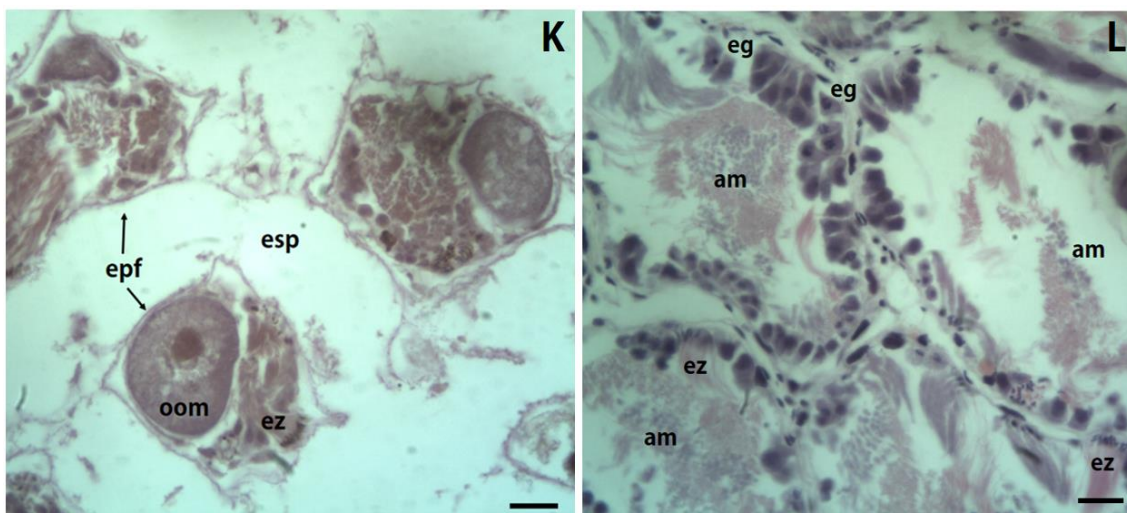
Los ovocitos pre-vitelogénicos son células redondeadas con un rango de diámetro entre ~20-60  $\mu\text{m}$ , con citoplasma basófilo sin gránulos visibles, con un gran núcleo y un nucléolo (**Fig. 2.2.4 B: opv**). En la medida en que se desarrollan como ovocitos vitelogénicos miden entre ~60-100  $\mu\text{m}$  y van adquiriendo vitelo de manera progresiva, por lo que su citoplasma va cambiando a tonos eosinófilos (**Fig. 2.2.4 D: ovi**). Los ovocitos maduros tienen un diámetro entre ~100-140  $\mu\text{m}$  y poseen gránulos de vitelo. La presencia de este grado de desarrollo es evidente en estadios de pre-evacuación, con más de seis ovocitos por corte en la gónada, se los observó tanto en los folículos como descendiendo de los mismos en dirección a los conductos (**Fig. 2.2.4 E, G, H, I, J: oom**). En el estadio de evacuación este tipo celular es igual o menor a tres y se evidenciaron algunos de ellos descendiendo por los conductos. Durante la reabsorción (**Fig. 2.2.4 K, L**) se observó la presencia de amebocitos o células fagocíticas en el lumen de los folículos (**Fig. 2.2.4 L: am**), además se evidenció que los folículos tenían espacios en su interior o estaban colapsados.

**Figura 2.2.3***Aspecto general del ovotestis*

A- Se observan los folículos (f) y el conducto (c) de un lóbulo en estado de desarrollo indiferenciado. Escala= 20  $\mu$ m. B- Aspecto general de un lóbulo del ovotestis, se aprecia la disposición paralela de los folículos (f), la glándula digestiva (gd) rodeando la gónada y el manto (ma). Escala= 50  $\mu$ m.

**Figura 2.2.4***Estadios gonadales de Bulimulus bonariensis*





**A-** Aspecto de un folículo en proliferación con abundantes mitosis (mi), presencia de espermatogonias (eg), espermaticitos primarios (es1) y células de Sertoli (S). **B-** Morfología de ovocitos pre-vitelogénicos (opv) en crecimiento, se diferencian núcleo (n) y nucléolo (nu). **C- D-** Crecimiento inicial y en pleno desarrollo respectivamente, se observan espermatogonias (eg), espermaticitos primarios (es1), espermaticitos secundarios (es2), espermátidas tempranas (esp1), espermátidas tardías (esp2) y espermatozoides maduros (ez) asociados al epitelio folicular (epf); la línea germinal femenina se caracterizó por la presencia de ovocitos vitelogénicos (ovi). **E- F-** Se observa en estadio de pre-evacuación a la línea germinal masculina y de la línea germinal femenina sólo ovocitos maduros (oom). **G- H-** Estadio de evacuación con espermatozoides y ovocitos maduros. Aparecen las primeras ovogonias (oog). **I- J-** Ovocito maduro con gránulos de vitelo (gvi) en estadio de evacuación, desplazándose desde el folículo (f) de origen en dirección al conducto (c). **K-** Reabsorción, folículos con amplias distancias entre ellos. Aún contienen algunos grupos de espermatozoides y ovocitos maduros. **L-** Reabsorción, en el lumen de los folículos quedan residuos reproductivos que son degradados por amebocitos (am). Hay un comienzo de proliferación de espermatogonias (eg). Escala A-F, H-L=20  $\mu\text{m}$ . G=50  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.C.3. Ciclo gametogénico

#### 2.2.C.3.a. Estadios del desarrollo gonadal

Se identificaron los siguientes estadios de desarrollo gonadal:

##### **Proliferación**

Gran cantidad de espermatogonias y algunos espermaticitos primarios. Con células de Sertoli. Folículos con ovogonias y algunos ovocitos (20-60  $\mu\text{m}$ ) pre-vitelogénicos en crecimiento.

##### **Crecimiento**

Serie espermatogénica con espermaticitos primarios y secundarios, espermátidas tempranas y tardías. Pocos espermatozoides en contacto con el epitelio del

folículo. Con células de Sertoli. En la serie germinal femenina los ovocitos (60-100  $\mu\text{m}$ ) se encuentran en vitelogénesis y con cantidad creciente de vitelo.

### **Pre-evacuación**

Lumen del folículo con abundantes grupos de espermatozoides y espermatidas tardías en contacto con el epitelio del folículo por sus cabezas. Presencia de células de Sertoli. Ovocitos maduros (100-140  $\mu\text{m}$ ) con numerosos gránulos de vitelo y listos para ser liberados, gran parte ubicados en los conductos de los folículos.

### **Evacuación**

Folículos con pocos grupos de espermatozoides. Con células de Sertoli. Con pocos ovocitos repletos de vitelo. Comienzan a aparecer algunas ovogonias.

### **Reabsorción**

Folículos contraídos o con una amplia distancia entre ellos. En otros casos, con espacios en el lumen, se evidencia la presencia de amebocitos y espermatogonias en desarrollo. Con algunos grupos de espermatozoides y ovocitos sin liberar.

La estacionalidad del desarrollo gonadal se graficó en la **Figura 2.2.5**. En una mirada global, se destaca que existe proliferación continua a lo largo de año, especialmente acentuada en otoño e invierno. La pre-evacuación y evacuación de las gametas son fenómenos que tienen lugar principalmente en primavera y se manifestó que no ocurren en otoño. Por último, se pudo apreciar reabsorción sólo en otoño del primer año de muestreo. Para un estudio más detallado del ciclo reproductivo se realizó un análisis de la abundancia relativa de cada tipo celular, en las distintas estaciones (**Tabla 2.2.1**) y en la línea ovogénica se estudiaron las frecuencias de la longitud ovocitaria a través del tiempo (**Fig. 2.2.7**).

### **2.2.C.3.b. Períodos del ciclo gonadal**

La actividad gonadal mostró variaciones a lo largo del año que fueron separadas en tres períodos:

#### **Período de reclutamiento**

Esta etapa comienza en invierno, una parte de la población se manifiesta en pre-reclutamiento y otra en reclutamiento. Se observó el estadio de pre-evacuación con varios grupos de espermatozoides maduros en los folículos, además de la presencia de espermatoцитos y espermátidas (**Tabla 2.2.1**) y un alto número de ovocitos vitelogénicos de longitud entre 80-100  $\mu\text{m}$ . Durante la primavera, la línea germinal femenina mostró proliferación de ovogonias, el resto del año no se visualizó este tipo celular. Además, la gónada contenía ovocitos de todas las tallas desde 20-140  $\mu\text{m}$  (**Fig. 2.2.7**), se observaron pocos ovocitos pre-vitelogénicos, creciente número de ovocitos vitelogénicos y ovocitos que llegan al estado de madurez con longitudes que oscilan de 100-140  $\mu\text{m}$ , siendo el de mayor tamaño medido de 139,05  $\mu\text{m}$ . Se encontraron ovocitos maduros sólo en esta estación, hasta 8, listos para ser evacuados notándose en el citoplasma un gran número de gránulos de vitelo (**Fig. 2.2.4 H, J**). Posteriormente, las tallas ovocitarias que se registraron fueron menores evidenciando que el período reproductivo ocurre en esta estación. Además, se encontraron numerosos grupos de espermatozoides listos para ser evacuados o ya evacuados, hecho que se manifestó con el lumen del conducto hermafrodita colmado de espermatozoides maduros (**Fig. 2.2.6**).

#### **Post-reclutamiento**

Esta etapa ocurre en verano, donde aún se observan algunos individuos en evacuación de las gametas. En la línea espermatogénica se encontró la mayor abundancia de los cinco tipos celulares y la mayoría de los ovocitos medidos se encontraron en un rango de tallas desde 20-80  $\mu\text{m}$  indicando la presencia de una nueva generación de ovocitos y que no existe un período de descanso gonadal.

#### **Pre-reclutamiento**

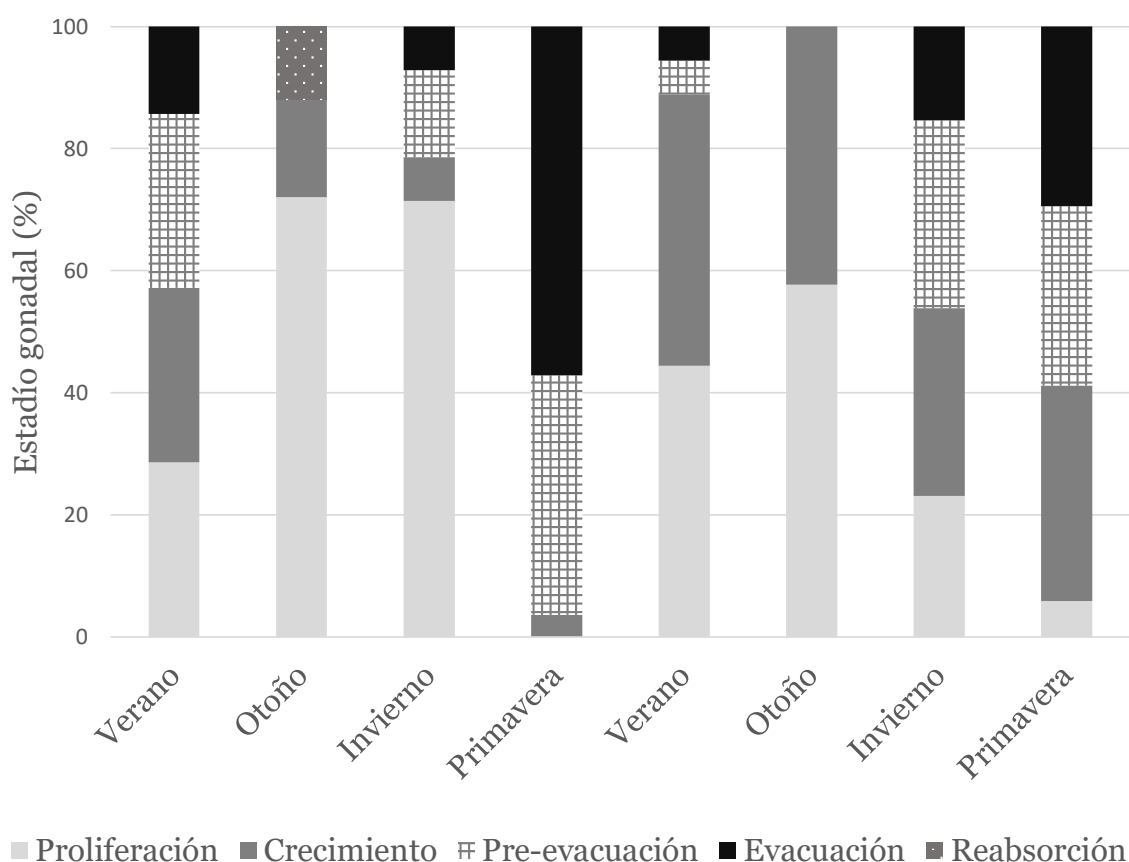
En otoño se encontró la mayor abundancia de espermatoцитos tanto primarios como secundarios. Aunque, se evidenció que la línea germinal masculina tiene actividad espermatogénica de forma continua a lo largo del año, con numerosos grupos de espermatoгонias dispuestas mayormente a modo de racimos para dar inicio a la siguiente generación gamética. Por otro lado, todos los estadios estuvieron presentes en las cuatro estaciones climáticas a lo largo de los dos años de realizado el estudio.

La actividad ovogénica durante el otoño, se observó con ovocitos pre-vitelogénicos y abundantes ovocitos vitelogénicos en crecimiento. El rango de tamaño más frecuente en los ovocitos pre-vitelogénicos en crecimiento fue de 40-60  $\mu\text{m}$  y en los ovocitos vitelogénicos fue de 60-80  $\mu\text{m}$  incorporando gradualmente vitelo. Sólo en otoño se manifestó reabsorción, con espacios entre los folículos (**Fig. 2.2.4 K**), además de ovocitos y espermatozoides que no fueron descargados y que posteriormente sufren lisis en el ovotestis. En otros casos, se evidenciaron folículos con un lumen amplio y con amebocitos en el mismo (**Fig. 2.2.4 L**).

En invierno se observó, como mencionamos anteriormente, que parte de la población manifiesta una gran proliferación con abundantes espermaticitos secundarios, espermátidas tempranas y tardías. Los ovocitos pre-vitelogénicos más representados fueron los que oscilan en una longitud de 40-60  $\mu\text{m}$ .

**Figura 2.2.5**

*Frecuencia estacional porcentual de los estadios gonadales observados en B. bonariensis durante el período 2018-2019*



**Tabla 2.2.1**

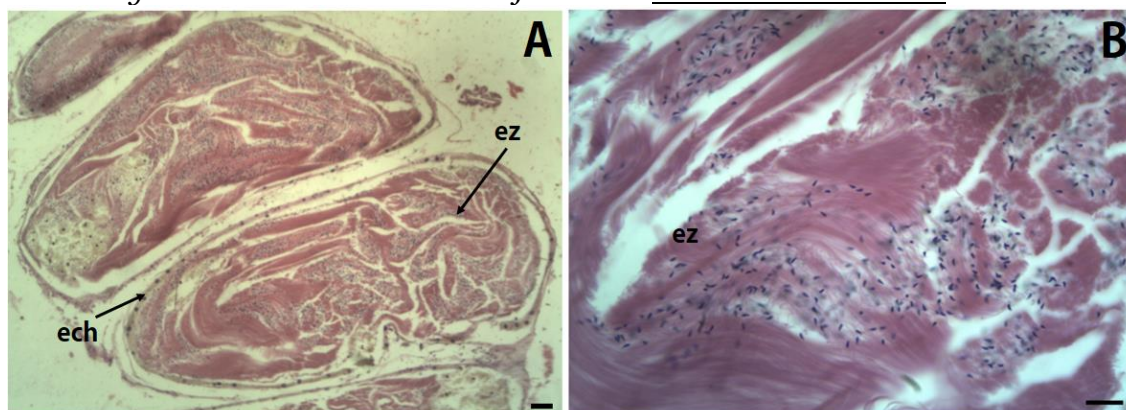
Clasificación de las células germinales en *Bulimulus bonariensis*

TIPO CELULAR	AÑO	VERANO	OTOÑO	INVIERNO	PRIMAVERA
es1	'18	2	1	0,5	2
	'19	1	2	0,5	0,5
es2	'18	2	2	2	2
	'19	2	2	2	0,5
esp1	'18	2	1	1	2
	'19	2	1	0,5	2
esp2	'18	2	1	1	1
	'19	2	2	1	2
ez	'18	2	1	1	1
	'19	2	2	2	1
opv	'18	1	2	2	0,5
	'19	2	2	1	0,5
ovi	'18	2	1	2	1
	'19	1	1	2	1
oom	'18	0	0	0	2
	'19	0	0	0	2

Abreviaturas: espermatocono primario (es1), espermatocono secundario (es2), espermátida temprana (esp1), espermátida tardía (esp2), espermatozoide maduro (ez), ovocito maduro (oom), ovocito pre-vitelogénico (opv), ovocito vitelogénico (ovi). Clasificación de las células germinales: **0.-** tipo celular ausente; **0.5.-** 1-2 grupos de células o 1-2 ovocitos; **1.-** varios grupos de células o de 3-6 ovocitos; **2.-** más de diez grupos de células o más de seis ovocitos.

