

UCH-FC
DOC-EDE
C697
C.1

**RELACIONES FILOGENÉTICAS Y BIOGEOGRAFÍA
HISTÓRICA DE LOS CARACOLES DE AGUA DULCE
DEL GÉNERO *BIOMPHALARIA* PRESTON, 1910
(MOLLUSCA: PLANORBIDAE) EN EL ALTIPLANO SUR**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para

optar al grado académico de

Doctor en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile

Por

Gonzalo Andrés Collado Inzulza

Julio, 2010

Director de tesis: Dr. Marco Méndez Torres

Co-Director: Dra. Irma Vila



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

GONZALO ANDRÉS COLLADO INZULZA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 16 de junio de 2010.

Director de tesis:

Dr. Marco Méndez T.

Co-Director:

Dra. Irma Vila

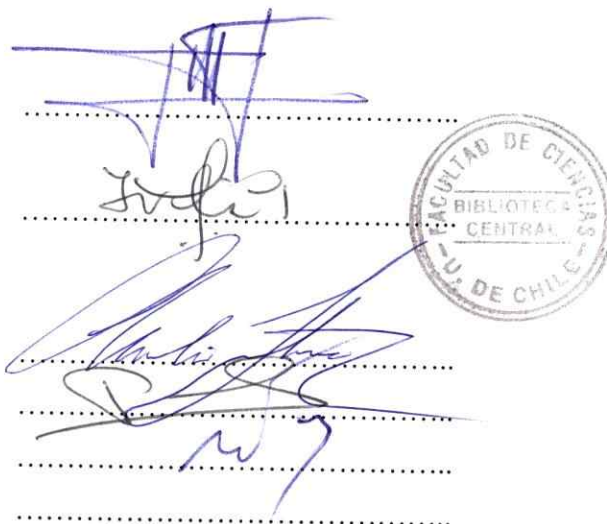
Comisión de Evaluación de la tesis

Dr. Claudio Latorre

Dr. Elie Poulin

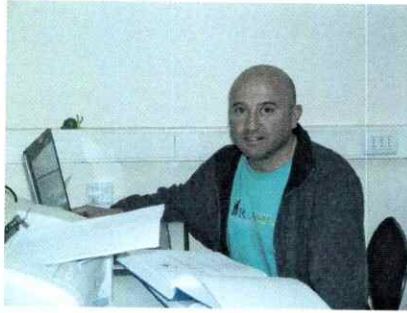
Dr. Alberto Veloso

Dr. Gonzalo Gajardo



The image shows several handwritten signatures in blue ink over horizontal dotted lines. To the right of the signatures is a circular stamp with the text "FACULTAD DE CIENCIAS" at the top, "BIBLIOTECA CENTRAL" in the middle, and "U. DE CHILE" at the bottom.

RESEÑA



Gonzalo Collado nació el 2 de agosto de 1971 en la ciudad de Talca, VII Región del Maule, Chile. Sus estudios de enseñanza media fueron realizados en el Liceo A-8 de Talca. Estudió la carrera de Biología Marina en el instituto Montemar de la Universidad de Valparaíso, obteniendo el grado académico de Licenciado en Ciencias del Mar y el Título Profesional de Biólogo Marino en 1998. Posteriormente ingresó al programa de Magister en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, finalizando en 2005. Ese mismo año ingresa al programa de doctorado en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva de la misma Universidad. Como académico a realizado clases y laboratorios en la Universidad de Valparaíso, Universidad Tecnológica Metropolitana, Universidad Iberoamericana y Universidad de Viña del Mar y ha sido ayudante del curso de postgrado Procesos Evolutivos en la Universidad de Chile. Gonzalo es miembro de tres sociedades científicas: Sociedad Chilena de Ciencias del Mar, Sociedad de Malacología de Chile y Sociedad Chilena de Evolución. Como parte de su actividad académica ha sido autor y coautor de una serie de trabajos presentados en distintos congresos académicos y publicados en revista de corriente principal. Sus investigaciones están orientadas a la taxonomía, sistemática y biología evolutiva de organismos marinos y de agua dulce.

AGRADECIMIENTOS



A mi familia, amigos y compañeros de Gevol,

por apoyarme y acompañarme incondicionalmente durante el desarrollo de mi doctorado y carrera académica

A mi tutor, Marco Méndez,

quien me dio la oportunidad y facilidades para emprender mi proyecto de tesis, además de ser la guía intelectual y proporcionar los consejos adecuados para concretarlo

A mi cotutora, Irma Vila,

por el apoyo brindado durante la ejecución del proyecto

A mi comisión de tesis, Dr. Claudio Latorre, Gonzalo Gajardo,

Elie Poulin y Alberto Veloso,

quienes me brindaron consejos muy valiosos para llevar a cabo de manera adecuada mi trabajo

Al Dr. Sergio Letelier,

curador del Museo Nacional de Historia Natural por su incondicional apoyo y permitirme desarrollar parte de mis intereses profesionales en esta institución

A CONICYT,

por su apoyo financiero para mi manutención durante el doctorado

A Marisol Maira, Loreto Riveros e Inés Saavedra,

secretarias de postgrado, por su buena disposición hacia mi persona.



*Hay dos cosas que los seres vivos no pueden
evitar, la muerte y la taxonomía...*

INDICE DE CONTENIDOS



AGRADECIMIENTOS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL.....	4-22
1.1. Taxonomía y relaciones filogenéticas en <i>Biomphalaria</i>	4
1.2. Clasificación de <i>Biomphalaria</i>	8
1.3. El Altiplano.....	9
1.4. Mecanismos de diferenciación en gastrópodos de agua dulce.....	16
1.5. Hipótesis y Objetivos.....	20
CAPITULO 2. RELACIONES FILOGENETICAS EN <i>BIOMPHALARIA</i> PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE): REPOSICIONAMIENTO DE TAXA E IDENTIFICACION DE UN NUEVO CLADO AL INTERIOR DEL GENERO.....	23-68
2.1. Introducción	25
2.1. Materiales y métodos.....	28



2.2. Resultados.....	36
2.3. Discusión.....	45
 CAPITULO 3. MONOPHYLY, CANDIDATE SPECIES AND VICARIANCE IN POPULATIONS OF FRESHWATER SNAILS OF THE GENUS <i>BIOMPHALARIA</i> PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) FROM THE SOUTHERN ALTIPLANO.....	
69-96	
2.1. Introducción.....	71
2.1. Materiales y métodos.....	74
2.2. Resultados.....	79
2.3. Discusión.....	84
 CAPITULO 4. VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA EN POBLACIONES DEL GÉNERO <i>BIOMPHALARIA</i> PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) DE DOS SISTEMAS EVAPORÍTICOS DEL ALTIPLANO CHILENO: ¿DISPERSIÓN O DIFERENCIACIÓN A ESCALA MICROGEOGRÁFICA?.....	
97-125	
2.1. Introducción.....	100
2.1. Materiales y métodos.....	103
2.2. Resultados.....	107
2.3. Discusión.....	114

CAPITULO 5. DISCUSION GENERAL.....126-142

TABLA RESUMEN.....133

LITERATURA CITADA.....134



LISTA DE TABLAS

CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL

Tabla 1.1. Especies del género *Biomphalaria* Preston, 1910 citadas para Chile y el Altiplano Sur de acuerdo a Sielfeld (2001).....7

Tabla 1.2. Especies del género *Biomphalaria* Preston, 1910 citadas para Chile y el Altiplano Sur de acuerdo a Valdovinos (2006).....7

CAPITULO 2. RELACIONES FILOGENETICAS EN *BIOMPHALARIA* PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE): REPOSICIONAMIENTO DE TAXA E IDENTIFICACION DE UN NUEVO CLADO AL INTERIOR DEL GENERO.

Tabla 2.1. Origen geográfico de las muestras de *Biomphalaria* y números de acceso GenBank de las secuencias de DNA utilizadas en el análisis filogenético.....33

CAPITULO 3. MONOPHYLY, CANDIDATE SPECIES AND VICARIANCE IN POPULATIONS OF FRESHWATER SNAILS OF THE GENUS *BIOMPHALARIA* PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) FROM THE SOUTHERN ALTIPLANO.