**Figura 2.2.6**

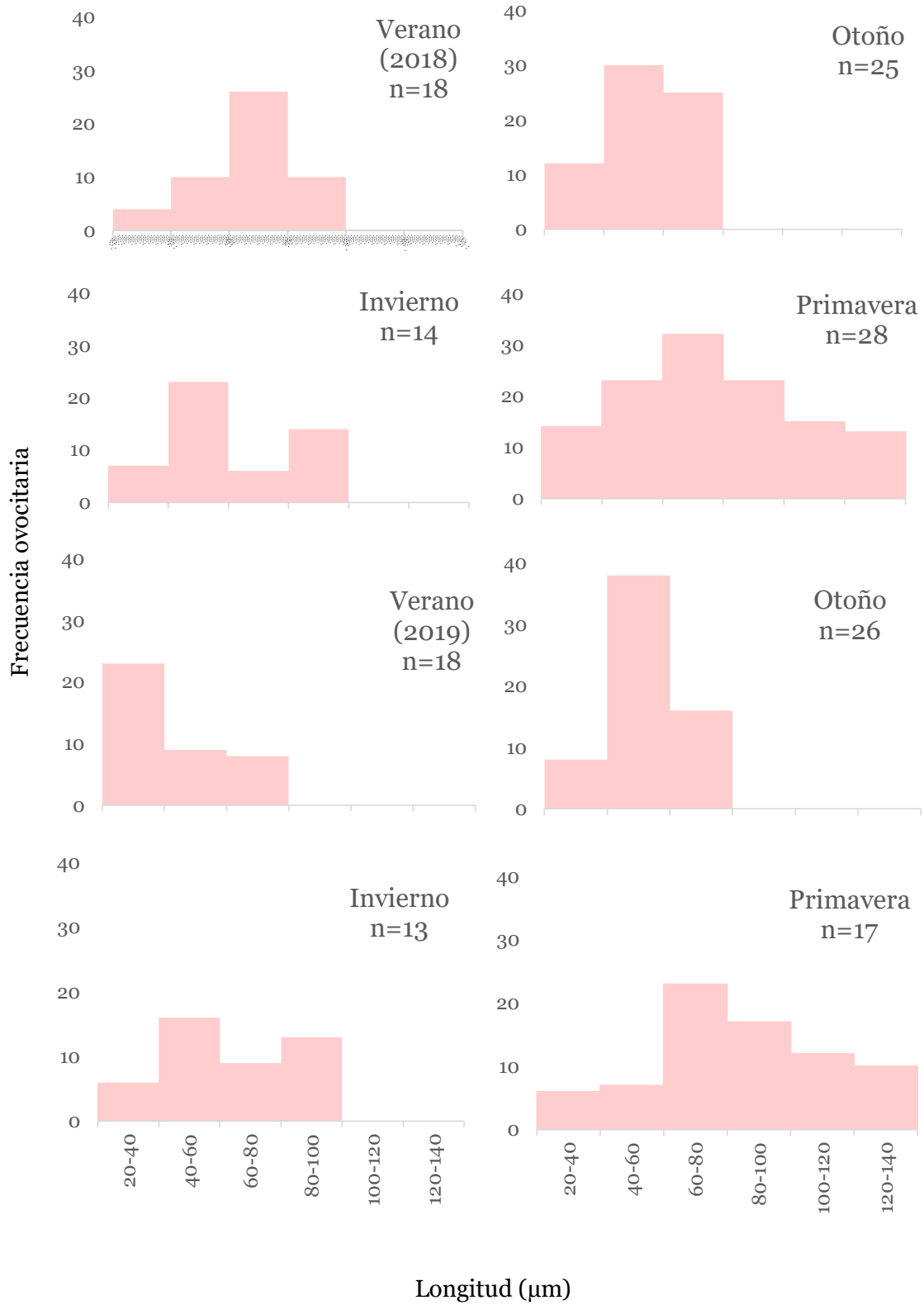
Corte longitudinal del conducto hermafrodita de *Bulimulus bonariensis*



**A-** Se observa el epitelio del conducto hermafrodita (ech) y su interior repleto de espermatozoides (ez), en estadio gonadal de evacuación. **B-** Detalle de los espermatozoides. Escala A=50  $\mu$ m, B=20  $\mu$ m.

**Figura 2.2.7**

*Histogramas de frecuencias de tallas ovocitarias estacionales (marzo 2018 - diciembre 2019)*



### **2.2.C.3.c. Variación morfológica en relación al desarrollo gonadal**

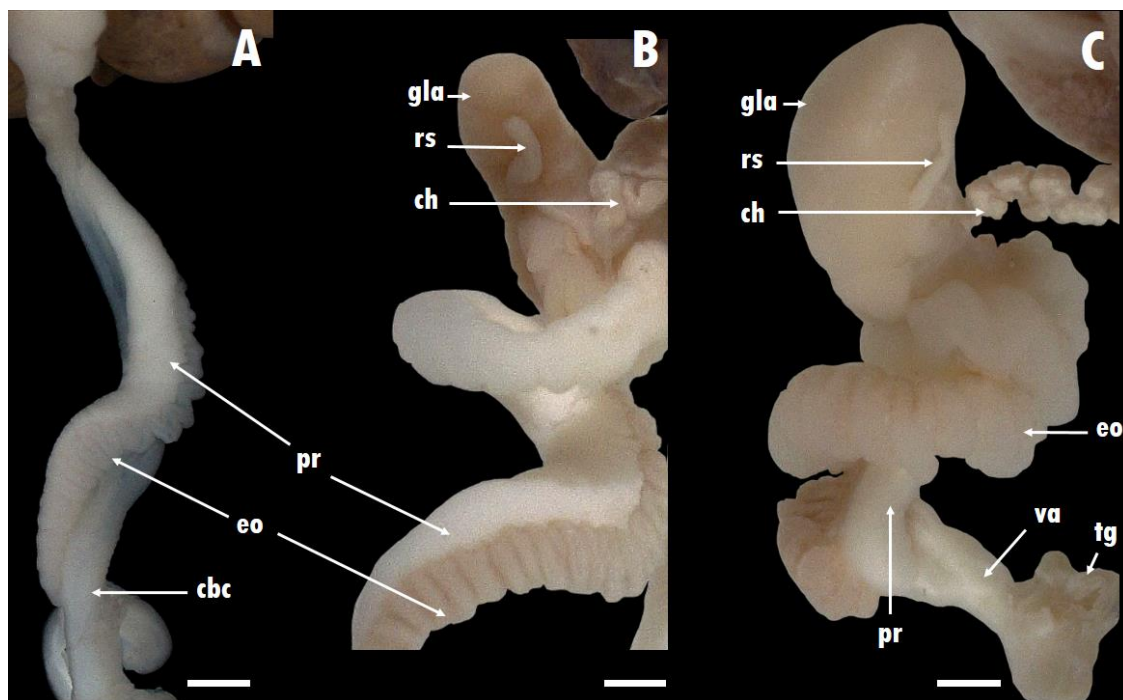
Por otra parte, se observó que la única estructura que presentó variaciones anatómicas periódicas fue el espermioviducto. El mismo se manifestó con tres aspectos según el estadio de desarrollo gamético en el cual se encontró el individuo: no desarrollado o de aspecto delgado y no plegado; en proceso de desarrollo con un diámetro intermedio y un leve plegamiento e individuos con espermioviducto de buen grado de desarrollo y replegado sobre sí mismo. (**Fig. 2.2.8**). Al generar un paralelismo entre este carácter y el estadio en el cual se encontró la gónada se pudo reconocer lo siguiente:

**Figura 2.2.8 A.** Ejemplares con espermioviducto no desarrollado o de aspecto delgado, corresponde a estadios de desarrollo gonadal en proliferación o crecimiento.

**Figura 2.2.8 B.** Ejemplares con espermioviducto en proceso de desarrollo con un diámetro intermedio, corresponde al estadio de desarrollo gonadal en pre-evacuación (en su gran mayoría).

**Figura 2.2.8 C.** Ejemplares con espermioviducto bien desarrollado, corresponde a estadios de desarrollo gonadal en pre-evacuación (unos pocos ejemplares), evacuación y reabsorción (la mayor parte de los ejemplares).

Por lo tanto, el estado de desarrollo del espermioviducto es claramente un elemento importante a la hora de determinar, *a priori*, el estadio de desarrollo del ovotestis.

**Figura. 2.2.8***Variación morfológica del espermioviducto*

Se observa el espermioviducto (eo) correspondiente a ejemplares adultos; donde en **A**-muestra ser no desarrollado, **B**- en proceso de desarrollo y **C**- desarrollado. Además, se señalan las estructuras del sistema reproductor presentes en la Figura: conducto de la bursa copulatrix (cbc), conducto hermafrodita (ch), glándula del albumen (gl), próstata (pr), receptáculo seminal (rs), tegumento (tg), vagina (va). Escala= 1 mm.

**2.2.C.3.d. Talla de primera madurez gonadal**

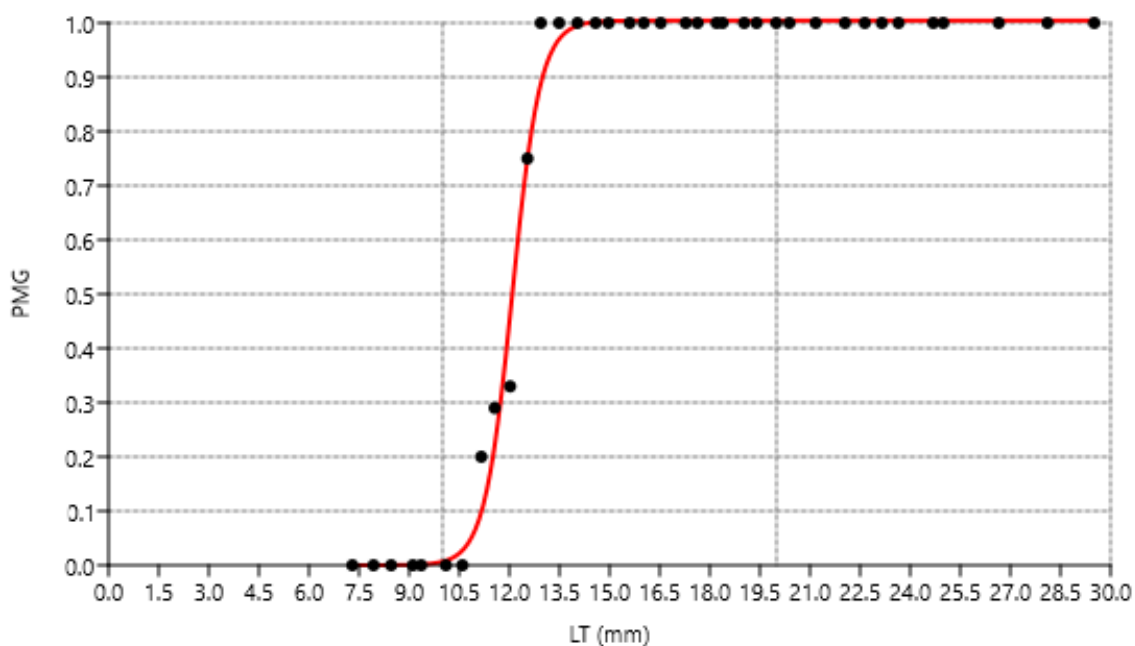
En los cortes histológicos de los ejemplares colectados a lo largo de los dos años de muestreo, se visualizó el ovotestis en distintos grados de desarrollo: en estado indiferenciado cuando no hay diferenciación de células germinales (**Fig. 2.2.3 A**), en estado de desarrollo inmaduro y maduro. Por otra parte, se pudo identificar que los primeros ovocitos pre-vitelogénicos aparecen desde los 8,42 mm de longitud total de la conchilla y las primeras espermatogonias a partir de los 9,92 mm. En base a lo observado en todos los ejemplares, se representó en la **Figura 2.2.9** la manera en que se distribuye la Proporción de Madurez Gamética (PMG) según su talla o LT. Los datos mostraron un buen ajuste al modelo con los siguientes pseudo R cuadrado: Cox y Snell=0,828, Nagelkerke=0,973, Mc-Fadden=0,924.

La talla en la cual el 50 % de la población muestreada se encuentra gaméticamente madura es de aproximadamente 12 mm de LT. La función correspondiente es:

$$y = 1,0044 / (1 + 3,6368E12 * \exp(-2,3925x))$$

**Figura 2.2.9**

Modelo de regresión logística para estimar la madurez gonadal de *Bulimulus bonariensis*

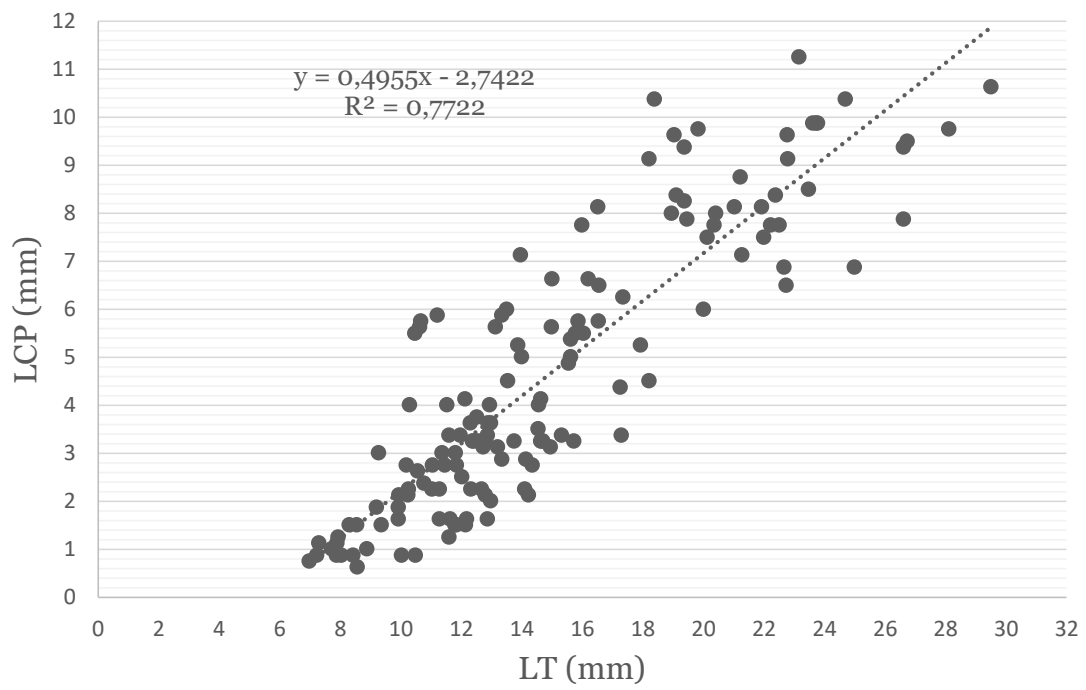


Modelo de regresión logística aplicado a la Proporción de Madurez Gamética (PMG) según la longitud total de la conchilla (LT), expresada en milímetros, para *B. bonariensis* (0=indiferenciados/inmaduros, 1=maduros).

La longitud del complejo peniano (LCPE) se graficó en función de la longitud total (LT) de los ejemplares (**Fig. 2.2.10**), la correlación entre ambas variables fue positiva y significativa estadísticamente ( $r=0,87$ ,  $p<0,01$ ). Además, se observa que en individuos de talla superior a los 13 mm, cuando ya han alcanzado la madurez gonadal, la dispersión es mayor y en el 83 % de los casos corresponden a ejemplares con una LCPE de 4 mm o superior.

**Figura 2.2.10**

*Longitud del complejo peniano (LCP) en función de la longitud total (LT)*



## 2.2.D. DISCUSIÓN

La estructura general de la gónada y la disposición paralela de los acinos o folículos es coincidente con lo observado en otros gasterópodos, por ejemplo: *Cornu aspersum*, *N. major* y *H. obvoluta* (Griffond y Bolzoni-Sungur, 1986; Cuezzo, 1990; Maltz, 2003).

De Jong-Brink et al. (1983) en pulmonados, Griffond y Bride (1987) en *C. aspersum* y Luchtel (1972) en *Arion circumscriptus* indican que los folículos gonadales se encuentran divididos en un compartimento central, correspondiente al lumen del mismo, donde se desarrollan las células masculinas y una región femenina de posición periférica, Cuezzo (1993) en *S. tupacii* observó una tendencia a esta regionalización. Sin embargo, en *B. bonariensis* el desarrollo de ambas líneas germinales, tanto espermatogonias como ovogonias tienen una ubicación en asociación íntima o al menos por un pedicelo al epitelio folicular; al igual que fue observado por Ngowsiri et al. (1989) en *L. fulica*. Cuando proliferan y crecen permanece en contacto con este epitelio y sólo se han observado paquetes de espermatozoides y ovocitos maduros ocupando la parte medular del folículo cuando ya se encuentran en estado maduro. Por otra parte, Griffond y Bride (1987) sectorizaron a cada folículo en tres anillos, un extremo distal donde se desarrollan las células sexuales, un anillo germinal intermedio y un cuello del folículo. En *B. bonariensis* la disposición de la línea germinal femenina se observó en su totalidad en el extremo distal o terminal del folículo y a la línea germinal masculina no sólo en el extremo distal, sino también a lo largo de la mayor parte del recorrido del mismo.

En base a las observaciones realizadas de los cortes histológicos se pudo evidenciar que, en los individuos más pequeños, las gametas femeninas se diferencian más tempranamente que las masculinas siendo los primeros en aparecer los ovocitos pre-vitelogénicos. Por este motivo, podemos decir que inicialmente son hermafroditas protoginios al igual que lo descrito por Luchtel (1972) en *A. circumscriptus*, estrategia poco común en moluscos (Zajac y Kramarza, 2017). A diferencia de lo que sucede en otro representante de la familia Bulimulidae como *S. tupacii* (Cuezzo, 1993) donde las gametas masculinas maduran más tempranamente que las femeninas. Luego, al alcanzar la madurez gonadal hay presencia tanto de espermatozoides como de ovocitos maduros por lo tanto pasan a ser hermafroditas simultáneos tal como se observó en muchos otros gasterópodos terrestres tales como *A. circumscriptus*, *A. ater*, *N. major*, *S. tupacii*, *M. abbreviatus*, *Vestia gulo* y *V. turgida*, *Cerion mumia chrysalis*, entre otros (Luchtel, 1972; Parivar, 1978; Cuezzo, 1990; 1993; Horn et al., 2005; Maltz y Sulikowska-Drozd,

2010; Suárez, 2015). Además, se pudo determinar que su estrategia reproductiva es de tipo iterópara, la más común en gasterópodos terrestres (Zajac y Kramarz, 2017).

Con respecto al desarrollo gamético, sólo se pudieron observar ovogonias en individuos en evacuación durante el período de reclutamiento, lo que indica que la proliferación de esta línea germinal es un evento que ocurre sólo una vez al año. A lo largo del ciclo anual sólo se observó crecimiento y desarrollo de los ovocitos. Respecto de las espermatogonias se encontraron abundantes grupos a lo largo de todo el ciclo anual, indicando una proliferación continua. El período en el cual se observaron tanto espermatozoides como ovocitos maduros, en el ovotestis de *B. bonariensis*, fue durante la primavera donde tiene lugar el reclutamiento de una nueva generación de individuos. El hecho de observar ovocitos maduros, una menor abundancia relativa de espermatozoides maduros en la gónada y el conducto hermafrodita repleto de ellos indican que durante la estación climática primavera se produciría el principal período de cópula. En *H. pomatia* (Lind, 1973), *H. lutescens* (Koralewska-Batura, 1999), *M. abbreviatus* (Horn et al., 2005), *O. spectabilis* (Ferreira et al., 2012) también se observó un período principal de reproducción en esta estación. A diferencia de *S. tupacii* (Cuezzo, 1993) y *L. caldeirarum* (Rodrigues y Medeiros, 2005) que tienen su período de cría durante el verano.

Al ir finalizando el periodo de reclutamiento, durante el verano y sobre todo en otoño, en aquellos individuos que se encontraron en evacuación se observó niveles elevados de proliferación y crecimiento en simultáneo. Esto significa, que inmediatamente comienza una nueva generación gamética para reproducirse en la siguiente primavera, al igual que lo observaron Maltz y Sulikowska-Drozd (2010) en dos especies de *Vestia*, Horn et al. (2005) en *M. abbreviatus* y en *V. pusilla* Mazurkiewicz y Pokryszko (2005). Por lo tanto, estas especies tienen actividad gonadal continua, sin un período de descanso anual. Además, la característica de tener ciclos de producción gamética continua se evidenció con la presencia de ambas líneas germinales en las cuatro estaciones sólo mostrando variaciones a lo largo del año y con la mayor abundancia relativa de todos los tipos celulares de la línea germinal masculina durante el verano, período de pos-reclutamiento. También, se pudo evidenciar en los histogramas de tallas ovocitarias cómo el número de ovocitos y sus longitudes modales varían según la etapa de desarrollo. Por otro lado, el visualizar espermatozoides maduros a lo largo de todo el año estaría indicando que el período de reclutamiento está determinado por la maduración de los ovocitos, observación que también manifestó Maltz (2003) en *H. obvoluta*.

Según Maltz y Sulikowska-Drozd (2008) existen dos estrategias de maduración: aquellos en los cuales se alcanza la madurez sexual al mismo tiempo que la talla máxima, como sucede en Helicidae; y gasterópodos en los cuales luego de alcanzar la madurez sexual continúa el crecimiento del animal, como ocurre en Succinidae y Vitrinidae. La especie estudiada se encuentra incluida dentro de la segunda estrategia mencionada, ya que luego de alcanzar la madurez (12 mm=LT y 4 mm=LCPE), estos pulmonados continúan creciendo.

Por otra parte, en ciertas especies de gasterópodos, por ejemplo *M. corona* (Zetina Zárate et al., 2000) es posible utilizar características macroscópicas de la gónada como tamaño, coloración y aspecto para diferenciar las distintas clases de edad; en la gónada masculina de *Z. dufresnei* se observó cambios en su coloración (Roche, 2013) y en *S. tupacii* (Cuezzo, 1993) variaciones en el tamaño y coloración de la misma a lo largo de su ciclo gamético. En la especie en estudio no se manifestaron tales características, no obstante, el grado de desarrollo del espermioviducto denotó ser una estructura útil a la hora de predecir el estadio de madurez de la gónada con sólo levantar el manto. Sumado a esta cualidad anatómica, se pudo establecer una longitud de conchilla mínima y de tamaño del complejo peniano a la cual los individuos de esta especie alcanzan la madurez gonadal. Los datos recién mencionados es información importante para determinar, *a priori*, el grado de desarrollo en animales colectados en áreas rurales donde la presencia de esta especie ha generado distintas problemáticas económicas (Frana y Massoni, 2007; 2011). No obstante, sería interesante estudiar el ciclo gamético en otras localidades para analizar cómo se comportan los demás morfotipos descriptos en los capítulos anteriores o entidades incluidas en *B. bonariensis*.

Al analizar la bibliografía respecto de la actividad reproductiva de gasterópodos de diversas familias se pudo apreciar que las similitudes y diferencias entre los grupos, no se encuentran relacionados a la cercanía filogenética, sino que dependen de las características propias del ambiente; siendo en los gasterópodos terrestres, los más importantes la temperatura, humedad, períodos de lluvias, duración de los períodos de estaciones secas/húmedas, tiempos de luminosidad, fotoperiodo, tipo de vegetación sumado a la disponibilidad de agua y alimento. Estos componentes exógenos actúan modelando los componentes endógenos relacionados con procesos metabólicos tales como los tiempos de maduración del sistema reproductor, períodos de hibernación/estivación, longitud y estacionalidad de la época reproductiva, velocidad del desarrollo gonadal, proliferación de células germinales sobre todo en los intervalos de transición de espermatoцитos secundarios a espermátidas tempranas y en llegar a la madurez (Luchtel, 1972; Bailey, 1981; De Jong-Brink et al., 1983; Ngowsiri et al., 1989;

Fontanillas et al., 1992; Cuezco, 1993; Koralewska-Batura, 1999; Healy, 2001; Barrada Beiras, 2003; Terwissen et al., 2007; Maltz y Sulikowska-Drozd, 2008, 2010).

El estudio realizado en este capítulo de la tesis permitió determinar el momento del año en el cual tiene lugar el período de reclutamiento, establecer la talla mínima de longitud total y del complejo peniano pero además contribuyó al conocimiento de aspectos básicos de su biología.

## CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, se abordó inicialmente un análisis desde el ángulo conquiolar, seguido de un estudio anatómico y genético tomando como punto de partida las especies presentes en la provincia de Buenos Aires. No obstante, la disponibilidad de ejemplares procedentes de varias provincias posibilitó que se pudiera llevar adelante un abordaje más amplio en cuanto a la distribución y por lo tanto enriquecedor. Lo que permitió cumplir con los objetivos propuestos y poner a prueba las hipótesis planteadas.

Por un lado, mediante el análisis conquilógico cualitativo se pudo reconocer y asignar el material estudiado a: *B. bonariensis*, *B. rushii* o *B. vesicalis*. Siendo las esculturas de la protoconcha el carácter más conspicuo para reconocer a *B. rushii* en conjunto con la longitud de la espira, longitud de la abertura y el aspecto general ovalado de la misma. En cuanto a *B. vesicalis* y *B. bonariensis* la longitud de la espira, longitud de la abertura y la poca angulosidad de los anfractos fueron los elementos que permitieron tal distinción. Por otra parte, mediante el análisis morfométrico de las tres especies, las variables que permitieron la discriminación en el ACP fueron los asociados a la penúltima vuelta, longitud y ancho, acompañado del diámetro menor; variables que pocas veces son tenidas en cuenta. Sin embargo, mediante el AD el diámetro menor y la longitud de la espira fueron los de mayor aporte.

Dada la variabilidad morfológica a nivel conquiolar manifiesta en cada una de las tres especies desde lo cualitativo, se profundizó en el estudio de esta fuente de caracteres con herramientas de análisis morfométrico. Para *B. bonariensis* la variabilidad a nivel conquiolar, está representada por tres morfologías claramente diferentes entre sí, con formas intermedias cuya asignación, a determinada morfología, tanto *a priori* como a partir de los ACP y AD es difícil de establecer. Las morfologías se reconocieron primeramente desde lo cualitativo y fueron respaldadas desde lo morfométrico, en el ACP la longitud de la penúltima vuelta, longitud de la espira, longitud total, longitud de la abertura, el diámetro menor y diámetro mayor fueron las variables de mayor aporte que permitieron la separación. Tales morfologías se pueden apreciar no sólo en ejemplares colectados en un mismo sitio sino también en distintos sitios o localidades dentro del rango de distribución de la especie. Incluso tal variabilidad está representada en muestras depositadas en colecciones de museos, donde algunas muestras de morfología "A" fueron determinadas como *B. sporadicus* y otras como *B. bonariensis*; ejemplares con morfología "B" también fueron determinados como *B. bonariensis* y algunos ejemplares de morfología "A" y "C" figuran bajo el nombre específico de *B.*

*vesicalis*. Lo cual explica la gran cantidad de bibliografía con distintas interpretaciones respecto de su identificación y por lo tanto distribución, al utilizar como elemento único en la determinación de especies a la conchilla.

Respecto de *B. vesicalis* con *B. bonariensis*, como mencionamos previamente, se los separó sin inconvenientes desde el análisis cualitativo, no obstante mostraron un gran área solapada tanto mediante el ACP como los AD. Incluso un paralectotipo quedó mejor incluido en la morfología “A” de *B. bonariensis* distante del resto de los individuos, lo que probablemente llevó a algunos autores a considerar la posibilidad de que correspondieran a la misma especie. Debido a que el paralectotipo (NHMUK 1975396/b) puede ser fácilmente confundido con *B. bonariensis* y que el lectotipo (NHMUK 1975395) posee un aspecto muy particular no visto en otro ejemplar; la morfología conquiolar mayormente encontrada en el área de distribución estudiada es la correspondiente al ejemplar del paralectotipo NHMUK 1975396/a.

En el caso de *B. rushii* la variabilidad a nivel conquiolar no se observa a lo largo del área de distribución, sino que su variabilidad es entre poblaciones, en relación a la ubicación geográfica. El análisis morfométrico permitió identificar las variables que aportan a tal distinción siendo la longitud del espacio parietal y de la abertura las más importantes, seguida de la longitud de la espira. Las primeras dos variables se encuentran asociadas a la abertura, que en comparación con lo estudiado en otras especies permite plantear la hipótesis de que podría tratarse de una adaptación a la elevación del área geográfica en la que habite la población, lo cual podrá ponerse a prueba en estudios futuros ya que tales poblaciones, además, se ubican en ecorregiones distintas con climas diferentes. Respecto de la longitud de la espira, tal variación aún no se sustenta con una explicación en este sentido, sin embargo es una cuestión a seguir investigando debido a que esas diferencias también fueron apreciadas en otras especies por varios autores.

El contar con ejemplares de cada especie abarcando un amplio rango de dispersión geográfica permitió que, por un lado, se pudiera abordar el análisis morfométrico enfocado en las diferencias interespecíficas. De esta manera se pudo contribuir a la discriminación de las especies. Pero por otro lado, también permitió que se pudiera llevar adelante un estudio analizando las variaciones intraespecíficas, que en los *Bulimulus* argentinos hasta el momento no se había realizado.

En relación a la anatomía interna, se manifestaron una serie de diferencias que permitieron aportar caracteres a la descripción de cada especie. A nivel de los órganos del manto, la ubicación del corazón y de la cavidad pericárdica respecto del riñón fue diferente en las tres especies. A lo cual se sumó que *B. rushii* también posee un vaso

secundario del collar y un área pulmonar proporcionalmente mayor. Respecto del sistema digestivo, las principales diferencias se apreciaron en el bulbo bucal, ya que *B. rushii* presentó un mayor número de músculos en vista ventral y una morfología de las placas que conforman la mandíbula más cuadrangular. Por otra parte, en el sistema nervioso central entre *B. bonariensis* y *B. vesicalis* sólo se manifestó una sutil diferencia en la longitud del conectivo cerebro-pleural. Sin embargo, en *B. rushii* se observó una amplia fusión de los ganglios pleurales y pediales. También fue sustancial la diferencia a nivel del sistema reproductor, el cual es mucho más simple y menos conspicuo, con una estructura histológica del complejo peniano claramente diferente y básica sin divertículos penianos rodeando la luz del pene. Al comparar dicho sistema entre *B. bonariensis* y *B. vesicalis* las diferencias están dadas en el grosor del conducto de la bursa copulatrix y la morfología general e histológica del complejo peniano. Sin embargo, dentro de lo que considerábamos como *B. bonariensis* se sumó la presencia de siete complejos penianos detalladamente distintos al que poseen las muestras provenientes de Buenos Aires.

En cuanto a *B. bonariensis*, dada las morfologías manifiestas desde la estructura conquiolar, se plantearon durante el transcurso del desarrollo de la tesis una serie de interrogantes que sólo pudieron ser respondidas mediante análisis de la anatomía interna. No obstante, la información genética permitió consolidar lo observado desde el ángulo anatómico. Inicialmente, se pensó que cada morfología conquiolar correspondía a una especie diferente, luego se consideró la existencia de plasticidad fenotípica y correspondencia a una misma especie. Sin embargo, debido a que en distintas morfologías conquiolares se observó la misma configuración de complejo peniano se comprendió que cada una de esas morfologías corresponde a un morfotipo diferente, por lo tanto, lo interpretado como *B. bonariensis*, es un conjunto de varias especies que comparten la misma variabilidad o plasticidad fenotípica. Aunque para *B. bonariensis* se podría postular que la variabilidad observada podría deberse al hábitat, dicha variabilidad se manifestó en todo el rango de distribución trabajado e incluso se observaron las tres morfologías en las mismas localidades. Por lo tanto, se puede concluir que en este complejo de especies hay varios factores que podrían estar actuando en conjunto, por un lado en las distintas poblaciones se observó una plasticidad en este sentido que se manifestó en las tres morfologías y por otro lado hay un efecto que podría deberse a un fenómeno de conservación del carácter, donde la diferenciación específica aún no se manifestó a nivel de la conchilla y es por este motivo que se pueden encontrar morfologías altamente semejantes en distintas localidades; o por evolución paralela, aunque determinar lo dicho excedía a los objetivos de esta tesis quedan planteados para estudios futuros. De una u otra manera se puede concluir que desde el ángulo

conquiológico estamos en presencia de un complejo formado por varias especies, las cuales podemos describir como crípticas desde el análisis de la morfología conquiolar. Formando parte de este complejo de especies también estaría *B. vesicalis* por el alto grado de solapamiento en el análisis morfométrico. De esta manera, como mencionamos previamente entre *B. bonariensis* y *B. vesicalis* la identificación cualitativa a nivel conquiolar es la más apropiada. Sin embargo, adicionando ahora los caracteres anatómicos y de secuencias se dispone de mayor cantidad de elementos que permiten tal distinción. Por otra parte, el análisis de las partes blandas permitió comprender que en ejemplares cuya morfología sea comparable a las llamadas “A”, “B” o “C”, deben ser estudiadas y analizadas mediante un análisis anatómico y/o genético ya que sólo desde este ángulo podrán ser diferenciadas. En este sentido, se destaca que la evidencia presentada en el transcurso del desarrollo de la presente tesis, muestra que para la delimitación de especies es crucial el análisis de sus partes blandas. Por lo cual, se debe traer a primer plano lo propuesto por los investigadores que en el pasado trataron el tema, los cuales siempre manifestaron la urgente necesidad de estudios anatómicos.

Con los resultados obtenidos, ahora debemos plantearnos si en el desarrollo de la lista sinonímica hay alguna especie cuya identidad tenga existencia real en la naturaleza, por lo tanto deba ser revalidada y que haya quedado incluida dentro de lo que considerábamos *B. bonariensis*. Es altamente probable que esto sea así, sin embargo al no disponer de información anatómica en la descripción de muchas de las especies mencionadas en la sinonimia hace que sea casi imposible establecer una correspondencia entre dichos nombres específicos y determinada anatomía. Sin embargo, si quedan restos de tejido dentro de las conchillas podría ser factible hacer un perfil genético y de esta manera diferenciarlas. Otro punto a considerar es que entre los lotes analizados a nivel geográfico quedan zonas donde no se obtuvo material, por lo cual es altamente probable que existan en la naturaleza muchas más especies de las que se pudieron dar a conocer en la presente tesis. A lo cual se adiciona que se encontraron ejemplares en simpatria, lo que también contribuyó a oscurecer el entendimiento de este grupo solo por análisis conquiolar, sobre todo teniendo en cuenta que ahora conocemos que son especies que comparten variabilidad en ese nivel de estudio.

Por lo antes expuesto, se puede concluir que las diferencias interespecíficas observadas en caracteres morfológicos externos, a nivel conquiolar, revalidan parcialmente las entidades catalogadas por Cuezco et al. (2013) ya que las diferencias intraespecíficas manifiestas en el estudio anatómico no acompañan esta premisa, siendo en este sentido un grupo de especies sólo diferenciables por estas características. Al mismo tiempo, las diferencias a nivel molecular observadas en los genes COI y 16S ARNr,

mediante el análisis de las distancias genéticas, reconstrucciones filogenéticas y con la aplicación de métodos de delimitación de especie como lo son ABGD y  $\kappa/\theta$  sólo acompañan a las variaciones anatómicas intra e interespecíficas, no a las morfo-anatómicas (incluyendo la conchilla) como se había planteado inicialmente en la hipótesis.

En relación a la segunda parte de la presente tesis, se realizó por un lado el estudio a nivel poblacional en laboratorio tomando a *B. bonariensis* como especie modelo. De esta manera, fue posible realizar el seguimiento de un ciclo de vida completo de toda una cohorte. A la vez, se pudo calcular el promedio de huevos por puesta (44) y establecer su tiempo de desarrollo en 14 días. Cabe destacar que la tasa de natalidad fue de casi un 42 % y de ese porcentaje casi la mitad pereció durante los primeros 50 días del seguimiento, por lo tanto sólo alrededor de  $\frac{1}{4}$  de los huevos producidos eclosionan y superan los 50 días de vida. De esta manera, presentan una curva de supervivencia tipo III, con alta mortalidad temprana y una esperanza de vida de entre dos y tres años. Por otra parte, mediante el seguimiento de la cohorte y análisis de la misma tanto de forma general como de cada grupo procedente de una puesta individual, fue posible establecer el modelo de crecimiento siendo el logístico el de mejor ajuste.

Mediante el estudio de una población natural, fue factible obtener muestras durante el transcurso de dos años. De esta manera y por medio del análisis histológico de la gónada, se pudieron reconocer características respecto de la ubicación de los distintos tipos celulares en los folículos. Además de peculiaridades biológicas, ya que en el comienzo de su desarrollo son hermafroditas protoginios y luego de alcanzar la madurez gonadal se convierten en hermafroditas simultáneos, también se pudo determinar que es una especie iterópara. Por otra parte, se identificaron tres períodos: el de reclutamiento que da inicio en invierno pero es el principal evento en primavera; pos-reclutamiento en verano donde se evidenció la ausencia de descanso gonadal. Y pre-reclutamiento en otoño, en el cual se observó reabsorción además de abundantes espermatoцитos primarios, secundarios y ovocitos vitelogénicos en crecimiento. Al mismo tiempo, fue posible correlacionar el grado de desarrollo del espermioviducto con el estadio de desarrollo gonadal.

Por otro lado, se estableció, por medio de una regresión logística la longitud total de la conchilla a la cual alcanzan la madurez gonadal, la que se logra a los 12 mm, momento en el cual se observó una primera disminución de la tasa de crecimiento. Relacionando esta longitud con el estudio en laboratorio, se pudo deducir que dicho tamaño lo consiguen después de los 200 días de vida. Por lo tanto la primera maduración gamética se alcanza antes del año de vida. Para finalizar pudimos inferir que, como el

período reproductivo sucede en la siguiente primavera, época de reclutamiento, la primera reproducción es cuando alcanzan en promedio los 17 mm, al año de vida y es en este momento cuando hay un segundo descenso en la tasa de crecimiento. En ambos momentos de reducción de la tasa de crecimiento, en la primera madurez gonadal y primera reproducción, la asignación de los recursos se encuentra mayormente destinado a los eventos reproductivos.