Table 3.1. Geographic position of Altiplano localities sampled and number of sequences obtained in the present study.....76

Table 3.2. Geographic origin of *Biomphalaria* samples studied, GenBank accession numbers and sources of the sequences of the mtDNA COI gene utilized in the present study.....78

Table 3.3. Percent of mean genetic sequence divergence (K2P) among groups of taxa from COI data.....80

Table 3.4. Percent of divergence between pairs of sequences of mtDNA COI from Altiplano populations using K2P.....81

CAPITULO 4. VARIACION MORFOLOGICA Y GENETICA EN POBLACIONES DEL GENERO *BIOMPHALARIA* PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) DE DOS SISTEMAS EVAPORITICOS DEL ALTIPLANO CHILENO: ¿DISPERSION O DIFERENCIACION A ESCALA MICROGEOGRAFICA?

Tabla 4.1. Localidades de muestreo, números de acceso GenBank y número de ejemplares utilizados en el presente estudio.....107

Tabla 4.2. Porcentajes de divergencia entre grupos de secuencias COI provenientes de los diferentes sitios de muestreo (“v” significa vertiente) utilizando el model de sustitución nucleotídica Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980).....109

Tabla 4.3. Matriz de clasificación obtenida del LDA de las frecuencias de los casos asignados a las localidades del Salar de Carcote (C) y Salar de Ascotán (A). Filas: clasificaciones observadas; columnas: clasificaciones predichas. P= porcentaje de clasificación correcta.....113

CAPITULO 5. DISCUSION GENERAL

Tabla 5.1. Tabla resumen de las principales preguntas de esta tesis.....133

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1. INTRODUCCION GENERAL

- Figura 1.1.** Hipótesis filogenética postulada por DeJong et al. (2001). El árbol constituye uno de los 234 árboles igualmente parsimoniosos construido a partir de matrices combinadas de secuencias (16S, ITS1 e ITS2). La topología es identical al árbol ML6
- Figura 1.2.** El Altiplano y las principales cuencas hidrológicas según Risacher (1992).....10
- Figura 1.3.** Elevación estimada a través del tiempo para la Cordillera Occidental, Altiplano y la Cordillera Oriental vista en sección transversal desde Oeste a Este. Reconstrucción realizada por Hartley (2003).....11
- Figura 1.4.** Sección transversal esquemática de las cuencas del Titicaca, Poopo, Coipasa y Uyuni de acuerdo a Placek et al. (2006).....14
- Figura 1.5.** Paleolagos existentes en el Altiplano de acuerdo a Placek et al. (2006)...14
- Figura 1.6.** Niveles de elevación de los paleolagos existentes en el Altiplano de acuerdo a Placek et al. (2006).....15

CAPITULO 2. RELACIONES FILOGENETICAS EN *BIOMPHALARIA* PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE): REPOSICIONAMIENTO DE TAXA E IDENTIFICACION DE UN NUEVO CLADO AL INTERIOR DEL GENERO.

- Figura 2.1.** Localidades de muestreo de poblaciones de *Biomphalaria* del Altiplano Sur.....33

Figura 2.2. Arbol de consenso de mayoría obtenido del análisis de máxima parsimonia utilizando la matriz combinada de 90 secuencias. Los números en los nodos indican los valores de soporte bootstrap (sólo se muestran los valores superiores a 50%).....42

Figura 2.3. Arbol obtenido del análisis maximum likelihood utilizando la matriz combinada de 90 secuencias.....43

Figura 2.4. Arbol de consenso obtenido mediante inferencia bayesiana utilizando la matriz de 90 secuencias.....44

Figura 2.5. Reconstrucción de los tiempos de divergencia entre linajes de *Biomphalaria* estimados utilizando una tasa de sustitución de 1.9% por millón de años para el locus 16S. Los números en los nodos representan millones de años.....52

CAPITULO 3. MONOPHYLY, CANDIDATE SPECIES AND VICARIANCE IN POPULATIONS OF FRESHWATER SNAILS OF THE GENUS BIOMPHALARIA PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) FROM THE SOUTHERN ALTIPLANO.

Figure 3.1. Sampling localities of *Biomphalaria* populations within the closed basins in the southern Andean Altiplano.....77

Figure 3.2. Consensus tree (majority rule) obtained by the maximum parsimony analyses using mtDNA COI sequences. Numbers at the nodes indicate the bootstrap support values (only values above 50% are given).....82

Figure 3.3. Tree obtained by the maximum likelihood analyses using mtDNA COI sequences. Numbers at the nodes indicate the posterior probabilities obtained in the bayesian analysis (only values above or equal to 0.95 are given). Divergence times are given in parenthesis.....83

Figure 3.4. Mapping of localities upon a maximum likelihood tree reconstructed with COI sequences (HKY85 + G + I model). In the left corner of the figure are shown the drainage basins from the southern Altiplano.....88

CAPITULO 4. VARIACION MORFOLOGICA Y GENETICA EN POBLACIONES DEL GENERO *BIOMPHALARIA* PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE) DE DOS SISTEMAS EVAPORITICOS DEL ALTIPLANO CHILENO: ¿DISPERSION O DIFERENCIACION A ESCALA MICROGEOGRAFICA?

Figura 4.1. Localidades (vertientes) de muestreo en el Salar de Carcote y Salar de Ascotán.....104

Figura 4.2. Imagen de la morfología externa de la concha de *Biomphalaria* (A: lado derecho, B: lado ventral, C: lado izquierdo) mostrando las nueve variables lineales medidas en el presente estudio.....105

Figura 4.3. Arbol obtenido del análisis de máxima parsimonia utilizando secuencias de mtDNA COI. Los números en los nodos indican los valores de soporte bootstrap (se entregan sólo los valores superiores a 50%).....111

Figura 4.4. Red de haplotipos COI obtenidos de caracoles muestreados en el Salar de Carcote y Salar de Ascotán. Se muestran los clados obtenidos mediante el análisis filogenético.....112

Figura 4.5. Representación gráfica de las medidas de la concha de ejemplares de *Biomphalaria* obtenidas de poblaciones del Salar de Carcote y Salar de Ascotán en función de las dos primeras componentes principales.....113

**Relaciones filogenéticas y biogeografía histórica de los caracoles de
agua dulce del género *Biomphalaria* Preston, 1910 (Mollusca:
Planorbidae) del Altiplano Sur**

Por

Gonzalo Andrés Collado Inzulza

RESUMEN

En el presente trabajo se examinan las relaciones filogenéticas y los procesos biogeográficos que han moldeado la distribución de los caracoles de agua dulce del género *Biomphalaria* en el Altiplano Sur. En el primer capítulo se describen las características geomorfológicas de la región y se revisa el estatus actual del conocimiento taxonómico y sistemático del género *Biomphalaria*. En el segundo capítulo se examinan las relaciones filogenéticas entre especies del género para evaluar su monofilia y conocer la posición sistemática de las poblaciones altiplánicas utilizando secuencias de DNA nuclear de los transcritos internos de RNA ribosomal ITS1 e ITS2 y del gen mitocondrial de RNA ribosomal 16S. En el tercer capítulo se utiliza el gen mitocondrial de evolución más rápida citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) para examinar el papel de la vicarianza y la dispersión como mecanismos que promueven la diferenciación de los taxa. En el cuarto capítulo se utilizan técnicas filogenéticas y de morfometría multivariada para evaluar la influencia del aislamiento geográfico en la diferenciación a microescala geográfica de las poblaciones de caracoles confinados a pequeñas vertientes al interior de dos salares altiplánicos. En el quinto capítulo se discuten los principales hallazgos de esta tesis.

ABSTRACT

In this thesis I examine the phylogenetic relations and biogeographic process that have shaped the distribution of the populations of freshwater snails of the genus *Biomphalaria* from the southern Altiplano. In the first chapter I briefly describe the geomorphologic characteristics of the region and review the current state of the taxonomic and systematic knowledge of the genus *Biomphalaria*. The second chapter examines the phylogenetic relationships among species of the genus to evaluate its monophyly and to determine the systematic position of the Altiplano populations using nuclear ribosomal DNA sequences of the internal transcripts ITS1 and ITS2 and mitochondrial ribosomal DNA sequences of the 16S gene. In the third chapter I use the faster-evolving cytochrome oxidase subunit I (COI) locus to examine the role of vicariance and dispersion as mechanisms which promote the differentiation of taxa. In the fourth chapter I utilize phylogenetic techniques and multivariate morphometrics to evaluate the influence of geographic isolation in the differentiation at a microgeographic scale of the snail populations confined to springs within two Altiplano salt pans. Chapter fifth discusses the principal results of the study.