De esta manera, la información obtenida en el desarrollo de la segunda parte de la tesis, tales como el modelo de crecimiento, época de reclutamiento, anatomía asociada a dicho período, longitud y edad a la cual alcanzan la madurez tanto gonadal como reproductiva son elementos de la historia de vida de *B. bonariensis* significativos al momento de tomar una decisión sobre la modalidad de control poblacional cuando se manifiestan explosiones demográficas. Aunque se deberán realizar estudios similares en los morfotipos o entidades que demostraron ser diferentes, desde el punto de vista anatómico y genético, respecto del *B. bonariensis* característico de Buenos Aires. Ahora se cuenta con información básica y comparable que puede ser comprendida como punto de partida para interpretar y de esta forma conocer la historia de vida de las demás entidades antes mencionadas.

## BIBLIOGRAFIA

- Adams, H. y Adams, A. (1858). *The genera of the recent Mollusca, arranged according to their organization*. J. van Voorst (Ed.), London. Vol. II. (Pp.: 661).
- Agudo, I. (1 de enero de 2019). Regional malacology 2019 -field research in progress: natural hybridization evidence ??? [Imagen adjunta] [Publicación de estado]. Facebook.  
<https://www.facebook.com/groups/1722815421319504/posts/2195475117386863/>
- Albers, J. C. (1850). *Die Heliceen, nach natürlicher Verwandtschaft*. (Pp.: 262).
- Álvarez González, E., Pizá, J. y. Cazzaniga, N. J. (2019). Biología reproductiva del caracol terrestre exótico *Rumina decollata* (Linnaeus, 1758) (Stylommatophora: Subulinidae). [Resumen de Exposiciones libres. Biodiversidad, biogeografía y bioinvasiones]. En: *3º Congreso Argentino de Malacología*. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.  
<https://www.gecemac.bbf.uns.edu.ar/archivos/3CAM%20-%20Libro%20de%20Res%C3%BAmenes%20Preliminar.pdf>
- Ancey, C. M. F. (1897). Viaggio del Dott. Alfredo Borelli nel Chaco boliviano e nella Republica Argentina. XI. Resultats malacologiques accompagnés d'une notice sur les especes précédemment recueillis par ce voyageour. *Bolletín Museo Zoología Anatomía Comparada Universidad Torino*. 12: 1-22.
- Ancey, C. M. F. (1901 a.). Notes sur divers mollusques de l'Amérique du Sud accompagnées de descriptions d'espèces nouvelles. *Le Naturaliste*. 338: 81-82.
- Ancey, C. M. F. (1901 b.). Notes sur divers mollusques de l'Amérique du Sud. *Le Naturaliste*. 338: 92-93.
- Armiñana García, R., Fimia Duarte, R. y Iannacone, J. (2020). *Todo o casi todo del Caracol Gigante Africano*. Editorial Universitaria. (Pp.: 49).
- Averbuj, A., Bigatti, G., Penchaszadeh, P. E. (2010). Gametogenic cycle and size at first maturity of the Patagonic edible snail *Buccinanops cochlidium* from Argentina. *Marine Biology*. 157: 2229-2240.
- Averbuj, A., Escati-Peñaloza, G. y Penchaszadeh, P. E. (2015). Individual growth in the patagonian gastropod *Buccinanops Cochlidium* (Nassariidae): a field tagging-recapture experiment. *Malacologia*. 59(1): 121-133.

- Barbado, J. L. (2003). *Cría de caracoles y moluscos marinos*. Editorial Albatros. (Pp.:190).
- Baqueiro, E. y Stuardo, J. (1977). Observaciones sobre la biología, ecología y explotación de *Megapitaria aurantiaca* (Sow, 1831), *M. squalida* (Sow, 1835) y *Dosinia ponderosa* (Gray, 1838) (Bivalvia: Veneridae) de la Bahía de Zihuatanejo e Isla Ixtapa, Guerrero, México. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*. Universidad Nacional Autónoma de México 4: 161-208.
- Barker, G. M. (2001). Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. En G. M. Barker (Ed.), *The Biology of terrestrial molluscs*. 1-147.
- Barrada Beiras, D. M. (2003). Desarrollo de un modelo de predicción de actividad de la babosa *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) aplicable al control de plagas en zonas agrícolas de Galicia. [Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela]  
[https://www.usc.es/export9/sites/webinstitucional/gl/investigacion/grupos/malaterra/publicaciones/tesis/Tesis\\_Manuel\\_Barrada\\_Modelos.pdf](https://www.usc.es/export9/sites/webinstitucional/gl/investigacion/grupos/malaterra/publicaciones/tesis/Tesis_Manuel_Barrada_Modelos.pdf)
- Barrientos, Z. (2003). Aspectos básicos sobre la clasificación, recolección, toma de datos y conservación de los moluscos. *Revista de Biología Tropical*. 51(3): 13-30.
- Beiley, S. E. R. (1981). Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *Journal of Comparative Physiology*. 142: 89-94.
- Benbellil-Tafoughalt, S. y Koene, J. M. (2015). Influence of season, temperature, and photoperiod on growth of the land snail *Helix aperta*. *Invertebrate Reproduction & Development*. 59(1): 37-43. doi: 10.1080/07924259.2014.996300.
- Bertalanffy, L. von. (1938). A quantitative theory of organic growth. *Human Biology*. 10(2) 181-213.
- Bigatti, G., Penchaszadeh, P. E., Cledón, M. (2007). Age and growth in *Odontocymbiola magellanica* (Gastropoda: Volutidae) from Golfo Nuevo, Patagonia, Argentina. *Marine Biology*. 150: 1199-1204.
- Birky, C. W. Jr. (2013). Species detection and identification in sexual organisms using population genetic theory and DNA sequences. *Plos One*. 8(1): e52544. doi:10.1371/journal.pone.0052544
- Borda, V. y Ramirez, R. (2014). Análisis morfométrico para la discriminación de especies: el caso del complejo *Megalobulimus leucostoma*. *Revista peruana de biología*. 21(2): 117-124. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v21i2.9814>

- Bouchet, P., Frýda, J., Hausdorf, B., Ponder, W., Valdés, Á. y Warén, A. (2005). Working classification of the Gastropoda. *Malacologia*. 47: 239-283.
- Bouchet, P., Rocroi, J. P., Hausdorf, B., Kaim, A., Kano, Y., Nützel, A., Parkhaev, P., Schrödl, M. y Strong, E. E. (2017). Revised Classification, Nomenclator and Typification of Gastropod and Monoplacophoran Families. *Malacologia*. 61(1-2): 1-526. doi:10.4002/040.061.0201
- Brescia, F. M., Pöllabauer, C. M., Potter, M. A. y Robertson, A. W. (2008). A review of the ecology and conservation of *Placostylus* (Mollusca: Gastropoda: Bulimulidae) in New Caledonia. *Molluscan Research*. 28(2): 111-122.
- Breure, A. S. H. (1974). Caribbean land Molluscs: Bulimulidae I. *Bulimulus*. *Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands*. 145: 2-80.
- Breure, A. S. H. (1975). Caribbean land Molluscs: Bulimulidae II. *Plekocheilus and Naesiotus*. *Studies on the Fauna of Curaçao and other Caribbean Islands*. 152: 71-93.
- Breure, A. S. H. (1976). Notes on Bulimulidae (Gastropoda, Euthyneura), *Bulimulus trinidadensis*, sp. n. from Ilha da Trindade, Brazil. *Basteria*. 40: 3-6.
- Breure, A. S. H. (1977). Systematic research on the family of land snails Bulimulidae. *Reports o Research Projects*. 41-43.
- Breure, A. S. H. (1978). Notes on and descriptions of Bulimulidae (Mollusca, Gastropoda). *Zoologische Verhandelingen*. 164: 1-255.
- Breure, A. S. H. (1979). Systematics, phylogeny and zoogeography of Bulimulinae (Mollusca). *Zoologische Verhandelingen*. 168: 1-229.
- Breure, A. S. H. (2008). Mysterious or confusing: enigmatic species in the Orthalicidae (Gastropoda, Pulmonata). *Basteria*. 72: 241-252.
- Breure, A. S. H. (2012). The status of the genus *Bostryx* Troschel, 1847, with description of a new subfamily (Mollusca, Gastropoda, Bulimulidae). *ZooKeys*. 216: 1-3. doi: 10.3897/zookeys.216.3646
- Breure, A. S. H. (Febrero de 2016 a). *Bulimulus* as world travelers. *Bram's snailblog*. <https://breure.wordpress.com/2016/02/>
- Breure, A. S. H. (2016 b). Caribbean *Bulimulus* revisited: physical moves and molecular traces (Mollusca, Gastropoda, Bulimulidae). *PeerJ* 4:e1836; DOI 10.7717/peerj.1836

- Breure, A. S. H. (2019). Land snails. Chapter 11. En V. Rull, T. Vegas-Vilarrúbia, O. Huber y C. Señaris, *Biodiversity of pantepui. The pristine "lost world" of the neotropical Guiana Highlands*. (Pp.: 247-261).
- Breure, A. S. H. y Ablett, J. D. (2014). Annotated type catalogue of the Bulimulidae (Mollusca, Gastropoda, Orthalicoidea) in the Natural History Museum, London. *ZooKeys*. 392: 1-367. doi: 10.3897/zookeys.392.6328
- Breure, A. S. H. y Araujo, R. (2017). The Neotropical land snails (Mollusca, Gastropoda) collected by the 'Comisión Científica del Pacífico'. *PeerJ*. 5:e3065. DOI 10.7717/peerj.3065
- Breure, A. S. H. y Coppois, G. (1978). Notes on the genus *Naesiotus* Albers, 1850 (Mollusca, Gastropoda, Bulimulidae)1. *Netherlands Journal of Zoology*. 28(2): 161-192.
- Breure, A. S. H. y Eskens, A. A. C. (1981). Notes on and descriptions of Bulimulidae (Mollusca, Gastropoda). *Zoologische Verhandelingen*. 186: 1-111.
- Breure, A. S. H., Groenenberg, D. S. J. y Schilthuizen, M. (2010). New insights in the phylogenetic relations within the Orthalicoidea (Gastropoda, Stylommatophora) based on 28S sequence data. *Bacteria*. 74 (1-3): 25-31.
- Breure, A. S. H. y Romero P. E. (2012). Support and surprises: molecular phylogeny of the land snail superfamily Orthalicoidea using a three-locus gene analysis with a divergence time analysis and ancestral area reconstruction (Gastropoda: Stylommatophora). *Archiv für Molluskenkunde*. 141 (1): 1-20.
- Breure, A. S. H. y Schouten, J. R. (1985). Notes on and descriptions of Bulimulidae (Mollusca, Gastropoda), III. *Zoologische Verhandelingen*. 216(1): 1-98.
- Brey, T. (1999). Growth performance and mortality in aquatic macrobenthic invertebrates. *Advances in Marine Biology*. 35: 153-223.
- Brey, T. (2001). *Population dynamics in benthic invertebrates*. A virtual handbook v o 1 .2 <http://www.thomas-brey.de/science/virtualhandbook/main7.html>
- Brody, S. (1945). *Bioenergetics and growth*. New York: Hafner. (Pp.: 1023).
- Cabrera, F., Breure, A. S. H., Norbis, W., y Martínez, S. (2021). Description of a new Late Cretaceous species of *Bulimulus* Leach, 1814 (Orthalicoidea: Bulimulidae) using geometric morphometric analysis. *Journal of Molluscan Studies*. 87: eyab006. doi:10.1093/mollus/eyab006

- Camacho, H. H. y del Río, C. J. (2008). Gastropoda. Tomo I. Capítulo 12. En H. H. Camacho Editor (Ed.), *Los Invertebrados Fósiles* (pp: 323-376). Fundación de Historia Natural Félix de Azara. ISBN 978-987-22121-7-9.
- Carreón-Palau, L., Uria-Galicia, E., Espinosa-Chávez, F. y Martínez-Jerónimo, F. (2003). Desarrollo morfológico e histológico del sistema reproductor de *Pomacea patula catemacensis* (Baker 1922) (Mollusca, Caenogastropoda: Ampullariidae). *Revista Chilena de Historia Natural*. 76: 665-680.
- Carvalho, C., Almeida Bessa, E. C. y D'ávila, S. (2008). Life history strategy of *Bradybaena similaris* (Fèrussac, 1821) (Mollusca, Pulmonata, Bradybaenidae). *Molluscan Research*. 28(3): 171-174.
- Carvalho, C., Silva, J. P., Lafeté Furtado Mendonça, C., Almeida Bessa, E. C. y D'ávila, S. (2009). Life history strategy of *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata, Subulinidae). *Invertebrate Reproduction and Development*. 53(4): 211-222.
- Carvalho da Silva, E. y Omena, E. P. (2014). Population dynamics and reproductive biology of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) in Salvador Bahia. *Biota Neotropica*. 14(3): 1-11.
- Christensen, C. C. y Miller, W. B. (1975). Genital anatomy and phylogeny of the snails, *Berendtia* Crosse and Fischer and *Spartocentrum* Dall (Stylommatophora: Bulimulidae). *The Nautilus*. 89(2): 43-46.
- Clavijo, C. y Scarabino, F. (2013). 3. Moluscos continentales. En A. Soutullo, C. Clavijo y J. A. Martínez-Lanfranco (Eds.). *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*. (Pp.: 73-90).
- Clemente, N. L., Faberi, A. J., López, A. N., Manetti, P. L. y Álvarez Castillo, H. A. (2007). Biología de *Deroceras reticulatum* y *D. laeve*, moluscos de cultivos en siembra directa. *RIA Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 36(2): 129-142.
- Coppoïs, G. (1985). *Étude de la spéciation chez les Bulimulidae endémiques de l'archipel des Galapagos (Mollusques, Gasteropodes, Pulmonés)*. [Tesis de Doctorado, Faculté des Sciences. Université Libre, Bruxelles].
- Coppoïs, G. (1995). The vulnerability of "island" species threatened galapagos bulimulid land snails: an update. En E. A. Kay (Ed.), *The Conservation Biology of Molluscs*. (pp 8-11).

- Cuezzo, M. G. (1990). Maturation of the reproductive tract of *Neohelix major* (Binney) (Pulmonata: Polygyridae). *American Malacological Bulletin*. 8(1): 19-24.
- Cuezzo, M. G. (1993). Annual gonadal cycle of the land snail *Scutalus tupacii* (Pulmonata: Bulimulidae). *American Malacological Bulletin*. 10(2): 121-127.
- Cuezzo, M. G. (2011). Ultrastructure of spermatozoa in Orthalicidae (Mollusca, Gastropoda, Stylommatophora) and its systematic implications. *Zoomorphology*. 130:147-166. DOI 10.1007/s00435-011-0128-x
- Cuezzo, M. G., Miranda, M. J., & Ovando, X. M. C. (2013). Species catalogue of Orthalicoidea in Argentina (Gastropoda: Stylommatophora). *Malacologia*. 56(1-2): 135-191.
- D'ávila, S. y de Almeida Bessa, E. C. (2005). Influence of substrate on growth of *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), under laboratorial conditions. *Revista Brasileira de Zoologia*. 22(1):205-211. DOI:10.1590/S0101-81752005000100025
- Daguzan, J., Bonnet, J. C., Perrin, Y., Perrin, E. y Rouet, H. (1981). Contribution à l'élevage de l'escargot Petit-Gris: *Helix aspersa* Müller (Mollusque Gastéropode Pulmoné Stylommatophore). I. – Reproduction et éclosion des jeunes, en bâtiment et en conditions thermohygrométriques contrôlées. *Annales de Zootechnie*. INRA/EDP. *Sciences*. 30(2): 249-272.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9: 772.
- De Jong-Brink, M., Boer, H. H. y Joose, J. (1983). Mollusca. En K. G. y R. G. Adiyodi (Eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates*. (Vol. 1: Oogenesis, Oviposition and Oosorption) (pp.297-355). John Wiley & Sons Ltd.
- De Winter, A. J. y Gittenberger, E. (1998). The land snail fauna of a square kilometer patch of rainforest in southwestern Cameroon: high species richness, low abundance and seasonal fluctuations. *Malacologia*. 40(1-2): 231-250.
- Díaz, A. C., Beltramino, A. A., Vogler, R. E. y Martín, S. M. (2012). Morphometric analysis of *Bulimulus bonariensis bonariensis* (Rafinesque, 1833) and *Bulimulus bonariensis sporadicus* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Orthalicidae). [Resumen de Posters Session]. En: *XI International Congress on Medical and Applied Malacology*. Rio de Janeiro, Brasil.
- Díaz, A. C. y Martín, S. M. (2012). Crecimiento en laboratorio de *Bulimulus bonariensis bonariensis* (Rafinesque, 1833) (Gastropoda: Orthalicidae =Bulimulidae).

[Resumen de Ecología de Poblaciones y Comunidades]. En: *XI Jornadas de Ciencias Naturales del Litoral. III Reunión Argentina de Ciencias Naturales*. Córdoba, Argentina.

Díaz, A. C. y Martín, S. M. (2013). Aspectos morfo-histológicos del sistema reproductor de *Bulimulus bonariensis bonariensis* (Rafinesque, 1833) (Gastropoda, Orthalicidae). [Resumen de Exposiciones libres. 6. Morfología, sistemática, taxonomía, filogenia]. En: *1º Congreso Argentino de Malacología*. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

<http://malacoargentina.com.ar/blog/wp-content/uploads/2020/12/Libro-1-cam.pdf>

Díaz, A. C., Martín, S. M. y Rumi, A. (2019). Problemática taxonómica en relación a *Bulimulus bonariensis* (Rafinesque, 1833). [Resumen de Exposiciones libres. 2. Morfología, sistemática, taxonomía y filogenia]. En: *3º Congreso Argentino de Malacología*. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

<http://malacoargentina.com.ar/blog/wp-content/uploads/2020/12/Libro-3cam.pdf>

Doering, A. (1874). Molluscorum terrestrium et fluviatilium faunæ argentiæ enumeratio systematica. *Periódico Zoológico*. 1:120-128.

Doering, A. (1875). Apuntes sobre la fauna de moluscos de la República Argentina. Parte II. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias*. 2: 300-340.

Doering, A. (1879). Apuntes sobre la fauna de moluscos de la República Argentina. Parte III. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias*. (Pp.: 63).

d'Orbigny, A. (1835). Synopsis terrestrium et luviatilium molluscorum, in suo per Americam meridionalem itinere. *Magasin de Zoologie*. 5: 1-44.

d'Orbigny, A. (1834-1847). Voyage dans l'Amérique Méridionale (le Brésil, la République orientale de l' Uruguay, la République Argentine, la Patagonie, la République du Chili, la République de Bolivia, la République du Pérou), exécuté pendant les années 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832 et 1833. *Mollusques*. Chez C. P. Bertrand, Paris. 5(3): (pp.: 1-758).

Emberton, K. C. (1995). Land snail community morphologies of the highest diversity sites of Madagascar, North America, and New Zealand, with recommended alternatives to height diameter plots. *Malacologia*. 36: 43-66.

- Fernández, D. (1973). Catálogo de la malacofauna terrestre argentina. Monografías 4. *Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires*. (Pp.: 197).
- Fernández, D. y Castellanos, Z. A. (1973). Clave genérica de la malacofauna terrestre Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*. 11: 263-285.
- Ferreira, A. F., Frias Martins, A.M., Tristão da Cunha, R., Melo, P., y Rodrigues, A.R. (2012). Reproductive biology of *Oxychilus (Atlantoxychilus) spectabilis* (Milne-Edwards, 1885) (Gastropoda: Pulmonata): a gametogenic approach. *Arquipelago Life and Marine Sciences*. 30: 11-17.
- Figueiras, A. (1963). Enumeración sistemática de los moluscos terrestres del Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*. 1(4): 79-96.
- Fischer, P. y Crosse H. (1878). Études sur les mollusques terrestres et fluviátiles du Mexique et du Guatemala. En *Mission Scientifique au Mexique et dans l'Amérique centrale*. (Pp.:874).
- Fischer, P. (1887). *Manuel de conchyliologie et de paléontologie conchyliologique ou histoire naturelle des mollusques vivants et fossiles*. París. (Pp.: 1183).
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. y Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294-299.
- Fontaneto, D., Flot, J.F. y Tang, C. Q. (2015). Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. *Marine Biodiversity*. 453: 433-451.
- Fontanillas, J. C., García-Cuenca, I. y Pérez Fuentes, J. (1992). Biología de la reproducción del *Helix aspersa máxima*. *Mundo Ganadero*. 7/8: 36-38.
- Fontenelle, J. H. y Miranda. M. S. (2012). The use of outer lip in age estimation of *Megalobulimus paranaguensis* (Gastropoda, Pulmonata). *Strombus*. 19(1-2): 15-22.
- Formica Corsi, A. (1900) Moluscos de la República Oriental del Uruguay. *Anales del Museo Nacional de Montevideo*. 2: 291-525.
- Frana, J. y Massoni, F. (2007). Presencia de caracoles en un cultivo de soja. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. *Información Técnica cultivos de verano. Campaña 2007. Publicación Miscelánea N°108*. 162-166.

- Frana, J. y Massoni, F. (2011). Control de caracoles (*Bulimulus bonariensis bonariensis*) en soja. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. *Información Técnica cultivos de verano. Campaña 2011. Publicación Miscelánea N°121*. 124-128.
- Gabbott, P.A y Walker, A. J. M. (1971). Changes in the condition index and biochemical content of adult oysters (*Ostrea edulis*) maintained under hatchery conditions. *Journal du Conseil / Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Merl.* 34: 99-106.
- Gabe, M. (1968). *Techniques Histologiques*. Masson et Cie, Éditeurs.
- Gaitán-Espitia, J. D. y Nespolo, R. (2014). Is there metabolic cold adaptation in terrestrial ectotherms? Exploring latitudinal compensation in the invasive snail *Cornu aspersum*. *The Journal of Experimental Biology.* 217: 2261-2267 doi:10.1242/jeb.101261.
- García, A., Perea, J. M., Mayoral, A., Acero, R., Martos, J., Gómez, G. y Peña, F. (2006). Laboratory rearing conditions for improved growth of juvenile *Helix aspersa* Müller snails. *Laboratory Animals.* 40: 309-316.
- Giménez, J., Lasta, M., Bigatti, G., y Penchaszadeh, P. E. (2005). Exploitation of the volute snail *Zidona dufresnei* in argentine waters, southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Shellfish Research.* 24(4): 1135-1140.
- Gompertz, B. (1825). On the nature of the function expressive of the law of human mortality, and on a new mode of determining the value of life contingencies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 115: 513-583.
- Green, M. R. y Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. (Pp.: 2028).
- Griffond, B. y Bolzoni-Sungur, D. (1986). Stages of oogenesis in the snail, *Helix aspersa*: cytological, cytochemical and ultrastructural studies. *Reproduction Nutrition Development.* 26(2A): 461-474.
- Griffond, B. y Bride, J. (1987). Germinal and non-germinal lines in the ovotestis of *Helix aspersa*: a survey. *Roux's Archives of Developmental Biology.* 196: 113-118.
- Haddon, M., Mundy, C y Tarbath, D. (2008). Using an inverse-logistic model to describe growth increments of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) in Tasmania. *Fishery Bulletin.* 106(1):58-71.

- Hajibabaei, M., deWaard, J. R., Ivanova, N. V., Ratnasingham, S., Dooh, R. T., Kirk, S. L., Mackie, P. M. y Hebert, P. D. N. (2005). Critical factors for assembling a high volumen of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 360: 1959-1967.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. y Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*. 4(1): 9.
- Hausdorf, B. (2015). The supposed transcaucasian endemite *Adzharia renschi* Hesse, 1933 is a south american *Bulimulus* species (Gastropoda: Bulimulidae). *Malacologia*. 58(1-2): 363-364.
- Healy, J. M. (2001). Spermatogenesis and Oogenesis. En G. M. Barker (Ed.). *The Biology of Terrestrial Molluscs* (pp. 357-382). CABI Publishing Wallingford.
- Helidoniotis, F., Haddon, M., Tuck, G. y Tarbath, D. (2011). The relative suitability of the von Bertalanffy, Gompertz and inverse logistic models for describing growth in blacklip abalone populations (*Haliotis rubra*) in Tasmania, Australia. *Fisheries Research*. 112: 13-21.
- Heller, J. (1990). Longevity in molluscs. *Malacología*. 31(2): 259-295.
- Heller, J. (2001). Life History Strategies. En G. M. Barker (Ed.). *The Biology of Terrestrial Molluscs* (pp. 413-447). CABI Publishing Wallingford.
- Herbert, D. G. y Mitchell, A. (2009). Phylogenetic relationships of the enigmatic land snail genus *Prestonella*: the missing African element in the Gondwanan superfamily Orthalicoidea (Mollusca: Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society*. 96: 203-221.
- Hernandez-Llamas, A. y Ratkowsky, D.A. (2004). Growth of fishes, crustaceans and molluscs: estimation of the von Bertalanffy, Logistic, Gompertz and Richards curves and a new growth model. *Marine Ecology Progress Series*. 282: 237-244.
- Hidalgo, J. (1869). Moluscos del viaje al Pacífico verificado de 1862 a 1865 por una comisión de naturalistas enviada por el gobierno español. Primera parte univalvos terrestres. (pp: 152).

- Hines, J. (1951). *Anatomy and life cycle of the snail, Rumina decollata*. [Tesis de maestría, Texas Technological College]. <https://ttu-ir.tdl.org/bitstream/handle/2346/15798/31295015072944.pdf?sequence=1>
- Holmberg, E. L. (1909). Moluscos geophila Argentina nova. *Apuntes de Historia Natural*. 1: 9-12.
- Horn, A. C. M., Achaval, M. y Zancan, D. M. (2005). The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948) (Gastropoda, Pulmonata). *Brazilian Journal of Biology*. 65(3): 459-467.
- Holznagel, W. (1998). A nondestructive method for cleaning gastropod radulae from frozen, alcohol-fixed, or dried material. *American Malacological Bulletin*. 14: 181-183.
- Hylton Scott, M. I. (1948). Moluscos del biotopo de Cerro Colorado (Salta). *Acta Zoológica Lilloana*. 6: 229 -239.
- Hylton Scott, M. I. (1951). *Kuschelenia*, nuevo género de Bulimulidae. *Acta Zoológica Lilloana*. 12: 539-543.
- Hylton Scott, M. I. (1953). Una nueva especie de *Bostryx* (Bulimulidae) (Mol. Pulm.). *Physis*. 20(59): 409-413.
- Hylton Scott, M. I. (1965). Anotaciones sobre los moluscos de Chancani-Cordoba (Gastrópoda, Pulmonata). *Neotropica*. 11(34): 23-26.
- Hylton Scott, M. I. (1967). Un nuevo subgénero de *Bulimulus*. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*. 2 (13): 89-93.
- James, A. F., Brown, R., Weston, K. A. y Walker, K. (2013) Modelling the growth and population dynamics of the exiled Stockton coal plateau landsnail, *Powelliphanta augusta*. *New Zealand Journal of Zoology*. 40(3): 175-185.  
DOI:10.1080/03014223.2012.723012.
- Jaramillo Roldán, E., López Martínez, J., Ramírez, R. y Velásquez Trujillo, L. E. (2014) Morphological analysis of the reproductive system and molecular identification by mitochondrial markers COI and 16S rRNA of *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Strophocheilidae) of Colombia. *Revista Peruana de Biología*. 21(1): 79-88.
- Juchno, D. (1999). *Gonad of Helix pomatia in anual cycle*. [Resumen]. 15th Polish Malacological Seminar, Łódz. *Folia Malacologica*. 7(4): 261-274.

- Jukes, T. H. y Cantor, C. R. (1969). Evolution of protein molecules. Munro H. N. (Ed.) *Mammalian protein metabolism*, III. New York: Academic Press. pp. 21-132.
- Karkach, A. S. (2006). Trajectories and models of individual growth. *Demographic Research*. 15(12): 347-400.
- Katoh, K. y Standley, D. M.(2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 772-780.
- Köhler, F. y Johnson, M. S. (2012). Species limits in molecular phylogenies: a cautionary tale from Australian land snails (Camaenidae: *Amplirhagada* Iredale, 1933). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 165: 337-362.
- Koralewska-Batura, E. (1999). *Helix lutescens* Rossmässler, 1837 (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae) – its structure, biology and ecology. *Folia Malacologica*. 7(4): 197-240.
- Kraemer, A. C., Philip, C. W., Rankin, A. M. y Parent, C. E. (2019). Trade-offs direct the evolution of coloration in Galápagos land snails. *Proceedings Royal Society*. 286: 20182278. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2018.2278>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 1547-1549.
- Küster, H. C. y Pfeiffer, L. (1840-1865). Die Bulimiden und Achatinen. Abbildungen nach der Natur. Die Gattungen *Bulimus*, *Partula*, *Achatinella*, *Achatina* und *Azeca*. En von Martini y Chemnitz, *Systematisches Conchylien-Cabinet*. Nürnberg. 1(13): (Pp.: 395).
- Lanzieri, P. D. y de Rezende, H. E. B. (1965). Estudos anatômicos e histológicos, principalmente do aparelho genital de *Bulimulus corumbaensis* Pilsbry, 1897:(Gastropoda, Pulmonata, Bulimulidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 63, 179-205.
- Larkin, M. A, Blackshields, G., Brown, N. P, Chenna, R., McGettigan, P. A, McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. y Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.
- Leach, W. E. (1814). *The zoological miscellany: being descriptions of new, or interesting animals*. (I. Pp.: 152).

- Lind, H. (1973). The functional significance of the spermatophore and the fate of spermatozoa in the genital tract of *Helix pomatia* (Gastropoda: Stylommatophora). *Journal of Zoology, London*. 169: 39-64.
- Lindberg, D. R., Ponder, W. F. y Haszprunar, G. (2004). The Mollusca: Relationships and Patterns from their first half- billion years. En J. Cracraft y M. J. Donoghue (Ed.), *Assembling the Tree of Life*. (Pp: 575).
- López, F. y Pino, J. (1998). Análisis morfohistológico del sistema reproductor de *Bostryx conspersus* (Sowerby, 1833) (Gastropoda, Bulimulidae) de las lomas de Pacta. Lima, Perú. *Revista peruana de Biología*. 5(2): 138-143.
- López Soriano, J. (2004). Técnicas de biología molecular aplicadas a la taxonomía y filogenia de moluscos. *Spira*. 1(4): 23-33.
- Luchtel, D. (1972). Gonadal Development and Sex Determination in Pulmonate Molluscs. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. 130: 279-301.
- Lydeard, C., Cowie, R. H., Ponder, W. F., Bogan, A. E., Bouchet, P., Clark, S. A., Cummings, K. S., Frest, T. J., Gargominy, O., Herbert, D. G., Hershler, H., Perez, K. E., Roth, B., Seddon, M., Strong, E. E. y Thompson, F. G. (2004). The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*. 54: 321-330.
- Maltz, T. K. (2003). Reproductive system development and annual cycle of gonad activity in *Helicodonta obvoluta* (o. f. Müller, 1774) (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae s. lat.). *Folia Malacologica*. 11(1/2): 23-31.
- Maltz, T. K. y Sulikowska-Drozd, A. (2008). Life cycles of clausiliids of Poland - knowns and unknowns. *Annales Zoologici*. 58(4): 857-880.
- Maltz, T. K. y Sulikowska-Drozd, A. (2010) Circannual gonad activity in two species of the genus *Vestia* P. Hesse (Gastropoda: Pulmonata: Clausiliidae). *Annales Zoologici*. 60(3): 469-480.
- Martínez Lage, A. y González Tizón, A. (2004). Aplicaciones de la bioinformática en la elaboración de filogenias moleculares. En: Fundación Alfredo Brañas (ed). *Bioinformática*. Universidade da Coruña, Santiago de Compostela, España. (Pp.: 53-82).
- Mazurkiewicz, M. y Pokryszko, B. M. (2005). Gametogenic cycle in *Vertigo pusilla* o. f. Müller, 1774 (Gastropoda: Pulmonata: Vertiginidae). *Folia Malacologica*. 13(1): 43-47.

- Meireles, L. M. O., Silva, L. C., Junqueira, F. O. y Almeida Bessa, E. C. (2008). The influence of diet and isolation on growth and survival in the land snail *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca: Bulimulidae) in laboratory. *Revista Brasileira de Zoologia*. 25 (2): 224-227.
- Meireles, L. M. O., Silva, L. C., Junqueira, F. O., Santos Lopes, J. F Almeida Bessa, E. C. (2010). Influência da densidade populacional sobre crescimento e fecundidade de *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae). *Revista Brasileira de Zootecias*. 12 (1): 51-58.
- Mínguez, F. S. (2016). *Procesos de difusión Logístico y Gompertz. Métodos numéricos clásicos en la estimación paramétrica*. [Trabajo fin de máster, Universidad de Granada].  
[https://masteres.ugr.es/moea/pages/curso201516/tfm1516/simon\\_minguez\\_tfm](https://masteres.ugr.es/moea/pages/curso201516/tfm1516/simon_minguez_tfm)
- Miquel, S. E. (1989 a). El género *Drymaeus* Albers, 1850 (Gastropoda, Stylommatophora, Bulimulidae) en la República Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 24(2): 75-86.
- Miquel, S. E. (1989 b). Las especies vivientes del género *Naesiotus* Albers, 1850 (Gastropoda, Stylommatophora, Bulimulidae) en la República Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 24(2): 61-73. DOI: 10.1080/01650528909360777
- Miquel, S. E. (1991). El género *Bulimulus* Leach, 1814 (Mollusca, Gastropoda, Stylommatophora) en la República Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 26: 93-112.
- Miquel, S. E. (1993). Las especies del género *Bostryx* Troschel, 1847 en la República Argentina (1ra. parte) (Gastropoda Stylommatophora: Bulimulidae). *Archiv für Molluskenkunde*. 121(1/6): 157-171.
- Miquel, S. E. (1995). Las especies del género *Bostryx* Troschel, 1847 en la República Argentina (2da. y última parte) (Gastropoda: Pulmonata: Bulimulidae). *Archiv für Molluskenkunde*. 124(1/2): 119-127.
- Miquel, S. E. (1998). Redescription of Argentinean species of the genera *Discoleus*, *Plectostylus*, *Scutalus* and *Simpulopsis* (Gastropoda, Stylommatophora, Bulimulidae). *Studies on Neotropical Fauna & Environment*. 33: 178-187.
- Miranda, M. J. (2014). *Bostryx tortoranus* (Doering, 1879) species complex (Gastropoda: Stylommatophora: Bulimulidae), a review of taxonomy and

- distribution of endemic species from Argentina. *Journal of Natural History*.  
<http://dx.doi.org/10.1080/00222933.2014.981313>
- Miranda, M. J. (2015). The genus *Bostryx* in central western Argentina: anatomical and distributional description of four of its southernmost species (Gastropoda, Bulimulidae). *Iheringia, Série Zoologia*. 105(4): 484-498. DOI: 10.1590/1678-476620151054484498
- Miranda, M. J. (2016). Cladistic analysis of the Argentinian species of the genus *Bostryx* (Gastropoda, Stylommatophora) based on morphological evidence. *Papéis Avulsos de Zoologia*. 56(10): 109-133.
- Miranda, M. J. (2020). Anatomy and shell shape variability in a land snail *Bostryx torallyi* (Stylommatophora: Bulimulidae). *Revista de Biología Tropical*. 68(1): 218-229.
- Miranda, M. J. y Cuezco, M. G. (2010). Biodiversidad de gasterópodos terrestres (Mollusca) en el Parque Biológico Sierra de San Javier, Tucumán, Argentina. *Revista de Biología Tropical*. 58 (3): 1009-1029.
- Miranda, M. J. y Cuezco, M. G. (2014). Taxonomic revision of the *Bostryx stelzneri* species complex, with description of a new species (Gastropoda: Orthalicoidea: Bulimulidae). *American Malacology Bulletin*. 32(1): 74-93.
- MolluscaBase eds. (2021). *MolluscaBase*. Accessed at <http://www.molluscabase.org> on 2021-05-05. doi:10.14284/448
- Nei, M. y Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York, USA. (Pp.: 385).
- Neubert, E. y Janssen, R. (2004). Die Typen und Typoide des Natur-Museums Senckenberg, 84 (Mollusca: Gastropoda: Pulmonata: Orthalicoidea: Bulimulidae (2), Orthalicipidae, Placostylidae). *Archiv für Molluskenkunde*. 133: 193-297.
- Ngowsiri, U., Sertarugsa, P., Sobhon, P., Kruatrachue, M., Chavadej, J. y Upatham, E. S. (1989). Development of, and seasonal changes in, the reproductive system of *Achatina fulica*. *Research Articles. Journal of The Science Society of Thailand*. 15: 237-249.
- Nicolai, A., Filser, J., Lenz, R., Briand, V. y Charrier M. (2010). The contrasted effects of body stores on partial capital breeding in the land snail *Cornu aspersum*. In Nicolai, A.: *The impact of diet treatment on reproduction and thermophysiological processes in the land snails Cornu aspersum and Helix*

*pomatia*. [Tesis Doctoral, Universidad de Bremen]. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00525296>

Noticias La Región (18 de febrero de 2013). *Productores yerbateros de Apóstoles expresaron su preocupación por la invasión de caracoles en plantaciones de la zona sur*.