CAPITULO 1

INTRODUCCION GENERAL

1.1. Taxonomía y relaciones filogenéticas de *Biomphalaria*

Los caracoles del género *Biomphalaria* son moluscos pulmonados de agua dulce ampliamente distribuidos en Sudamérica, Caribe, América Central, sur de USA, Medio Oriente y Africa (Malek, 1985; Brown, 1994; DeJong et al., 2001; Campbell et al., 2000). Estos caracoles tienen importancia económica y médica debido a que varias especies son hospederos intermediarios del tremátodo parásito *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 que causa schistosomiasis en los seres humanos.

Los estudios taxonómicos en *Biomphalaria* han sido abordados principalmente a través de la morfología de la concha y anatomía del sistema reproductivo (Paraense, 1966, 1975, 1981, 1984, 1988, 2003; Valdovinos y Stuardo, 1991), pero ha habido dificultades en el reconocimiento de las especies debido a la similitud que presentan estos grupos de caracteres (Yong et al., 1991, 1995; Estrada et al., 2006). El uso de técnicas moleculares, principalmente basadas en análisis RFLPs, ha ayudado a la identificación y reconocimiento de especies (Caldeira et al., 1998, 2000; Spatz et al., 1999, 2000; Vidigal et al., 1998, 2002; Velásquez et al., 2002).

Las relaciones filogenéticas en *Biomphalaria* han sido estudiadas por Bandoni et al. (1995), Woodruff y Mulvey (1997), Campbell et al. (2000), Vidigal et al. (2000), DeJong et al. (2001) y Estrada et al. (2006). Producto de estos análisis se ha postulado un origen neotropical para *Biomphalaria* (Bandoni et al., 1995; Woodruff y Mulvey, 1997; Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001), propuesta que difiere del origen Gondwánico previamente hipotetizado (Pilsbry, 1911; Davis, 1980). El número de

especies de *Biomphalaria* no se conoce con exactitud, aunque actualmente se reconocen 30-35 especies válidas del género (DeJong et al., 2001; Estrada et al., 2006; Jørgensen et al., 2007). Del total de especies propuestas, sólo 23 fueron incluidas en el estudio filogenético más inclusivo realizado hasta ahora en *Biomphalaria* (DeJong et al., 2001) (Fig. 1.1). De acuerdo a estos autores, varios “linajes basales”, incluyendo *B. peregrina* y *B. helophila*, intercambiaron posiciones en las ramas iniciales del árbol, por lo que no hubo resolución sobre el origen del grupo. Los autores también infirieron un clado rico en especies neotropicales, otro conformado por *B. glabrata* y las derivadas especies africanas, y dentro de este clado un complejo de especies del río Nilo. Sin embargo, a pesar de estos importantes hallazgos, la sistemática filogenética del grupo puede ser considerada en estado de flujo debido a que las especies descritas para Chile y el Altiplano Sur no han sido incluidas en este tipo de investigaciones.

En Chile, incluyendo el Altiplano Sur, las poblaciones de *Biomphalaria* han sido asignadas a diferentes especies, variando la clasificación según los autores. De acuerdo a Paraense (1966), todas las especies nominales propuestas hasta esa fecha en Chile serían sinónimos de *B. peregrina*. Para las regiones de Arica-Parinacota y Tarapacá se han citado dos especies del género (Nicosia y Gaete, 2003). De acuerdo a Sielfeld (2001) existirían cuatro especies válidas de *Biomphalaria* en el país (Tabla 1.1.). La recopilación realizada por Valdovinos (1999) permitió reconocer 10 especies del género, pero en un estudio más reciente este autor informó de sólo siete (Valdovinos, 2006) (Tabla 1.2.). La superposición de taxa entre estos dos últimos estudios es cuatro especies. En el presente estudio las relaciones filogenéticas de *Biomphalaria* serán examinadas en un contexto global utilizando secuencias de DNA nuclear de las regiones

ribosomales ITS1 e ITS2 y DNA mitocondrial de los genes 16S y citocromo oxidasa subunidad 1.

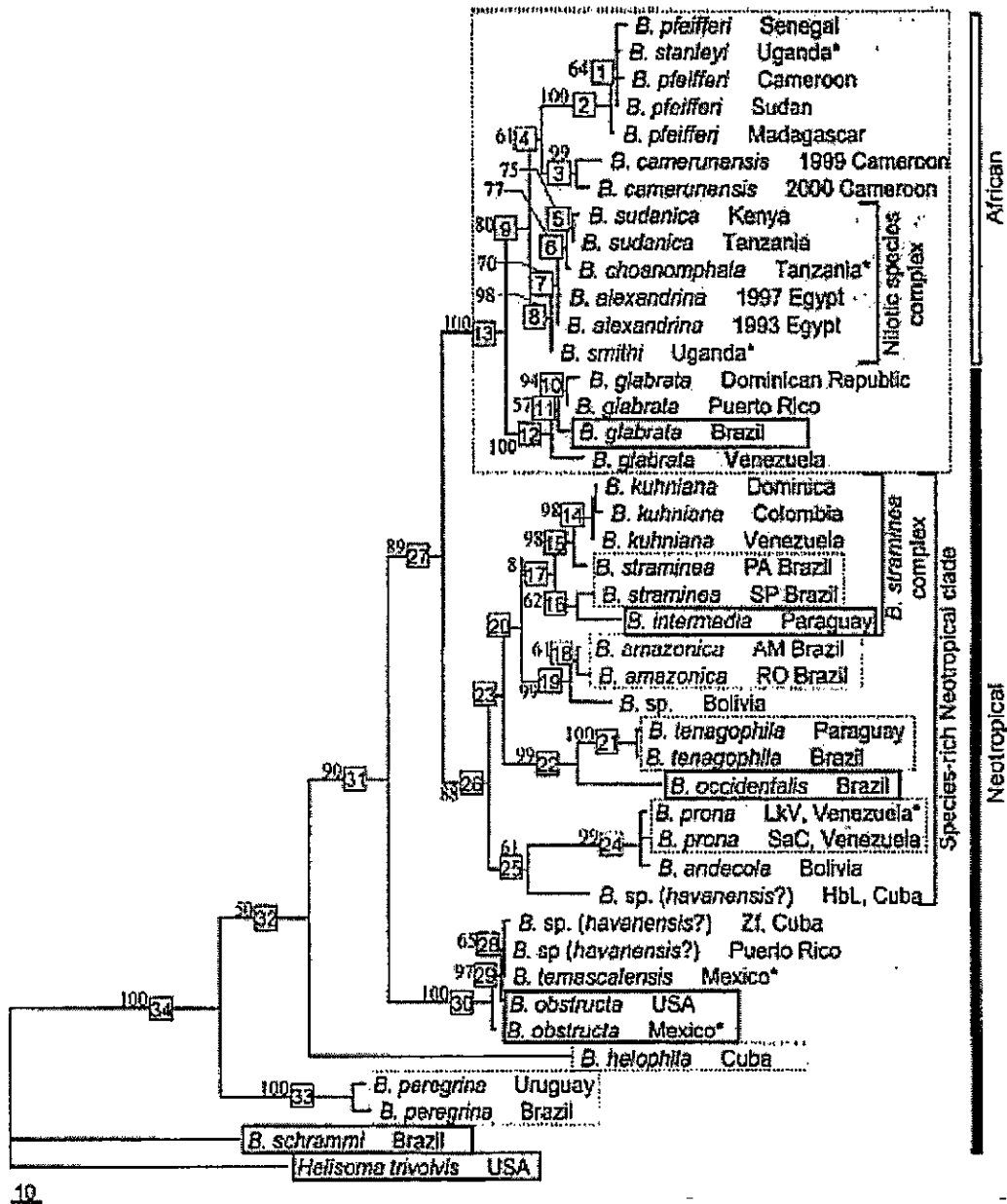


Figura 1.1. Hipótesis filogenética postulada por DeJong et al. (2001). El árbol constituye uno de los 234 árboles igualmente parsimoniosos construido a partir de matrices combinadas de secuencias (16S, ITS1 e ITS2). La topología es idéntica al árbol ML.