[http://www.noticiaslaregion.com.ar/index.php?option=com\\_k2&view=item&id=1365:productores-yerbateros-de-ap%C3%B3stoles-expresaron-su-preocupacci%C3%B3n-por-la-invasi%C3%B3n-de-caracoles-en-plantaciones-de-la-zona-sur&Itemid=199](http://www.noticiaslaregion.com.ar/index.php?option=com_k2&view=item&id=1365:productores-yerbateros-de-ap%C3%B3stoles-expresaron-su-preocupacci%C3%B3n-por-la-invasi%C3%B3n-de-caracoles-en-plantaciones-de-la-zona-sur&Itemid=199)

Ovando, X. M.C., Miranda, M. J., Loyolad, R. y Cuezco, M. G. (2019). Identifying priority areas for invertebrate conservation using land snails as models. *Journal for Nature Conservation*. 50 125707. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2019.04.004>

Parent, C. E. (2008). *Diversification on islands: Bulimulid land snails of Galápagos*. [Tesis de Doctorado, Simon Fraser University].

Parent, C. E. (2012). Biogeographical and ecological determinants of land snail diversification on islands. *American Malacological Bulletin*. 30(1): 207-215.

Parent, C. E. y Crespi, B. J. (2006). Sequential colonization and diversification of Galápagos endemic land snail genus *Bulimulus* (Gastropoda, Stylommatophora). *Evolution*. 60(11): 2311–2328.

Parent, C. E. y Crespi, B. J. (2009). Notes and Comments. Ecological Opportunity in Adaptive Radiation of Galápagos Endemic Land Snails. *The American Naturalist*. 174(6): 898-905. <http://www.jstor.org/stable/10.1086/646604>.

Parivar, K. (1978). A histological survey of gonadal development in *Arion ater* L. (Mollusca, Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies*. 44: 250-264.

Parodiz, J. J. (1944). Contribuciones al conocimiento de los moluscos terrestres sudamericanos, I. *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*. 1(8): 1-9.

Parodiz, J. J. (1946). Los géneros de los Bulimulinae Argentinos. *Revista del Museo de La Plata*. Sección Zoología. 4(30): 303–371.

Parodiz, J. J. (1947). Contribuciones al conocimiento de los moluscos terrestres Sudamericanos. V. *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*. 2: 1-32.

Parodiz, J. J. (1951). Métodos de conculiometría. *Physis*. 20(58): 241-248.

- Parodiz, J. J. (1957). Catalogue of the land Mollusca of Argentina. *The Nautilus*. 70: 127-135.
- Parodiz, J. J. (1962). New and little-known species of South and Central American land snails (Bulimulidae). *Proceedings of the United States National Museum*. 113(3462): 429-456.
- Parravicini, G. (1894). Viaggio del Dottor Alfredo Borelli nella República Argentina e nel Paraguay. IV. Molluschi. *Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia comparata della R. Università di Torino*. 9: 1-10.
- Pauly, D. y Munro, J. L. (1984) Once more on the comparison of growth in fish and invertebrates. ICLARM. *Fishbyte*. 2: 21.
- Peralta, R. (7 de septiembre de 2016). *Plagas en garbanzo y pautas de manejo*. Agrovov. Agricultura. <http://agrovov.lavoz.com.ar/agricultura/pautas-de-manejo-para-plagas-en-garbanzo>
- Pérez Zeballos, J. y García Moreno, Ana. (2009). Modelos adaptativos en Zoología (Manual de prácticas) 10. Estudio anatómico y funcional de un gasterópodo y un cefalópodo. *Reduca (Biología)*. Serie Zoología. 2(2): 142-157.
- Pfeiffer, L. (1846). Description of thirty new species of Helicea in the collection of H. Cuming Esq. *Proceedings of the Zoological Society of London*. (14): 28-34.
- Pfeiffer, L. (1853). Monographia heliceorum viventium. Sistens descriptiones systematicas et criticas omnium huius familiae generum et specierum hodie cognitarum. *Brockhaus, Lipsiae*. 3: (Pp.: 711).
- Pfeiffer, L. (1854). *Malakozoologische Blätter*. Cassel. (Pp.: 264).
- Pilsbry, H. A. (1895-1896). American bulimi and bulimuli. *Strophocheilus, Plekocheilus, Auris, Bulimulus*. Manual of Conchology. 10: *Academy of Natural Sciences, of Philadelphia*. (Pp.: 332).
- Pilsbry, H. A. (1897). Description of new South American bulimuli. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 49: 18-22.
- Pilsbry, H. A. (1897-1898). American Bulimulidae: *Bulimulus, Neopetraeus, Oxychona* and South American *Drymaeus*. Volume XI. Manual of Conchology, Second Series: Pulmonata. Conchological Section. *Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. (Pp.: 339).
- Pilsbry, H. A. (1901-1902). Manual of Conchology, structural and systematic. Second Series: Pulmonata. *Academy of Natural Sciences of Philadelphia*. 14: 302 pp.

- Ponder, W. F., Colgan, D. J., Healy, J., Nützel, A., Simone, L. R. L. y Strong, E. E. (2008). Caenogastropod phylogeny. En *Molluscan phylogeny*. (Pp.:331-383).
- Preston, H. B. (1907). Descriptions of new species of land and freshwater shells from Central and South America. *Annals Magazine of Natural History*. 20: 490-498.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. y Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*. 21: 1864-1877.
- Quintana, M. (1982). Catálogo preliminar de la malacofauna del Paraguay. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"*. Zoología. 11(3): 61-158.
- Rabinovich, J. E. (1980). Mortalidad y tablas de vida. En J. E. Rabinovich (Ed.), *Introducción a la ecología de poblaciones animales* (pp.: 105-135). Editorial CECSA.
- Rafinesque, C. S. (1833). New genera of land shells from Buenos Aires, South America. *Atlantic Journal and Friend of Knowledge*. 5: 1-212.
- Ramírez, R. (1988). Morfología y biología de *Bostryx conspersus* (Sowerby) (Mollusca, Bulimulidae) en las lomas costeras del Perú central. *Revista Brasileira de Zoología*. 5(4): 609-617.
- Ramírez, J. L. y Ramírez, R. (2013). Molecular evidence for the polyphyly of *Bostryx* (Gastropoda: Bulimulidae) and genetic diversity of *Bostryx aguilari*. *Zoologia*. 30(1): 80-87. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702013000100010>
- Reeve, L. A. (1849). *Monograph of the genus Bulimus. Conchologia iconica illustrations shells of molluscos animals*. 5: (Pp.: 648).
- Rengifo Vásquez, A. P., Padilla Pérez, P. y Mori Pinedo L. (2004). Caracterización morfológica del "congompe" *Megalobulimus maximus* (Sowerby, 1825) y posibilidades de su cultivo, Iquitos, Perú. *Memorias: Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonia y Latinoamérica*. (Pp.: 269-275).
- Rezende, H. E. B. y Lanzieri P. D. (1964). Observações anatômicas e histológicas sobre o órgão copulador masculino de "*Bulimulus tenuissimus*" (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Bulimulidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 24(4): 409-415.

- Rezende, H. E. B. (1967). *Contribuição ao conhecimento dos bulimúlídeos, especialmente de Drymaeus papyraceus (Mawe, 1823)*. [Tesis de Doctorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro].
- Richardson, C. L. (1995): Bulimulidae: catalog of species. *Tryonia*. 28: 1-458.
- Richardson, C. A., Kingsley-Smith, P. R., Seed, R. y Chatzinikolaou, E. (2005). Age and growth of the naticid gastropod *Polinices pulchellus* (Gastropoda: Naticidae) based on length frequency analysis and statolith growth rings. *Marine Biology*. 148: 319-326. DOI 10.1007/s00227-005-0072-8.
- Roche, M. A. (2013). *Historia de vida de Zidona dufresnei Donovan, 1823 (Mollusca: Gastropoda) en la Bahía San Antonio, una especie de creciente interés comercial*. [Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina].
- Rodrigues, A. S., y Medeiros, J. (2005). Reproductive cycle of *Leptaxis caldeirarum*, a locally endangered Azorean land snail. *Invertebrate Reproduction and Development*. 47(3): 191-195.
- Rodríguez-Potrony, H., Bosch-Díaz, C., Gordillo-Pérez, M. J., Rodríguez-Matos, J. y Reyes-Tur, B. (2020). Parámetros reproductivos, historia de vida y crecimiento de *Polymita brocheri* (Gastropoda: Cepolidae) en condiciones de cautiverio. *Poeyana*. 510: 10-17.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. y Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*. 61: 539-542.
- Rosenberg, G. (2014). A new critical estimate of named species-level diversity of the recent Mollusca. *American Malacological Bulletin*. 32(2): 308-322.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Del Barrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E. y Sánchez-García, A. (2017). DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 34: 3299-3302.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Scarabino, F. (2003). Lista sistemática de los Gastropoda terrestres de Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*. 8: 203-214.

- Schander, C. y Sundberg, P. (2001). Useful Characters in Gastropod Phylogeny: Soft Information or Hard Facts? *Systematic Biology*. 50(1): 136-141.
- Schileyko, A. A. (1995) *Some problems of functional morphology and evolution of terrestrial pulmonata*. [Resumen]. 12th International Malacology Congress Vigo. 325-326.
- Schileyko, A. A. (1999). Treatise on Recent terrestrial pulmonate molluscs. Part 3. Partulidae, Aillyidae, Bulimulidae, Orthalicidae, Megaspiridae, Urocoptidae. *Ruthenica*. Supplement 2: 263-436.
- Schön, I., Pinto, R. L., Halse, S., Smith, A. J., Martens, K. y Birky, C. W. J. (2012) Cryptic Species in Putative Ancient Asexual Darwinulids (Crustacea, Ostracoda). *Plos One*. 7(7): e39844. doi:10.1371/journal.pone.0039844
- Schlesch, H. (1935). Eine neue subspezies von *Bulimulus* (*Bulimulus*) *sporadicus* Orb. Aus Paraguay (*Bul. sparadicus shadei*). *Archiv für Molluskenkunde*. 67: 86-87.
- Silva, L. C., Meireles, L. M. O., Junqueira, F. O. y Bessa, E. C. A. (2008). Development and reproduction in *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca: Bulimulidae) in laboratory. *Revista Brasileira de Zoologia*. 25(2): 220-223.
- Silva, L. C., Meireles, L. M. O., Junqueira, F. O. y Almeida Bessa, E. C. (2009). Influência da umidade do substrato sobre crescimento, produção de ovos e sobrevivência de *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae) sob condições de laboratorio. *Revista Brasileira de Biociências. Brazilian Journal of Biosciences*. 7(2): 144-149.
- Silva, L. C., Meireles, L. M. O., D'ávila, S., Junqueira, F. O. y Almeida Bessa, E. C. (2013) Life history of *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Bulimulidae): effect of isolation in reproductive strategy and in resources allocation over their lifetime. *Molluscan Research*. 33(2): 75-79. DOI:10.1080/13235818.2012.756130.
- Simone, L. R. L. (2006). Land and freshwater molluscs of Brazil. EGB Fapesp, São Paulo. (Pp.: 390).
- Simone, L. R. L. y do Amaral, V. S. (2018). Insular life: new endemic species from São Paulo oceanic islands, Brazil (Pulmonata, Bulimulidae), as example of endemicity. *Journal of Conchology*. 43(2): 167-187.
- Simone, L. R. L.; Belz, C. E. y de Vasconcellos, M. (2020). A new species of *Drymaeus* endemic from Currais Archipelago, Paraná, Brazil (Pulmonata, Bulimulidae). *Papéis Avulsos de Zoologia*. 60: e20206057.

- Smith, T. M. y Smith, R. L. (2007). Crecimiento poblacional. En T. M. Smith y R. L. Smith (Ed.), *Ecología* (Sexta edición, pp. 215-221). Editorial Pearson Educación, S. A.
- Staikou, A. (1998). Aspects of life cycle, population dynamics, growth and secondary production of the pulmonate snail *Cepaea vindobonensis* (Ferussac, 1821) in northern Greece. *Journal of Molluscan Studies*. 64: 297-308.
- Städler, T., Frye, M., Neiman, M. y Lively, M. (2005). Mitochondrial haplotypes and the New Zealand origin of clonal European *Potamopyrgus*, an invasive aquatic snail. *Molecular Ecology*. 14: 2465-2473.
- Stearns, S. C. (2000). Life history evolution: successes, limitations, and prospects. *Naturwissenschaften*. 87: 476-486.
- Strobel, P. (1874). *Materiali per una malacostatica di terra e di acqua dolce dell'Argentina meridionale*. Biblioteca Malacologica. Pisa. (Pp.:142).
- Suárez, A. (2015). Ciclo reproductivo de *Cerion mumia chrysalis* (Pulmonata: Stylommatophora: Cerionidae). *Solenodon*. 12: 21-27.
- Suvorov, A. N. (2002). Prospects for studies of morphological variability of land pulmonate snails. *Biology Bulletin*. 29(5): 455-467.
- Terwissen, A. G., Alvarez Castillo, H. A., López, A. N., Vincini, A. M., Manetti, P. L., Clemente, N. L. y Cendoya, G. (2007). Aspectos biológicos de *Deroceras reticulatum* (Müller, 1774) (Pulmonata: Stylommatophora) en condiciones controladas. *Revista del Museo de La Plata*. 18(172): 1-10.
- Thiengo, S. (1995). Técnicas Malacológicas. En F. Simoes Barbosa (Ed.). *Tópicos em Malacología Médica*. Fiocruz. Rio de Janeiro. (Pp.: 314).
- Tryon, J. R. (1867). *A monograph of the terrestrial mollusca of the United States*. Philadelphia. (Pp.:288).
- Valencia, J. S., Díaz, M. E., y Aranda, D. A. (2013). Dinámica poblacional y reproductiva de *Turbinella angulata* y *Busycon perversum* (Mesogasteropoda: Turbinellidae y Melongenidae) en el Banco de Campeche, México. *Revista de Biología Tropical*. 61(1): 15-28.
- Van Mol, J. J. (1971). Notes anatomiques sur les Bulimulidae (Mollusques, Gasteropodes, Pulmones). *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*. 101(3): 183-225.

- Vélez-Arellano, N., Mendoza-Santana, L. E., Ortiz-Ordóñez, E. y Guzmán del Proó, S. A. (2011). Ciclo gonádico de *Tegula aureotincta* (Mollusca: Gastropoda) en Bahía Asunción, Baja California Sur, México. *Hidrobiológica*. 21(2): 178-184.
- Walford, L. A. (1946). A new graphic method of describing the growth of animals. *The Biological Bulletin*. 90(2): 141-147. doi:10.2307/1538217
- Weibel, E. R. y Gomez, D. M. (1962). A principle for counting tissue structures on random sections. *Special Communications. Journal of Applied Physiology*. 17: 343-348.
- Zajac, K. S. y Kramarz, P. E. (2017). Terrestrial gastropods - how do they reproduce? *Invertebrate Survival Journal*. 14: 199-209.
- Zhang, Z. Q. (2011). Animal biodiversity: An introduction to higher- level classification and taxonomic richness. *Zootaxa*. 3148: 1-237.
- Zetina Zárate, A. I., Aranda, D. A., Brule, T. y Baqueiro Cárdenas, E. (2000). Ciclo reproductor e índices de condición usados en *Melongena corona* (Mollusca: Gastropoda). *Revista de Biología Tropical*. 1: 77-86.
- Zilch, A. (1960 a). Gastropoda Teil 2. Euthyneura. En O. H. Schindewolf, *Handbuch der Paläozoologie*. 6(3): 401-600.
- Zilch, A. (1960 b). Gastropoda Teil 2. Euthyneura. En O. H. Schindewolf, *Handbuch der Paläozoologie*. 6(4): 601-843.