Tabla 1.1. Especies del género *Biomphalaria* Preston, 1910 citadas para Chile y el Altiplano Sur de acuerdo a Sielfeld (2001).

Espece	Localidad
<i>B. peregrina</i> (d'Orbigny, 1835)	Chile central
<i>B. costata</i> (Biese 1951)	Salar de Carcote (=Salar San Martín)
<i>B. thermala</i> (Biese 1951)	Salar de Ascotán
<i>B. aymara</i> Valdovinos & Stuardo 1991	Isluga

Tabla 1.2. Especies del género *Biomphalaria* Preston, 1910 citadas para Chile y el Altiplano Sur de acuerdo a Valdovinos (2006).

Espece	Localidad
<i>B. atacamensis</i> (Biese 1951)	Río Copiapó
<i>B. chilensis</i> (Antón 1839)	Valparaíso al Río Puelo
<i>B. schmiererianus</i> (Biese 1951)	Río Elqui a Río Illapel
<i>B. montana</i> (Biese 1951)	Río Hurtado (Provincia de Coquimbo)
<i>B. costata</i> (Biese 1951)	Salar de Carcote (=Salar San Martín)
<i>B. thermala</i> (Biese 1951)	Salar de Ascotán
<i>B. aymara</i> Valdovinos & Stuardo 1991	Isluga (Altiplano chileno)

1.2. Clasificación de *Biomphalaria*

El género *Biomphalaria* pertenece a la clase gasterópoda del Phylum Mollusca. Los gasterópodos, del griego *gaster*, vientre + *podos*, pie, son los típicos caracoles provistos de una concha que encierra las partes blandas cuando el animal se encuentra retraído en su interior. Esta clase está formada por tres subclases, Opisthobranquia, Prosobranquia y Pulmonata. Los opisthobranquios son exclusivamente marinos, consistiendo de nudibranquios y liebres de mar, caracterizados por la ausencia de una concha visible externamente y la presencia de branquias expuestas. Los prosobranquios son moluscos con bránquias internas cuyo nombre significa literalmente branquias adelante del corazón. Estos gasterópodos son fundamentalmente marinos, aunque contienen numerosos representantes en aguas continentales. Los pulmonados son gasterópodos hermafroditas exclusivamente continentales, con uno a dos pares de tentáculos y que respiran por pulmones. Dentro de la Subclase Pulmonata hay dos órdenes, Stylomatophora y Basommatophora. Los Stylomatophora tienen dos pares de tentáculos retráctiles en la cabeza con ojos en los extremos distales de los tentáculos superiores. La concha puede o no estar presente. En los Basommatophora la cabeza tiene un par de tentáculos no retráctiles con ojos en la base. Siempre presentan concha y las aberturas sexuales de ambos sexos están separadas. Son representantes de agua dulce. De acuerdo a Sielfeld (2001), el orden Basommatophora, al cual *Biomphalaria* se encuentra adscrito, incluye cinco familias en Chile: Ancyliidae, Planorbidae, Physidae, Lymnaeidae y Chilinida. Los caracoles *Biomphalaria* pertenecen a la familia Planorbidae y son sus únicos representantes en Chile. Presentan concha planispiral y tentáculos con ojos en la parte interna de sus bases. A nivel de subfamilia *Biomphalaria* pertenece a los Planorbinae.

1.3. El Altiplano

El altiplano sudamericano es una extensa depresión intermontañosa encerrada por las cordilleras Occidental y Oriental de Los Andes centrales que abarca el sector oriental del norte de Chile, gran parte de Bolivia, el centro y sur del Perú y el noroeste argentino (Fig. 1.2). El altiplano constituye la segunda planicie más alta del mundo, con cerca de 2000 km de largo y 200 km de ancho, extendiéndose entre los 14-23° de latitud Sur y 66-71° de longitud Oeste con altitudes que varían de 3.700 a 4.600 m (Lavenue et al., 1984; Argollo y Mourguiart, 2000; Placzek et al., 2006). El altiplano presenta un clima tropical semiárido a árido, con una estación lluviosa corta (diciembre-marzo) y una larga estación seca (abril-noviembre) (Silvestre et al., 1999) que dan cuenta de una precipitación anual que varía de 700 mm en el norte a menos de 100 mm en el sur y rangos de temperatura que oscilan entre -20°C en las noches invernales a 20 °C durante el día en el verano (Fornari et al., 2001). Las precipitaciones caen principalmente entre los meses de diciembre y febrero a través del llamado “Invierno Altiplánico” (Hurlbert y Chang, 1984). Sin embargo, aunque estas pueden no alcanzar el área altiplánica suroccidental, es posible que lleguen a través de escorrentías o por infiltración subterránea (Keller y Soto, 1998).

Determinar con exactitud los períodos de elevación del Altiplano ha sido una tarea difícil de realizar existiendo diferentes interpretaciones entre los autores. Marshall y Sempere (1993) mencionan que la elevación del Altiplano se inició aproximadamente 60 millones de años atrás (Ma), presentando una fase de rápido alzamiento entre 20 y 30 Ma. Se ha estimado que la Cordillera Oriental de Los Andes alcanzó el 33% de su altura actual entre inicios y mediados del Mioceno y el 50% hace 10 Ma. La planicie altiplánica tendría una historia similar, alcanzando 25-30% de su elevación actual en los

inicios del Mioceno y el 50% hace 10 Ma, con incremento rápido en el Plioceno (2-5 Ma), alcanzando elevaciones modernas alrededor de 2.7 Ma (Gregory-Wodzicki, 2000) (Fig. 1.3). Por otro lado, Ghosh et al. (2006) estimaron que el Altiplano se elevó a una tasa promedio de 1.03 ± 0.12 milímetros por año entre 10.3 y 6.7 Ma, alcanzando su altitud moderna entre 6.7 y 5.8 Ma.

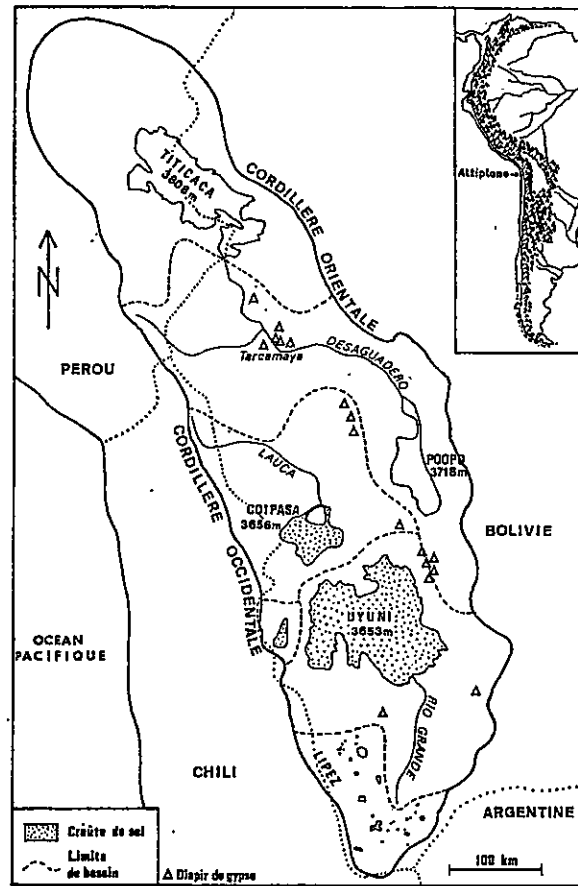


Figura 1.2. El altiplano y las principales cuencas hidrológicas según Risacher (1992).

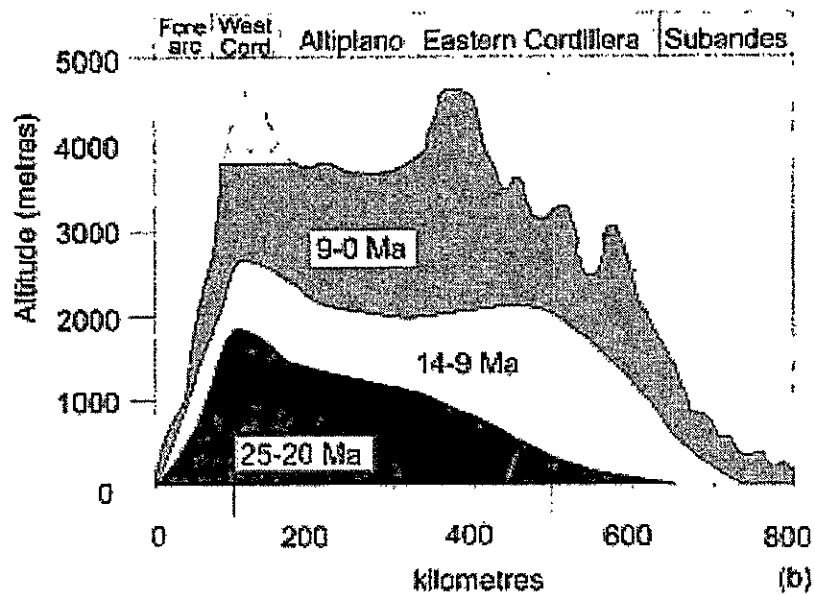


Figura 1.3. Elevación estimada a través del tiempo para la Cordillera Occidental, Altiplano y la Cordillera Oriental vista en sección transversal desde Oeste a Este. Reconstrucción realizada por Hartley (2003).

El Altiplano Central está compuesto por una variedad de cuencas hidrológicas, la mayoría de las cuales son de características endorreicas (Lavenu et al., 1984). Al norte se ubica el lago Titicaca, el más alto del mundo (3.808 msnm) y que se extiende por cerca de 8.560 km² (Risacher, 1992). Este lago descarga en el lago Poopo (3.718 m; 2.300 km²; 2,5 m de profundidad) por intermedio del río Desaguadero. La siguiente cuenca de 2.500 km² de superficie se ubica más al sur, es el Salar de Coipasa (3.656 m), que ocasionalmente recibe aportes del lago Poopo. En la zona norte del salar existe un lago permanente alimentado por el río Lauca. Más al sur la depresión central del Altiplano es ocupada por el salar más grande del mundo, el Salar de Uyuni (3.653 m), que tiene una superficie de 10.000 km² (Risacher, 1992). En el Altiplano Sur

correspondiente a territorio chileno se han descrito 33 cuencas endorreicas (Montti y Henríquez, 1972) que han sido clasificadas en dos tipos, las hidrológicamente cerradas, cuyo único mecanismo de descarga es la evaporación, y las hidrológicamente abiertas, las cuales son superficialmente cerradas, pero presentan comunicación subterránea con cuencas aledañas.

Durante el Pleistoceno en el Altiplano existieron grandes paleolagos por sobre los 3.650 msnm, los cuales integraron numerosas cuencas hidrográficas aisladas en la actualidad (Servant y Fontes, 1978; Lavenú et al., 1984; Clapperton, 1993; Sylvestre et al., 1999; Fornari et al., 2001; Placzek et al., 2006). Estos lagos se caracterizaron por presentar fluctuaciones en el nivel de agua que llevaron a expansiones y regresiones de sus costas, lo que ha sido explicado por cambio climático (cambios en la circulación atmosférica y deglaciación) (Fornari et al., 2001). Lavenú et al. (1984) describieron los lagos Mataro y Cabana con estimaciones tentativas en el Plioceno-Pleistoceno para el primer caso y Pleistoceno medio en el segundo. El nivel del lago Mataro se desarrolló a una altura de 3.950 msnm cubriendo lo que es hoy el lago Titicaca y se extendió hacia la zona sur del Altiplano. Este paleosistema fue el que abarcó la máxima extensión conocida. Posterior a este se desarrolló el paleolago Cabana durante el Pleistoceno medio y cuya superficie alcanzó 3.900 msnm. Servant y Fontes (1978) identificaron el paleolago Ballivian en el Altiplano norte a una altura de 3.860 msnm, durante el Pleistoceno medio-inferior. Contemporáneo a este sistema, en el Altiplano centro sur se desarrolló el lago Escara, identificado y fechado por Fornari et al. (2001) en 190.000 años. La superficie de este sistema se ubicó a 3.780 msnm. Hacia fines del Pleistoceno se desarrolló el lago Minchin, sistema datado entre 72.000 y 32.000 años (Servant y Fontes, 1978; Fornari et al., 2001) y que alcanzó 3.825 msnm. Fontes y Servant (1976)

describieron el lago Tauca, el último gran paleolago conocido. Fue datado entre 12.200 y 16.500 años, con una superficie ubicada a 3.815 msnm (Mourgiart et al., 1997), y un máximo nivel alcanzado hace 13.200 años (Sylvestre et al., 1999). La formación Coipasa se desarrolló al final de la era glacial y su superficie alcanzó 3.656 msnm (Fornari et al., 2001). En un estudio más reciente, Placzek et al. (2006) mediante fechados con radiocarbono y U-Th determinaron la edad de varios paleolagos altiplánicos, constituyendo las estimaciones más modernas realizadas hasta ahora en la región (Fig. 1.4-1.6). La fase lacustre Ouki tuvo aproximadamente 80 m de profundidad entre 120 y 98.000 años atrás. El lago Salinas se desarrolló entre 95 y 80.000 años, el lago Inca Huasi aproximadamente hace 46.000 años y el lago Sajsi entre 24 y 20.500 años. El lago Tauca, el más extenso paleolago existente durante los pasados 120.000 años según estos autores, fue datado entre 18.100 y 14.100 años. Este sistema alcanzó una extensión de 60.000 km² y una profundidad de 140 m. El último paleolago descrito por estos autores es el Coipasa, datado entre 13.000 y 11.000 años y con aproximadamente 55 m de profundidad. Placzek et al. (2006) también mencionan que el paleolago Minchin no habría existido y sería un término ambiguo.

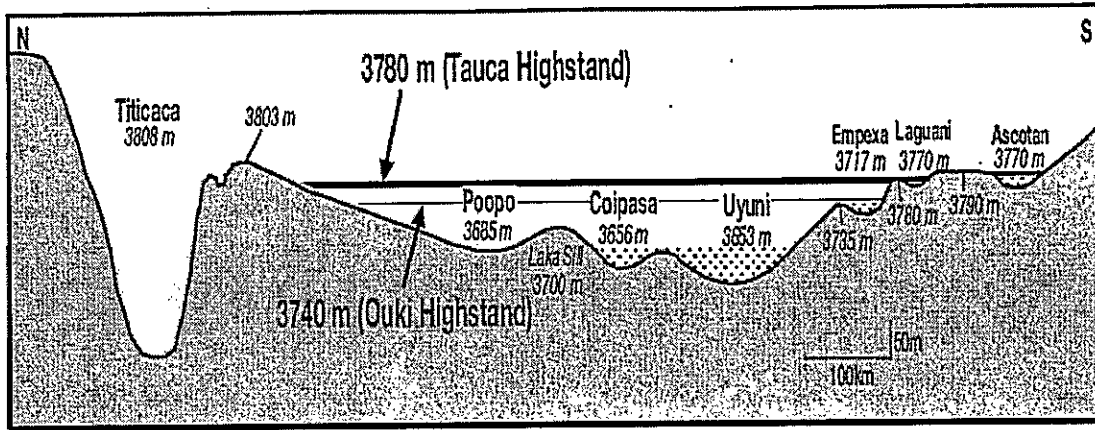


Figura 1.4. Sección transversal esquemática de las cuencas del Titicaca, Poopo, Coipasa y Uyuni de acuerdo a Placek et al. (2006).