## ANEXO

**Secuencias****Citocromo Oxidasa subunidad I (COI)****>MLP-Ma 15166**

GAC TTT ATATATAATCTTTGGATTGTGGTGCGGGTTGGTAGGAACTGCCCTATCCCTCATTATTCGATTAGAATTAGGCACCCCAGGGGTTTTACT  
 AGATGAGCACTTTTACAATGTCGTTGTAACAGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTATAGTTATAACCACTCATAATTGGGGGTTTTGGTAATTGG  
 ATAGTCCCTCTTATAATTGGCGCACCAGACATAGCTTTTCCTCGCTTAAATAATATAAGCTTCTGATTGCTACCGCCATCATTATTTTATTAATTG  
 TCTCGAGAATAGTAGAAGGAGGGGCGGGACAGGTTGAACTGTCTACCCCCATTAAGAGCATTGGTTCGGCCATGCAGGGGCATCGGTAGATTT  
 AGCAATTTTTTCTTTACATTTAGCCGGAGTTAGCTCTATTCTAGGGGCTATCAACTTTATTACCACCATTTACAACATACGCCCCGACCGGAATAAAT  
 ATAGAACGCGTGAATCTTTTTGTGTGGTCAATTTTGGTCACCGTGTTTTTGTTACTTCTATCCCTACCGGTGTTAGCTGGAGCGATTACTATACTTC  
 TGACAGATCGCAATTTTAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCTGGGGGAGGGGACCCCATTTTATATCAACATTTATTT

**>MLP-Ma 15167**

GAC TTT ATATATAATCTTTGGATTGTGGTGCGGGTTGGTAGGAACTGCCCTATCCCTCATTATTCGATTAGAATTAGGCACCCCAGGGGTTTTACT  
 AGATGAGCACTTTTACAATGTCGTTGTAACAGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTATAGTTATAACCACTCATAATTGGGGGTTTTGGTAATTGG  
 ATAGTCCCTCTTATAATTGGCGCACCAGACATAGCTTTTCCTCGCTTAAATAATATAAGCTTCTGATTGCTACCGCCATCATTATTTTATTAATTG  
 TCTCGAGAATAGTAGAAGGAGGGGCGGGACAGGTTGAACTGTCTACCCCCATTAAGAGCATTGGTTCGGCCATGCAGGGGCATCGGTAGATTT  
 AGCAATTTTTTCTTTACATTTAGCCGGAGTTAGCTCTATTCTAGGGGCTATCAACTTTATTACCACCATTTACAACATACGCCCCGACCGGAATAAAT  
 ATAGAACGCGTGAATCTTTTTGTGTGGTCAATTTTGGTCACCGTGTTTTTGTTACTTCTATCCCTACCGGTGTTAGCTGGAGCGATTACTATACTTC  
 TGACAGATCGCAATTTTAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCTGGGGGAGGGGACCCCATTTTATATCAACATTTATTT

**>MLP-Ma 15169/e**

GAC TTT ATATATAATCTTTGGATTGTGGTGCGGGTTGGTAGGAACTGCCCTATCCCTCATTATTCGATTAGAATTAGGCACCCCAGGGGTTTTACT  
 AGATGAGCACTTTTACAATGTCGTTGTAACAGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTATAGTTATAACCACTCATAATTGGGGGTTTTGGTAATTGG  
 ATAGTCCCTCTTATAATTGGCGCACCAGACATAGCTTTTCCTCGCTTAAATAATATAAGCTTCTGATTGCTACCGCCATCATTATTTTATTAATTG  
 TCTCGAGAATAGTAGAAGGAGGGGCGGGACAGGTTGAACTGTCTACCCCCATTAAGAGCATTGGTTCGGCCATGCAGGGGCATCGGTAGATTT  
 AGCAATTTTTTCTTTACATTTAGCCGGAGTTAGCTCTATTCTAGGGGCTATCAACTTTATTACCACCATTTACAACATACGCCCCGACCGGAATAAAT

ATAGAACGCGTGAATCTTTTTGTGTGGTCAATTTTGGTCACCGTGTTTTTGTACTTCTATCCCTACCGGTGTTAGCTGGAGCGATTACTATACTTC  
TGACAGATCGCAATTTTAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCTGGGGGAGGGGACCCCATTTTATATCAACATTTATTT

**>MLP-Ma 15168/b**

GACTTTATATATAATCTTTGGATTGTGGTGC GGGTTGGTAGGAACTGCCCTATCCCTCATTATTTCGATTAGAATTAGGCACCCCAGGGGTTTTACT  
AGATGAGCACTTTTACAATGTCGTTGTAACAGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTATAGTTATAACACTCATAATTGGGGGTTTTGGTAATTGG  
ATAGTCCCTCTTATAAATTGGCGCACCAGACATAGCTTTTCCTCGCTTAAATAATATAAGCTTCTGATTGCTACCGCCATCATTATTTTATTAATTG  
TCTCGAGAATAGTAGAAGGAGGGGCCGGGACAGGTTGAACTGTCTACCCCCATTAAGAGCATTGGTTCGGCCATGCAGGGGCATCGGTAGATTT  
AGCAATTTTTCTTTACATTTAGCCGGAGTTAGCTCTATTCTAGGGGCTATCAACTTTATTACCACCATTTACAACATACGCCCCGACCGGAATAAAT  
ATAGAACGCGTGAATCTTTTTGTGTGGTCAATTTTGGTCACCGTGTTTTTGTACTTCTATCCCTACCGGTGTTAGCTGGAGCGATTACTATACTTC  
TGACAGATCGCAATTTTAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCTGGGGGAGGGGACCCCATTTTATATCAACATTTATTT

**>MLP-Ma 15168/c**

GACTTTATATATAATCTTTGGATTGTGGTGC GGGTTGGTAGGAACTGCCCTATCCCTCATTATTTCGATTAGAATTAGGCACCCCAGGGGTTTTACT  
AGATGAGCACTTTTACAATGTCGTTGTAACAGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTATAGTTATAACACTCATAATTGGGGGTTTTGGTAATTGG  
ATAGTCCCTCTTATAAATTGGCGCACCAGACATAGCTTTTCCTCGCTTAAATAATATAAGCTTCTGATTGCTACCGCCATCATTATTTTATTAATTG  
TCTCGAGAATAGTAGAAGGAGGGGCCGGGACAGGTTGAACTGTCTACCCCCATTAAGAGCATTGGTTCGGCCATGCAGGGGCATCGGTAGATTT  
AGCAATTTTTCTTTACATTTAGCCGGAGTTAGCTCTATTCTAGGGGCTATCAACTTTATTACCACCATTTACAACATACGCCCCGACCGGAATAAAT  
ATAGAACGCGTGAATCTTTTTGTGTGGTCAATTTTGGTCACCGTGTTTTTGTACTTCTATCCCTACCGGTGTTAGCTGGAGCGATTACTATACTTC  
TGACAGATCGCAATTTTAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCTGGGGGAGGGGACCCCATTTTATATCAACATTTATTT

**>MLP-Ma 14629/b**

GACTTTATATATAATCTTTGGATTGTGGTGC GGGTTGGTAGGAACTGCCCTATCCCTCATTATTTCGATTAGAATTAGGCACCCCAGGGGTTTTACT  
AGATGAGCACTTTTACAATGTCGTTGTAACAGCTCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTTATAGTTATAACACTCATAATTGGGGGTTTTGGTAATTGG  
ATAGTCCCTCTTATAAATTGGCGCACCAGACATAGCTTTTCCTCGCTTAAATAATATAAGCTTCTGATTGCTACCGCCATCATTATTTTATTAATTG  
TCTCGAGAATAGTAGAAGGAGGGGCCGGGACAGGTTGAACTGTCTACCCCCATTAAGAGCATTGGTTCGGCCATGCAGGGGCATCGGTAGATTT  
AGCAATTTTTCTTTACATTTAGCCGGAGTTAGCTCTATTCTAGGGGCTATCAACTTTATTACCACCATTTACAACATACGCCCCGACCGGAATAAAT  
ATAGAACGCGTGAATCTTTTTGTGTGGTCAATTTTGGTCACCGTGTTTTTGTACTTCTATCCCTACCGGTGTTAGCTGGAGCGATTACTATACTTC  
TGACAGATCGCAATTTTAATACTTCTTTCTTTGACCCAGCTGGGGGAGGGGACCCCATTTTATATCAACATTTATTT

**>MLP-Ma 15160/a**

CACTTTATATTTACTATTTGGTGTCTGATGTGGACTGGTAGGTACAGGTCTGTCCTTATTAATTCGATTAGAGTTAGGCACCACAGATGTTTTATT  
 AGATGGCCACTTTTATAATGTAATTGTCACGGCGCATGCTTTTGTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTTTAATAATTGGTGCTTTTGGAAATTGA  
 ATGGTACCTTTATTAATTGGAGCTCCGGACATATCCTTCCCTCGAATAAATAATATGAGATTTTGATTGCTCCCTCCAGCCTTTATTTTGTAGTTG  
 TCTCTACACTGGTAGAATCAGGGGCAGGGACAGGGTGAACGGTCTACCCACCCTTAAGCAGACTTAGGGGCCATAGGGGGGCTTCGGTTGATTT  
 GGCAATTTTTCTCTCCATTTAGCCGGAATATCTTCAATTTTAGGTGCTATTAATTTTATTACAACCATTTTAAATATACGTAGGGATGGCATATCC  
 ATAGAACGAGTAAGTCTGTTTGTGGTCAATCTTAGTAACCGTTTTTTTATTGTTGCTGTCACTACCTGTCTTGGCAGGGCGCTATCACTATACTCC  
 TAACCGATCGGAATTTAATAACGGCATTTTTTGATCCGGCGGGGGTGGAGATCCTATCTTATATCAGCATTGTTT

**>IBS-Ma 185**

GACTTTATATATACTTTTTGGGGTGTGATGTGGTATGGTTGGAACAGGATTATCATTACTTATTCGGTTAGAGCTCGGGACTACAGGTGTTCTTTT  
 GGATGATCATTTTTATAATGTTGTTGTGACAGCCCATGCGTTTGTATGATTTTTTTTATGGTAATACCCCTTATGATTGGAGGGTTCGGAAACTG  
 AATGGTGCCTTTATTAATTGGTGCTCCAGATATATCTTTCCACGAATAAACAATATAAGCTTTTGATTACTCCCTCCTGCATTTATTTATTAATT  
 GTTTCAGAATGGTTGAAGGAGGGGCCGGCACAGGGGTGGACAGTGTATCCCCCCTGAGAAGATTAGTAGGTATAGGGGGGCATCAGTTGATT  
 TAGCTATTTTCTCATTACACTTAGCAGGAATATCTTCAATTTTAGGGGCTATTAACCTTATTACAACCATCTATAATATACGTGCCGGAGGGATAAC  
 CATGGAACGAGTGAGATTATTTGTATGATCTATTTTAGTGACTGTGTTTTTACTGTTACTATCTTTACCGGTATTGGCAGGAGCTATTACTATATT  
 ATTAACAGATCGCAATTTAATACTACCTTTTTTGACCCCGCCGGAGGAGGGATCCTATTTTATATCAACATTTGTTT

**>IBS-Ma 393**

GACTTTATATATACTTTTTGGGGTGTGATGTGGTATGGTTGGAACAGGATTATCATTACTTATTCGGTTAGAGCTCGGGACTACAGGTGTTCTTTT  
 GGATGATCATTTTTATAATGTTGTTGTGACAGCCCATGCGTTTGTATGATTTTTTTTATGGTAATACCCCTTATGATTGGAGGGTTCGGAAACTG  
 AATGGTGCCTTTATTAATTGGTGCTCCAGATATATCTTTCCACGAATAAACAATATAAGCTTTTGATTACTCCCTCCTGCATTTATTTATTAATT  
 GTTTCAGAATGGTTGAAGGAGGGGCCGGCACAGGGGTGGACAGTGTATCCCCCCTGAGAAGATTAGTAGGTATAGGGGGGCATCAGTTGATT  
 TAGCTATTTTCTCATTACACTTAGCAGGAATATCTTCAATTTTAGGGGCTATTAACCTTATTACAACCATCTATAATATACGTGCCGGAGGGATAAC  
 CATGGAACGAGTGAGATTATTTGTATGATCTATTTTAGTGACTGTGTTTTTACTGTTACTATCTTTACCGGTATTGGCAGGAGCTATTACTATATT  
 ATTAACAGATCGCAATTTAATACTACCTTTTTTGACCCCGCCGGAGGAGGGATCCTATTTTATATCAACATTTGTTT

**>IBS-Ma 363**

GACTTTATATATACTTTTTGGGGTGTGATGTGGTATGGTTGGAACAGGATTATCATTACTTATTCGGTTAGAGCTCGGGACTACAGGTGTTCTTTT  
 GGATGATCATTTTTATAATGTTGTTGTGACAGCCCATGCGTTTGTATGATTTTTTTTATGGTAATACCCCTTATGATTGGAGGGTTCGGAAACTG

AATGGTGCCTTTATTAATTGGTGCTCCAGATATATCTTTTCCACGAATAAACAATATAAGCTTTTGATTACTCCCTCCTGCATTTATTTTATTAATT  
 GTTTCAGAATGGTTGAAGGAGGGGCCGGCACGGGGTGGACAGTGTATCCCCCCTGAGAAGATTAGTAGGTCATAGGGGGGCATCAGTTGATT  
 TAGCTATTTTCTCATTACACTTAGCAGGAATATCTTCAATTTTAGGGGCTATTAACCTTATTACAACCATCTATAATATACGTGCCGGAGGGATAAC  
 CATGGAACGAGTGAGATTATTTGTATGATCTATTTTAGTGACTGTGTTTTTACTGTTACTATCTTTACCGGTATTGGCAGGAGCTATTACTATATT  
 ATTAACAGATCGCAATTTTAATACTACCTTTTTTGACCCCGCCGGAGGAGGGGATCCTATTTTATATCAACATTTGTTT

**>MLP-Ma 15183/a**

GACTTTATATATACTTTTTGGGGTGTGATGTGGTATGGTTGGAACAGGATTATCATTACTTATTCGGTTAGAGCTCGGGACTACAGGTGTTCTTTT  
 GGATGATCATTTTTATAATGTTGTCGTCACAGCCATGCGTTTGTTATGATTTTTTTTATAGTAATACCCCTTATGATTGGAGGGTTTGGAACTG  
 AATGGTGCCTTTATTAATTGGTGCTCCAGATATATCTTTTCCACGAATAAACAATATAAGCTTTTGATTACTCCCTCCTGCATTTATTTTATTAATT  
 GTTTCAGAATGGTTGAAGGAGGTGCCGGAACGGGGTGGACAGTGTACCCCCCCTGAGAAGATTAGTAGGACATAGGGGGGCATCAGTTGATT  
 TAGCTATTTTCTCATTACACTTAGCAGGAATATCTTCAATTTTAGGGGCTATTAACCTTATTACAACCATTTATAATATACGTGCCGGAGGGATAAC  
 CATGGAACGAGTGAGATTATTTGTATGATCTATTTTAGTGACTGTGTTTTTACTGTTACTATCTTTACCGGTATTGGCAGGAGCTATTACTATATT  
 ATTAACAGATCGCAATTTTAATACTACCTTTTTTGACCCCGCCGGAGGTGGGGATCCTATTTTATATCAACATTTGTTT

**>MLP-Ma 15183/b**

GACTTTATATATACTTTTTGGGGTGTGATGTGGTATGGTTGGAACAGGATTATCATTACTTATTCGGTTAGAGCTCGGGACTACAGGTGTTCTTTT  
 GGATGATCATTTTTATAATGTTGTCGTCACAGCCATGCGTTTGTTATGATTTTTTTTATAGTAATACCCCTTATGATTGGAGGGTTTGGAACTG  
 AATGGTGCCTTTATTAATTGGTGCTCCAGATATATCTTTTCCACGAATAAACAACATAAGCTTTTGATTACTCCCTCCTGCATTTATTTTATTAATT  
 GTTTCAGAATGGTTGAAGGAGGAGCCGGTACGGGGTGGACAGTGTACCCCCCCTGAGAAGTTTAGTAGGTCATAGGGGGGCATCAGTTGATT  
 TAGCTATTTTCTCATTACACTTAGCAGGAATATCTTCAATTTTAGGGGCTATTAACCTTATTACAACCATCTATAATATACGTGCCGGAGGGATAAC  
 CATGGAACGAGTGAGACTATTTGTATGATCTATTTTAGTGACTGTGTTTTTACTATTACTATCTTTACCGGTATTGGCAGGAGCTATTACTATATTA  
 TTAACAGATCGCAATTTTAATACTACCTTTTTTGACCCCGCCGGAGGAGGGGATCCTATTTTATATCAACATTTGTTT

**>MLP-Ma 15178**

GACTTTATATATACTTTTTGGGGTGTGATGTGGTATAGTTGGAACAGGATTATCATTACTTATTCGGTTAGAGCTCGGGACTACAGGTGTTCTTTT  
 GGATGATCATTTTTATAATGTTGTCGTCACAGCCATGCGTTTGTTATGATTTTTTTTATAGTAATACCCCTTATGATTGGAGGGTTTGGAACTG  
 AATGGTGCCTTTATTAATTGGTGCTCCAGATATATCTTTTCCACGAATAAACAACATAAGCTTTTGATTACTCCCTCCTGCATTTATTTTATTAATT  
 GTTTCAGAATGGTTGAAGGAGGAGCCGGGACGGGGTGGACAGTGTACCCCCCCTGAGAAGTTTAGTAGGTCATAGGGGGGCATCAGTTGATT  
 TAGCTATTTTCTCATTACACTTAGCAGGAATATCTTCAATTTTAGGGGCTATTAACCTTATTACAACCATCTATAATATACGTGCCGGAGGGATAAC

CATGGAACGAGTGAGATTATTTGTATGATCTATTTTAGTGACTGTGTTTTTACTATTACTATCTTTACCAGTATTGGCAGGAGCTATTACTATATTA  
TTAACAGATCGCAATTTTAATACTACCTTTTTTGACCCCGCCGGAGGAGGGGATCCTATTTTATATCAACATTTGTTT

### **Gen ribosomal 16S (16S-ARNr)**

#### **>MLP-Ma 15166**

CATTTGGCCTTTAATTGAGGTCTAGTATCAAAGGGATCACGGGTAGGGGCATCTGTCTCAGGTAAATTTCTATGAAATTAATTAGTAGGTGAAAA  
TGCCTACAAACAATAAGTTAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATGTAATAATTTAGTTAATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAATCACGA  
ATAAAACATTCAGTCAATTCCTTTTAAACACGAATCTAATTATATTAGTAATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAACTAATTACATTG

#### **>MLP-Ma 15167**

CATTTGGCCTTTAATTGAGGTCTAGTATCAAAGGGATCACGGGTAGGGGCATCTGTCTCAGGTAAATTTCTATGAAATTAATTAGTAGGTGAAAA  
TGCCTACAAACAATAAGTTAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATGTAATAATTTAGTTAATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAATCACGA  
ATAAAACATTCAGTCAATTCCTTTTAAACACGAATCTAATTATATTAGTAATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAACTAATTACATTG

#### **>MLP-Ma 15169/e**

CATTTGGCCTTTAATTGAGGTCTAGTATCAAAGGGATCACGGGTAGGGGCATCTGTCTCAGGTAAATTTCTATGAAATTAATTAGTAGGTGAAAA  
TGCCTACAAACAATAAGTTAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATGTAATAATTTAGTTAATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAATCACGA  
ATAAAACATTCAGTCAATTCCTTTTAAACACGAATCTAATTATATTAGTAATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAACTAATTACATTG

#### **>MLP-Ma 15168/b**

CATTTGGCCTTTAATTGAGGTCTAGTATCAAAGGGATCACGGGTAGGGGCATCTGTCTCAGGTAAATTTCTATGAAATTAATTAGTAGGTGAAAA  
TGCCTACAAACAATAAGTTAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATGTAATAATTTAGTTAATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAATCACGA  
ATAAAACATTCAGTCAATTCCTTTTAAACACGAATCTAATTATATTAGTAATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAACTAATTACATTG

#### **>MLP-Ma 15168/c**

CATTTGGCCTTTAATTGAGGTCTAGTATCAAAGGGATCACGGGTAGGGGCATCTGTCTCAGGTAAATTTCTATGAAATTAATTAGTAGGTGAAAA  
TGCCTACAAACAATAAGTTAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATGTAATAATTTAGTTAATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAATCACGA  
ATAAAACATTCAGTCAATTCCTTTTAAACACGAATCTAATTATATTAGTAATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAACTAATTACATTG

**>MLP-Ma 14629/b**

CATTTGGCCTTTAATTGAGGTCTAGTATCAAAGGGATCACGGGTAGGGGCATCTGTCTCAGGTTAATTTCTATGAAATTAATTAGTAGGTGAAAA  
 TGCCTACAAACAATAAGTTAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATGTAATAATTTAGTTAATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAATCACGA  
 ATAAAACATTCAGTCAATTCCTTTTAAACACGAATCTAATTATATTAAGTAATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAATTACATT  
 G

**>MLP-Ma 15160/a**

AAAATTGGCCTGTAATTGAGGTCTTGTATCAACGGGATCACCGAGGGGTAAGTGTCTCATTTTAACGATTTATAAATTATTTAGTTGGTGAAAATC  
 CCAACGGAATTTGGAAAAGACGAGAAGACCCTTAGATTTTTTATTTCGATGAGCCGATGGCGCAAACATTTTACTGGGGCGGTATTGACTCAATTG  
 AAAACACTCGATTAATGAGAACCTACAGATCTATCTTATTAGTACGGATTAATAACCTAAGGGATAACAGCATTATTGATGAATTACATTG

**>MLP-Ma 15157**

CATTTGGCTTTTAATTAAGTCTAGTATCAACGGCTTTACGTGTGGGGACAACGTCTCGGATTAAGTATAATGAAATTAATTAGTTGGTGTA  
 GCTAACGGTATAAAGATAGACGAGAAGACCCTTAGATCTTAATTTAGGAAAATTATCAAAGTTTTATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAGTCACT  
 TGATAACACTCAAAGATAAGGTATAACAAATCTAAAAATTTTATGTATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAAATTACATTG

**>IBS-Ma 362-1**

CACTTGGCTTTTAATTAAGTCTAGCATCAACGGCTTTACGTGTGGGGATAACTGTCTCGGATTAAGTTTAATGAAATTAATTAGTTGGTGAAAA  
 GCTAACGGTATTAAGATAGACGAGAAGACCCTTAGATCTTCATTTATGAAAACCTATGAAGGTTTTATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAGTCATT  
 TATAAACACGCAAAGATGAGATATAACAAACCTAAGAATTTTAATTATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATTAATTACATTG

**>IBS-Ma 362-2**

CACTTGGCTTTTAATTAAGTCTAGCATCAACGGCTTTACGTGTGGGGATAACTGTCTCGGATTAAGTTTAATGAAATTAATTAGTTGGTGAAAA  
 GCTAACGGTATTAAGATAGACGAGAAGACCCTTAGATCTTCATTTATGAAAACCTATGAAGGTTTTATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAGTCATT  
 TATAAACACGCAAAGATGAGATATAACAAACCTAAGAATTTTAATTATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATTAATTACATTG

**>IBS-Ma 362-3**

CACTTGGCTTTTAATTAAGTCTAGCATCAACGGCTTTACGTGTGGGGATAACTGTCTCGGATTAAGTTTAATGAAATTAATTAGTTGGTGAAAA  
 GCTAACGGTATTAAGATAGACGAGAAGACCCTTAGATCTTCATTTATGAAAACCTATGAAGGTTTTATCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAGTCATT  
 TATAAACACGCAAAGATGAGATATAACAAACCTAAGAATTTTAATTATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATTAATTACATTG

**>MLP-Ma 15188/c**

CATTTGGCTTTTAATTAAGTCTAGCATCAACGGCTTTACGTGTGGGGATAACTGTCTCGGGTTAAGTTTAATGAAATTAATTAGTTGGTGAAAA  
GCCAACGGTACTAAGATAGACGAGAAGACCCTTAGATCTTTTTTTATGAAAATTTTGATAGTTTTTTCAATTTTACTGGGGCGGTAATGATTCACT  
TTTTAACACTCAAAGATAAAGTATAACAAACCTAAAAATTTAATTATGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATTTATTACATTG

**>IBS-Ma 393**

CACTTGGCCTTTAATTGGGGTCTAGAATCAATGGCTTTTCGTGAGGGGAACTCTGTCTCGGGTTAAGTTTAATGAAATTAATTTAGTTGGTGAAAA  
TACCAACAATAATCAGATAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATATTAATGGGGAAATTTTCAATTTTACTGGGGCGGTAATGATTCATTA  
GTTAACACTCACTAATAAGAGAAGACAAATCTAATAATTTAATTAAGGATAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAATTTACATTG

**>IBS-Ma 363**

CACTTGGCCTTTAATTGGGGTCTAGAATCAATGGCTTTTCGTGAGGGGAACTCTGTCTCGGGTTAAGTTTAATGAAATTAATTTAGTTGGTGAAAA  
TACCAACAATAATCAGATAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATATTAATGGGGAAATTTTCAATTTTACTGGGGCGGTAATGATTCATTA  
GTTAACACTCACTAATAAGAGAAGACAAATCTAATAATTTAATTAAGGATAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAATTTACATTG

**>IBS-Ma 185**

CACTTGGCCTTTAATTGGGGTCTAGAATCAATGGCTTTTCGTGAGGGGAACTCTGTCTCGGGTTAAGTTTAATGAAATTAATTTAGTTGGTGAAAA  
TACCAACAATAATCAGATAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATATTAATGGGGAAATTTTCAATTTTACTGGGGCGGTAATGATTCATTA  
GTTAACACTCACTAATAAGAGAAGACAAATCTAATAATTTAATTAAGGATAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAATTTACATTG

**>MLP-Ma 15178/a**

CACTTGGCCTTTAATTGGGGTCTAGAATCAATGGCTTTTCGTGAGGGGAACTCTGTCTCGGGTTAAGTTTAATGAAATTAATTAGTTGGTGAAAAT  
ACCAACAATAATCAGATAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATATTAAGGGGAAATTTTCAATTTTACTGGGGCGGTAATGATTCATTAG  
TTAACACTCACTAATAAGAGAAGACAAATCTAATAATTTAATTAAGGATAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAATTTACATTG

**>MLP-Ma 15183/a**

CACTTGGCCTTTAATTGGGGTCTAGAATCAATGGCTTTTCGTGAGGGGAACTCTGTCTCGGGTTAAGTTTAATGAAATTAATTAGTTGGTGAAAAT  
ACCAACAATAATCAGATAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATATTAATGGGGAAATTTTCAATTTTACTGGGGCGGTAATGATTCATTA  
GTTAACACTCACTAATAAGAGAAGACAAATCTAATAATTTAATTAAGGATAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAATTTACATTG

**>MLP-Ma 15183/b**

CACTTGGCCTTTAATTGGGGTCTAGAATCAATGGCTTTTCGTGAGGGGAACTCTGTCTCGGGTTAAGTTTAATGAAATTAATTAGTTGGTGAAAAT  
ACCAACAATAATCAGATAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATATTAATGGGGAAATTTTTCAATTTTACTGGGGCGGTAATGATTCATTAG  
TTAACTCACTAATAAGAGAAGACAAATCTAATAATTTAATTAAGGATAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAATTTACATTG

**>MLP-Ma 14544/e**

CATTTGGCCTTTAATTGAGGTCTAGTATCAAAGGCTTTTCGCGTGGAGAAACCTGTCTCGAGGTTAACTTTAATGAAATTAATTTAGTTGGTGAAA  
AGGCCAACACGAATCCGATAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATGAAATGGGGAAGTTTAGCAATTTTACTGGGGCGGTAATGAGTCAGC  
AATTAACACTCATCAAAGAGACACAACATATCTAAAATTTAATGTAGGAGAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATGATTTACATTG

**>MLP-Ma 14522/a**

CACTTGGCCTTTAATTGGGGTCTAGAATCAAAGGCTTATCGCGTGGAAAGAACTGTCTCGGGCTAAATTTGAAGAAATTAATTAGTTGGTGAAAA  
TGCCAACAGTAATTAGATAGACGAGAAGACCCTTAGACCTTAATTTATAAAATGGGGAAGTTTTCAATTTTACTGGGGCGGTAAGGATTCAGTA  
TTATAAACACTCACGGACAATATAAGACATATCTAATAATTTAATTAAGAACAAGGTACCTAAGGGATAACAGCATTATTAATAATTTACATTG

**Tabla 1***Distancias genéticas basada en el marcador COI de todas las muestras secuenciadas*

	<b>MLP-Ma 14629/b</b>	<b>MLP-Ma 15166</b>	<b>MLP-Ma 15167</b>	<b>MLP-Ma 15169/e</b>	<b>MLP-Ma 15168/b</b>	<b>MLP-Ma 15168/c</b>	<b>MLP-Ma 15160/a</b>	<b>MLP-Ma 15183/a</b>	<b>MLP-Ma 15183/b</b>	<b>MLP-Ma 15178/a</b>	<b>IBS-Ma 185</b>	<b>IBS-Ma 393</b>	<b>IBS-Ma 363</b>
<b>MLP-Ma 14629/b</b>	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	27,83	28,13	27,92	28,42	28,20	28,20	28,20
<b>MLP-Ma 15166</b>	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00	27,83	28,13	27,92	28,42	28,20	28,20	28,20
<b>MLP-Ma 15167</b>	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00	27,83	28,13	27,92	28,42	28,20	28,20	28,20
<b>MLP-Ma 15169/e</b>	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	27,83	28,13	27,92	28,42	28,20	28,20	28,20
<b>MLP-Ma 15168/b</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	27,83	28,13	27,92	28,42	28,20	28,20	28,20
<b>MLP-Ma 15168/c</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	27,83	28,13	27,92	28,42	28,20	28,20	28,20

Continuación **Tabla 1**

<b>MLP-Ma 15160/a</b>	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	-	25,36	26,02	26,26	26,02	26,02	26,02
<b>MLP-Ma 15183/a</b>	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	21,37	-	1,54	1,70	1,39	1,39	1,39
<b>MLP-Ma 15183/b</b>	23,05	23,05	23,05	23,05	23,05	23,05	21,83	1,53	-	0,61	1,70	1,70	1,70
<b>MLP-Ma 15178/a</b>	23,36	23,36	23,36	23,36	23,36	23,36	21,98	1,68	0,61	-	1,86	1,86	1,86
<b>IBS-Ma 185</b>	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	21,83	1,37	1,68	1,83	-	0,00	0,00
<b>IBS-Ma 393</b>	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	21,83	1,37	1,68	1,83	0,00	-	0,00
<b>IBS-Ma 363</b>	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	23,21	21,83	1,37	1,68	1,83	0,00	0,00	-

Los valores están expresados en porcentaje. La diagonal separa las distancias  $p$  (abajo) de las  $K2P$  (arriba).

**Tabla 2**

*Distancias genéticas basada en el marcador 16S de todas las muestras secuenciadas*

	<b>MLP-Ma 14629/b</b>	<b>MLP-Ma 15166</b>	<b>MLP-Ma 15167</b>	<b>MLP-Ma 15169/e</b>	<b>MLP-Ma 15168/b</b>	<b>MLP-Ma 15168/c</b>	<b>MLP-Ma 15160/a</b>	<b>MLP-Ma 15183/a</b>	<b>MLP-Ma 15183/b</b>	<b>MLP-Ma 15178/a</b>	<b>IBS-Ma 185</b>	<b>IBS-Ma 393</b>	<b>IBS-Ma 363</b>	<b>IBS-Ma 362/1</b>	<b>IBS-Ma 362/2</b>	<b>IBS-Ma 362/3</b>	<b>MLP-Ma 15188/c</b>	<b>MLP-Ma 14522/a</b>	<b>MLP-Ma 14544/e</b>	<b>MLP-Ma 15157</b>
<b>MLP-Ma 14629/b</b>	-	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	36,57	24,92	24,92	25,41	24,92	24,92	24,92	27,98	27,98	27,98	25,91	25,32	25,02	27,43
<b>MLP-Ma 15166</b>	0,00	-	0,00	0,00	0,00	0,00	36,57	24,92	24,92	25,41	24,92	24,92	24,92	27,98	27,98	27,98	25,91	25,32	25,02	27,43
<b>MLP-Ma 15167</b>	0,00	0,00	-	0,00	0,00	0,00	36,57	24,92	24,92	25,41	24,92	24,92	24,92	27,98	27,98	27,98	25,91	25,32	25,02	27,43
<b>MLP-Ma 15169/e</b>	0,00	0,00	0,00	-	0,00	0,00	36,57	24,92	24,92	25,41	24,92	24,92	24,92	27,98	27,98	27,98	25,91	25,32	25,02	27,43
<b>MLP-Ma 15168/b</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	-	0,00	36,57	24,92	24,92	25,41	24,92	24,92	24,92	27,98	27,98	27,98	25,91	25,32	25,02	27,43
<b>MLP-Ma 15168/c</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-	36,57	24,92	24,92	25,41	24,92	24,92	24,92	27,98	27,98	27,98	25,91	25,32	25,02	27,43
<b>MLP-Ma 15160/a</b>	28,93	28,93	28,93	28,93	28,93	28,93	-	39,33	39,33	39,33	39,33	39,33	39,33	35,97	35,97	35,97	37,77	40,74	39,11	37,13
<b>MLP-Ma 15183/a</b>	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	30,60	-	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00	20,21	20,21	20,21	18,82	11,47	14,01	21,58

## Continuación Tabla 2

<b>MLP-Ma 15183/b</b>	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	30,60	0,00	-	0,35	0,00	0,00	0,00	20,21	20,21	20,21	18,82	11,47	14,01	21,58
<b>MLP-Ma 15178/a</b>	21,55	21,55	21,55	21,55	21,55	21,55	30,60	0,35	0,35	-	0,35	0,35	0,35	19,76	19,76	19,76	19,27	11,88	14,43	21,11
<b>IBS-Ma 185</b>	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	30,60	0,00	0,00	0,35	-	0,00	0,00	20,21	20,21	20,21	18,82	11,47	13,95	21,58
<b>IBS-Ma 393</b>	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	30,60	0,00	0,00	0,35	0,00	-	0,00	20,21	20,21	20,21	18,82	11,47	13,95	21,58
<b>IBS-Ma 363</b>	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	21,20	30,60	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	-	20,21	20,21	20,21	18,82	11,47	13,95	21,58
<b>IBS-Ma 362/1</b>	23,32	23,32	23,32	23,32	23,32	23,32	28,57	17,67	17,67	17,31	17,67	17,67	17,67	-	0,00	0,00	7,76	7,76	20,74	8,52
<b>IBS-Ma 362/2</b>	23,32	23,32	23,32	23,32	23,32	23,32	28,57	17,67	17,67	17,31	17,67	17,67	17,67	0,00	-	0,00	7,76	21,17	20,74	8,52
<b>IBS-Ma 362/3</b>	23,32	23,32	23,32	23,32	23,32	23,32	28,57	17,67	17,67	17,37	17,67	17,67	17,67	0,00	0,00	-	7,76	21,17	20,74	8,52
<b>MLP-Ma 15188/c</b>	21,91	21,91	21,91	21,91	21,91	21,91	29,64	16,61	16,61	16,96	16,61	16,61	16,61	7,34	7,34	7,34	-	20,19	21,18	8,90
<b>MLP-Ma 14522/a</b>	21,48	21,48	21,48	21,48	21,48	21,48	31,43	10,60	10,60	10,95	10,60	10,60	10,60	18,37	18,37	18,37	17,67	-	14,44	24,00
<b>MLP-Ma 14544/e</b>	21,28	21,28	21,28	21,28	21,28	21,28	30,47	12,77	12,77	13,12	12,72	12,72	12,72	18,09	18,09	18,09	18,44	13,12	-	22,61
<b>MLP-Ma 15157</b>	22,97	22,97	22,97	22,97	22,97	22,97	29,29	18,73	18,73	18,37	18,73	18,73	18,73	8,04	8,04	8,04	8,39	20,49	19,50	-

Los valores están expresados en porcentaje. La diagonal separa las distancias  $p$  (abajo) de las  $K2P$  (arriba).

**Figura 1****ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) en el gen Citocromo Oxidasa subunidad I**

← → ↻ [bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/temp/18292.670465263/groupe7.init.html](http://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/temp/18292.670465263/groupe7.init.html)

---

Initial Partition with prior maximal distance  $P=2.15e-02$  ; Barcode gap distance = 0.135  
 Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000  
 Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click [here](#)

---

**Group[ 1 ] n: 6 ;id: MLP\_Ma\_15166 MLP\_Ma\_15167 MLP\_Ma\_15169\_e MLP\_Ma\_15168\_b MLP\_Ma\_15168\_c MLP\_Ma\_14629\_b**  
**Group[ 2 ] n: 1 ;id: MLP\_Ma\_15160\_a**  
**Group[ 3 ] n: 6 ;id: IBS\_Ma\_185 IBS\_Ma\_393 IBS\_Ma\_363 MLP\_Ma\_15183\_a MLP\_Ma\_15183\_b MLP\_Ma\_15178**

**Figura 2****ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*) en el gen ribosomal 16S**

← → ↻ [bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/temp/16862.621076603/groupe1.init.html](http://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/temp/16862.621076603/groupe1.init.html)

---

Initial Partition with prior maximal distance  $P=1.00e-03$  ; Barcode gap distance = 0.041  
 Distance K80 Kimura MinSlope=1.500000  
 Download (left click and save) or see below the tree file corresponding to this partition: click [here](#)

---

**Group[ 1 ] n: 6 ;id: MLP\_Ma\_15166 MLP\_Ma\_15167 MLP\_Ma\_15169\_e MLP\_Ma\_15168\_b MLP\_Ma\_15168\_c MLP\_Ma\_14629\_b**  
**Group[ 2 ] n: 1 ;id: MLP\_Ma\_15157**  
**Group[ 3 ] n: 3 ;id: IBS\_Ma\_362\_1 IBS\_Ma\_362\_2 IBS\_Ma\_362\_3**  
**Group[ 4 ] n: 1 ;id: MLP\_Ma\_15188\_c**  
**Group[ 5 ] n: 6 ;id: IBS\_Ma\_393 IBS\_Ma\_363 IBS\_Ma\_185 MLP\_Ma\_15178\_a MLP\_Ma\_15183\_b MLP\_Ma\_15183\_a**  
**Group[ 6 ] n: 1 ;id: MLP\_Ma\_14522\_a**  
**Group[ 7 ] n: 1 ;id: MLP\_Ma\_14544\_e**  
**Group[ 8 ] n: 1 ;id: MLP\_Ma\_15160\_a**