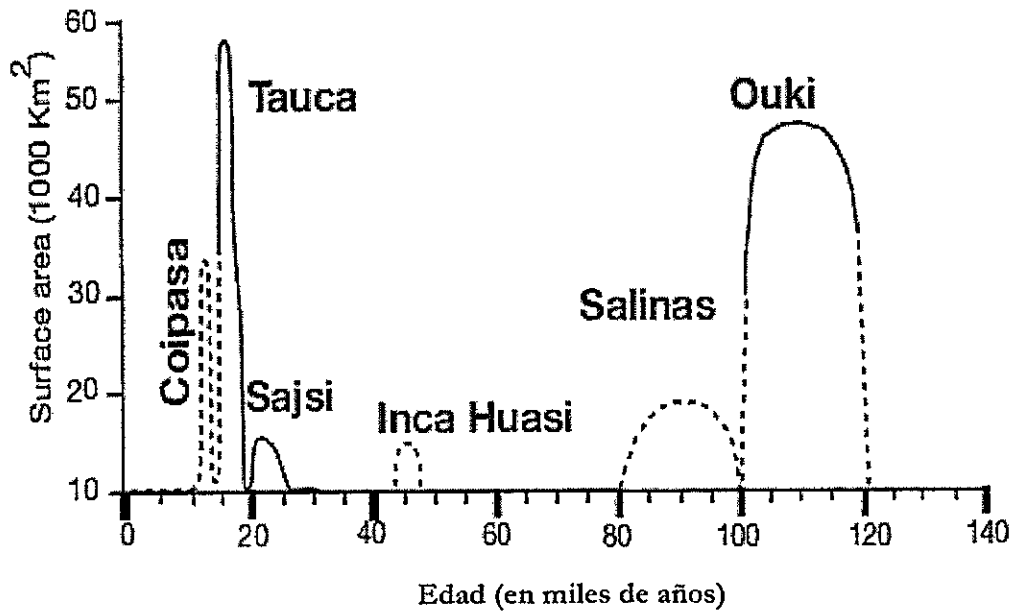


Figura 1.5. Paleolagos existentes en el Altiplano de acuerdo a Placek et al. (2006).

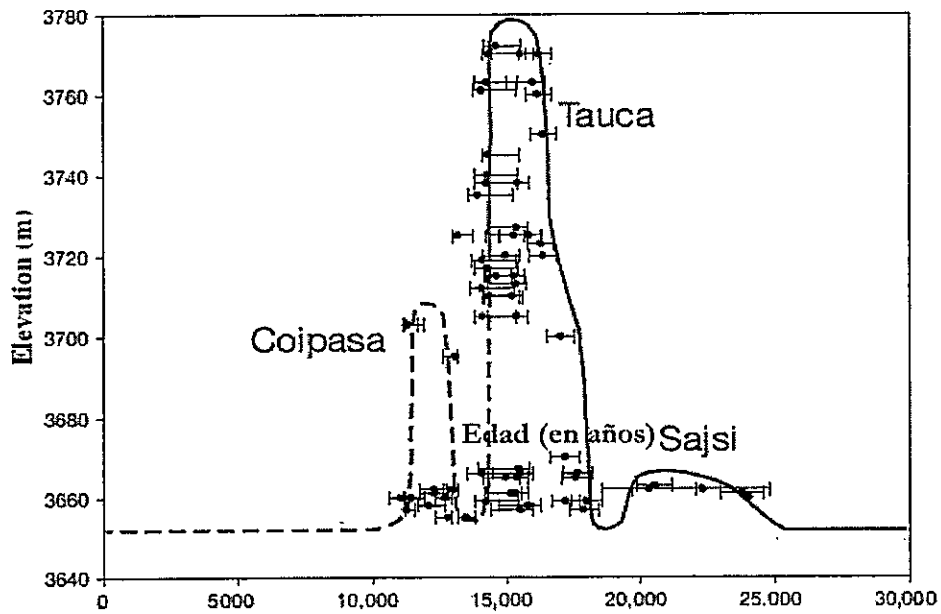
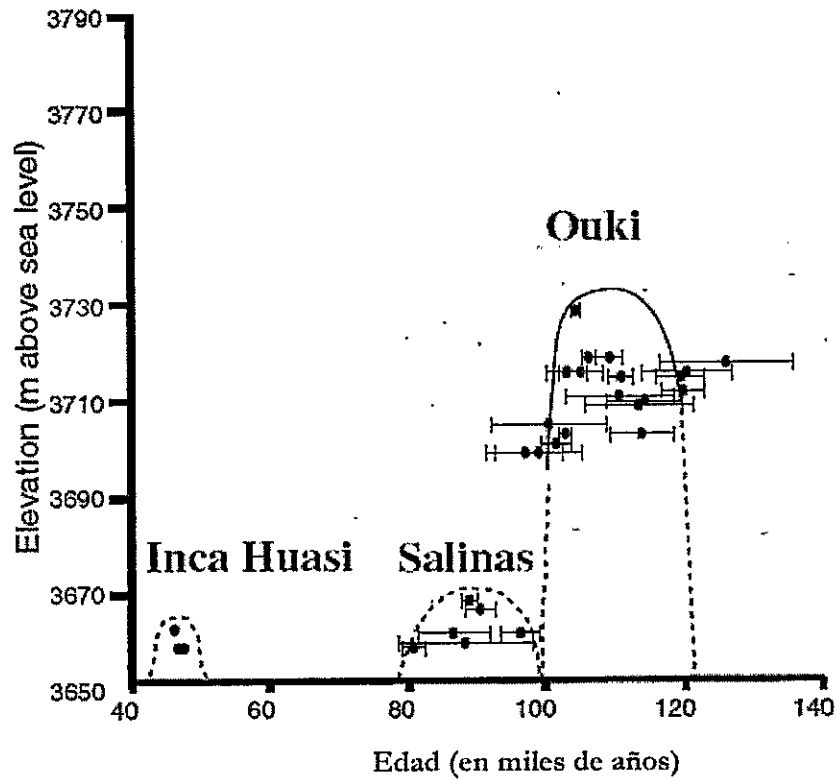


Figura 1.6. Niveles de elevación de los paleolagos existentes en el Altiplano de acuerdo a Placeck et al. (2006).

1.4. Mecanismos de diferenciación en gastrópodos de agua dulce

En especies de caracoles de agua dulce se han propuesto varios factores para explicar la diversidad de especies y la diferenciación que ocurre dentro y entre las poblaciones. Entre estos se pueden señalar las características del hábitat (Jarne y Delay, 1991), factores demográficos (Städler y Jarne, 1997), rasgos de historia de vida (Dejong et al., 2003; Liu et al., 2003), sistema de apareamiento (Jarne, 1995; Charbonnel et al., 2002; Mavárez et al., 2002a), prevalencia de parásitos (Charbonnel et al., 2002) y (vi) actividades humanas (Mavárez et al., 2002b; Campbell et al., 2000). La presente investigación se enmarca en la filogenia y filogeografía de los taxa de *Biomphalaria* del Altiplano Sur. En esta región es posible encontrar poblaciones de *Biomphalaria* habitando una diversidad de sistemas acuáticos. Por la inestabilidad asociada a este tipo de hábitat, fundamentalmente en relación a las fluctuaciones del nivel de agua que pueden provocar sequías e inundaciones catastróficas (Mavárez et al., 2002b), las poblaciones de caracoles de agua dulce están propensas a sufrir procesos demográficos tales como cuellos de botella, extinciones y recolonizaciones (Charbonnel et al., 2002; Dejong et al., 2003). Se ha informado también que la fragmentación del hábitat, sumado a procesos demográficos, puede llevar a una alta diferenciación genética entre las poblaciones de caracoles de agua dulce (McCauley, 1991; Dejong et al., 2003; Mavárez et al., 2002b). De acuerdo a Johnson (2005), en organismos acuáticos la fragmentación del hábitat potenciaría la fragmentación de las poblaciones debido a que "hábitats adecuados frecuentemente están inmersos dentro de ambientes terrestres inadecuados". En gasterópodos se ha descrito también que las especies acuáticas que han sido fraccionadas por barreras terrestres son grupos propensos a la diferenciación debido a que estarían incapacitados de moverse entre sistemas aislados (Liu et al., 2003). De

acuerdo a lo anterior, es esperable que en el Altiplano Sur la diversidad de especies sea mayor que la reconocida hasta ahora.

Los rasgos de historia de vida también pueden influir en la estructura genética de los caracoles de agua dulce (Städler y Jarne, 1997). Para el género *Pyrgulopsis*, cuyo ciclo de vida es enteramente acuático, con desarrollo directo y capacidad de dispersión limitada (Liu et al., 2003), se han descrito más de 120 especies en los sistemas hídricos aislados de California, Nevada y México. De acuerdo a O'Brien y Blinn (1999) los ecosistemas de vertientes del desierto de Cuatro Ciénegas en México constituyen cunas de endemismo para *Pyrgulopsis* debido al aislamiento geográfico prolongado que ha existido entre los sistemas hídricos. Las especies de *Biomphalaria*, además de ser organismos acuáticos con vagilidad limitada, son hermafroditas, por lo que potencialmente pueden reproducirse tanto por fertilización cruzada como autofertilización (Städler y Jarne, 1997). En *Biomphalaria* el desarrollo es del tipo directo (Observación personal). Los adultos ponen cápsulas de huevos sobre un substrato en cuyo interior ocurre el desarrollo temprano y los estados larvales trocófora y veliger, por lo que existe ausencia de fase planctónica. Los juveniles posteriormente eclosionan como adultos en miniatura. De acuerdo a Campbell et al. (2000), esta estrategia reproductiva permitiría la formación de demos aislados y semiaislados en estos caracoles, un tipo de estructura poblacional que probablemente acelera la diferenciación y especiación entre las poblaciones. Además, la habilidad de autofertilización de *Biomphalaria* es un factor que influye en el éxito de colonización y recolonización de hábitats (Woodruff y Mulvey, 1997). De acuerdo a estos antecedentes, es esperable que *Biomphalaria* en el Altiplano Sur sea un grupo de naturaleza especiosa o esté propenso a la diferenciación, tal como ha sido notado por

Campbell et al. (2000) para otras especies neotropicales del género. Para las vertientes occidentales del Altiplano Sur la historia más reciente indica que durante el Cuaternario la región fue objeto de una intensa actividad volcánica y sedimentaria que afectó los extensos sistemas lacustres que evolucionaron a cuencas evaporíticas de diverso tamaño, procesos que aún se encuentran en desarrollo. En la actualidad, estas cuencas constituyen ambientes aislados generalmente delineados por cadenas de volcanes que alcanzan 4000-6500 m de altura (Risacher et al., 2003) y cuya depresión central es ocupada por numerosos sistemas hídricos (ríos, arroyos, lagos, lagunas, vertientes, bofedales y salares) con propiedades físicas y químicas variables (Vila, 1975; Mühlhauser et al., 1995; Dorador et al., 2003; Risacher et al., 2003) que han limitado el tipo y rango de distribución de la biota (Keller y Soto, 1998; Martínez et al., 1999; Márquez-García et al., 2009). Lo anterior, asociado al aislamiento de las cuencas endorreicas, sugiere aislamiento de la biota que habita estos sistemas hidrológicos. De hecho, se ha postulado que las poblaciones de peces del género *Orestias* Valenciennes, 1839 fueron fragmentadas en múltiples subpoblaciones total o parcialmente aisladas (Northcote, 2000; Lüssen et al. 2003; Vila, 2006), lo que ha sido asociado a los cambios geológicos y muy particularmente a la variación en los niveles de agua de las cuencas hidrográficas que permitieron su dispersión a través de los lagos pleistocénicos y las cuencas respectivas (Villwock y Sienknecht, 1996; Parker y Kornfield, 1995; Keller y Soto, 1998; Northcote, 2000; Lüssen et al., 2003; Vila, 2006; Morales, 2009; Scott, 2010). Las características acuáticas de *Biomphalaria* hacen que el ciclo de vida de estos caracoles esté directamente relacionado con la evolución de los sistemas hidrológicos existentes en el área. Si bien los mecanismos que promueven la divergencia de las poblaciones de *Biomphalaria* en la región altiplánica no han sido investigados, el

registro fósil revela su presencia al menos desde la formación Ouki (Placzek et al., 2006). Esto sugiere, como en el caso de *Orestias*, que la presencia de *Biomphalaria* en la región puede ser atribuida a los grandes cuerpos de agua presentes a fines del Pleistoceno y sería esperable que la diferenciación de las poblaciones haya sido también estimulada por procesos vicariantes. -

1.5. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Antecedentes. Los caracoles de agua dulce del género *Biomphalaria* se distribuyen en América, África y Medio Oriente, siendo las especies neotropicales las que alcanzan una mayor diversidad y para las cuales existe un mayor grado de conocimiento. Un grupo que ha recibido poca atención lo constituyen las poblaciones neotropicales de *Biomphalaria* del Altiplano Sur. Esta región altoandina ha sido fuertemente afectada por eventos geológicos, vulcanismo, sedimentación y fluctuaciones climáticas durante el Cuaternario, lo que ha influenciado la dispersión de la biota de agua dulce (Northcote, 2000; Lüssen et al., 2003; Vila, 2006). En organismos acuáticos, la fragmentación del hábitat probablemente potencia la diferenciación de las poblaciones debido a que ambientes adecuados frecuentemente se encuentran en ambientes terrestres inutilizables, y el flujo génico dependerá de las capacidades de dispersión de los organismos (Johnson, 2005). El conocimiento sistemático de las poblaciones de *Biomphalaria* restringidas al Altiplano Sur se encuentra en estado alfa debido a que existen poblaciones recientemente descubiertas no descritas, el número de especies varía en función de los autores y se desconocen sus relaciones de parentesco.

Hipótesis 1. Las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* constituyen un grupo monofilético y estarían más estrechamente relacionadas con especies neotropicales que africanas del género. De esta hipótesis se espera que las especies altiplánicas compartiesen un ancestro común con taxa distribuidos en la región neotropical.

Hipótesis 2. La estructura filogenética de las poblaciones de *Biomphalaria* del Altiplano Sur es congruente con la división fisiogeográfica de la región. De esta

hipótesis se espera que la topología de un árbol filogenético refleje grupos monofiléticos (linajes) circunscritos a las cuencas hidrográficas donde los caracoles fueron muestreados.

Antecedentes. En el Altiplano Sur es posible encontrar una variedad de subsistemas hídricos al interior de cuencas hidrográficas y cuyas propiedades físicas, químicas y biológicas no son homogéneas (Chong, 1988; Risacher y Fritz, 1991; Keller y Soto, 1998). Ejemplos de estos hábitats lo constituyen el Salar de Ascotán y Salar de Carcote, en cuyo interior existen una serie de vertientes que presentan un aparente grado de aislamiento y donde es posible encontrar caracoles *Biomphalaria*. Estas condiciones de aislamiento acopladas al ciclo de vida acuático, desarrollo directo y vagilidad limitada hacen a *Biomphalaria* un modelo adecuado para estudiar la divergencia evolutiva dentro y entre las poblaciones restringidas a estos ambientes particulares. En los peces del género *Orestias* se han encontrado dos taxa distintos, uno correspondiente al Salar de Ascotán (*O. ascotanensis*) y otro correspondiente al Salar de Carcote (*O. sp.*) (Morales, 2009; Scott, 2010). Adicionalmente, ambos taxa presentan una alta estructura poblacional al interior de cada salar (Morales, 2009). Como en el caso de *Orestias*, los caracoles *Biomphalaria* restringidos a estos sistemas pueden presentar un grado similar de diferenciación.

Hipótesis 3. Las poblaciones de *Biomphalaria* restringidas a las vertientes del Salar de Carcote y Salar de Ascotán presentan una alta estructura poblacional considerando las barreras terrestres que aíslan parcialmente estos sistemas hídricos. De esta hipótesis se espera observar una alta divergencia genética y morfológica entre salares y entre vertientes al interior de cada salar.

1.5. Objetivos

Objetivo general

Entender los factores que promovieron y promueven la diferenciación entre taxa de *Biomphalaria* del Altiplano Sur, tanto a escala espacial como temporal.

Objetivos específicos

- 1) Examinar las relaciones filogenéticas del género *Biomphalaria* utilizando secuencias de DNA nuclear y mitocondrial.
- 2) Proponer para las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* una clasificación basada en el Concepto Filogenético de Especie.
- 3) Examinar la estructura genética y morfológica en poblaciones de *Biomphalaria* del Salar de Ascotán y Salar de Carcote.

CAPITULO 2

ARTÍCULO PARA SER SOMETIDO A LA REVISTA

MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION

**RELACIONES FILOGENETICAS EN *BIOMPHALARIA*
(MOLLUSCA: PLANORBIDAE): REPOSICIONAMIENTO DE
TAXA E IDENTIFICACION DE UN NUEVO CLADO AL
INTERIOR DEL GENERO**

Gonzalo. A. Collado y Marco. A. Méndez

Laboratorio de Genética y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las

Palmeras 3425, Ñuñoa, Chile. g.collado@eudoramail.com; mmendez@uchile.cl

Resumen

La taxonomía y filogenia de los caracoles del género *Biomphalaria* se encuentran en estado de flujo. En el presente estudio utilizamos secuencias originales y previamente publicadas del gen mitocondrial de RNA ribosomal 16S y de las regiones nucleares ITS1 e ITS2 para construir filogenias utilizando como outgroup una especie de *Helisoma*. Si bien los análisis separados produjeron árboles que compartieron la mayoría de los clados, el análisis combinado recuperó la filogenia más resolutive y soportada. Hipotetizamos que después de un evento cladogenético ocurrido a fines del Mioceno en una especie ancestral de *Biomphalaria* surgieron dos clados principales, uno diverso que incluye la mayoría de las especies neotropicales, todas las africanas y *B. helophila* como su grupo hermano, y otro exclusivamente neotropical, identificado en este estudio, consistiendo de *B. peregrinal* *B. oligoza* más taxa altiplánicos. Los tiempos de divergencia entre linajes basales al interior del clado de mayor diversidad fueron estimados en el Plioceno temprano. La divergencia al interior del nuevo clado neotropical fue trazada hasta el Pleistoceno medio y tardío. Los análisis moleculares apoyan el reconocimiento de las especies nominales *B. thermalis* y *B. costata* previamente sinonimizadas con otros taxa sudamericanos utilizando caracteres morfológicos y sugieren que *B. schrammi* no forma parte de *Biomphalaria*.

Introducción

Los caracoles de agua dulce del género *Biomphalaria* Preston, 1910 se encuentran ampliamente distribuidos en la región neotropical y africana. Dentro del grupo, algunas especies son hospederos intermediarios de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, un platelminto digeneo que causa schistosomiasis. Esta enfermedad afecta a más de 200 millones de personas en América, África y Medio Oriente (Allen et al., 2002; Campbell et al., 2000), produciendo graves daños económicos (WHO, 1993, 1998). En enfermedades producidas por parásitos transmitidos por hospederos intermediarios es de suma importancia conocer la diversidad de especies, distribución geográfica y origen de los organismos vectores por lo que estudios taxonómicos y filogenéticos en estos grupos son en extremo relevantes. La taxonomía en *Biomphalaria* ha sido abordada principalmente a través de la morfología de la concha y anatomía del sistema reproductivo (Paraense, 1966, 1975, 1981, 1984, 2003a; Valdovinos y Stuardo, 1991). Sin embargo, la similitud que presentan estos caracteres entre taxa ha dificultado la clasificación (Paraense, 1988; Estrada et al., 2006). Más recientemente, la incorporación de técnicas moleculares, basadas principalmente en análisis de RFLPs, ha ayudado a la identificación y reconocimiento de especies, esfuerzo que ha sido mayoritariamente concentrado en las especies que habitan el neotrópico (Caldeira et al., 1998, 2000; Spatz et al., 1999, 2000; Velásquez et al., 2002; Vidigal et al., 1998, 1999, 2000, 2001, 2002). En el último tiempo, el género *Biomphalaria* ha sido foco de intensos estudios filogenéticos principalmente por la importancia médica que tienen estos caracoles en relación al desarrollo de la schistosomiasis. El estudio de las relaciones filogenéticas ha sido abordado a través de aproximaciones moleculares (Bandoni et al., 1995; Woodruff y Mulvey, 1997; Campbell et al., 2000; Vidigal et al., 2000; DeJong et al., 2001 y

Estrada et al., 2006). En algunos de estos estudios se ha postulado un origen neotropical del género (Woodruff y Mulvey, 1997; Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001), propuesta que difiere del origen Gondwánico previamente postulado (Pilsbry, 1911; Davis, 1980). Es importante notar que de las 30-35 especies reconocidas en *Biomphalaria* (DeJong et al., 2001; Estrada et al., 2006; Jørgensen et al., 2007), sólo han sido analizadas filogenéticamente cerca del 60% del espectro de taxa. En análisis cladístico, un muestreo incompleto puede llevar a estimaciones erróneas de la filogenia de un grupo mientras que la incorporación de taxa no analizados previamente necesariamente producirá cambios en la topología de un árbol filogenético. El estudio filogenético más inclusivo en relación al número de especies consideradas de *Biomphalaria* incluyó 23 especies (DeJong et al., 2001). Estos autores infirieron un clado rico en especies neotropicales y recuperaron a *B. glabrata* como el grupo hermano de las especies africanas. Más importante aún, DeJong et al. (2001) corroboraron que un origen neotropical de *Biomphalaria* constituye la hipótesis más aceptable para el género. Sin embargo, a pesar de estos importantes hallazgos en términos de relaciones evolutivas, se desconoce la posición sistemática de poblaciones/especies no analizadas previamente desde el punto de vista filogenético, así como también la posición hasta ahora ambigua de algunos taxa en la filogenia restan por ser clarificadas. Por ejemplo, a niveles cercanos a la raíz de la filogenia de *Biomphalaria* las afinidades entre taxa son pobremente entendidas.

En el Altiplano Sur sudamericano existe una diversidad de sistemas hídricos aislados donde es posible encontrar poblaciones de caracoles *Biomphalaria* cuyas afinidades filogenéticas son desconocidas. A pesar de que en la región se han descrito las especies *Biomphalaria thermali* (Biese, 1951) del Salar de Ascotán, *B. costata*

(Biese, 1951) del Salar de Carcote y *B. aymara* Valdovinos y Stuardo, 1991 de los bofedales de Isluga, la taxonomía de estas especies y otras poblaciones del grupo recientemente descubiertas está lejos de ser estable. Por ejemplo, Malek (1985) considerando caracteres morfológicos argumentó que *B. thermalis* correspondería a *B. andecola* Orbigny 1835, especie que habita en Perú y Bolivia mientras para Paraense (1966) *B. costata* constituiría un sinónimo de *B. peregrina* Orbigny 1835, una especie ampliamente distribuida en Sudamérica. Ambas hipótesis hasta ahora no han sido evaluadas.

En este estudio obtuvimos secuencias de DNA del gen mitocondrial 16S rRNA y de las regiones transcritas internas ITS1 e ITS2 de los genes nucleares ribosomales de caracoles altiplánicos y otras especies de *Biomphalaria* para ser analizadas filogenéticamente en conjunto con secuencias disponibles en la literatura para especies del género. Los objetivos del presente estudio son 1) examinar las relaciones filogenéticas en *Biomphalaria* considerando la incorporación de nuevas secuencias en un análisis inclusivo y multilocus del grupo, 2) examinar la monofilia, posición sistemática y relación hacia el grupo hermano de las poblaciones/especies altiplánicas, y 3) evaluar la sinonimia de los taxa altoandinos.

Materiales y métodos

Grupos de datos

Para este estudio se compilaron todas las secuencias de DNA obtenidas por DeJong et al. (2001) disponibles en GenBank, las cuales comprenden 42 secuencias del gen mitocondrial 16S y 41 secuencias de las regiones transcritas internas ITS1 e ITS2 de los genes nucleares ribosomales. También incorporamos secuencias de los tres loci provenientes de diferentes autores (Tabla 1). La totalidad de secuencias incluidas en este estudio abarca gran parte del área de distribución del género. Para los análisis moleculares utilizamos como grupo externo la especie *Helisoma trivolvis* cuyas secuencias fueron obtenidas por DeJong et al. (2001). La elección como grupo externo de una especie de *Helisoma* se basó en análisis filogenéticos realizados previamente (Bandoni et al., 1995; DeJong et al., 2001; Morgan et al., 2002).

Obtención de muestras y extracción de DNA

En este trabajo obtuvimos caracoles de poblaciones de *Biomphalaria* distribuidas en el Altiplano Sur, los cuales fueron fijados en etanol absoluto. Los caracoles fueron muestreados con un cedazo desde macrófitas en localidades pertenecientes a seis cuencas hidrográficas cerradas ubicadas a más de 3.500 m de altura en el Altiplano Sur (Fig. 1). La cuenca Caquena incluyó cinco localidades (Visviri, Umaqui, Vioco, Colpa y Caquena) mientras que la cuenca Lauca siete (Parinacota, Chuviri, Piacota, Chibatambo, Lauca, Lauca Sur y Chungará). Las cuencas del Salar de Huasco, Isluga y Salar de Carcote incluyeron una localidad de muestreo. De la cuenca

del Salar de Ascotán obtuvimos secuencias de dos localidades. También se obtuvieron secuencias de la especie *B. peregrina* de La Plata, Argentina, a partir de muestras generosamente proporcionados por la Dra. Alejandra Rumi. El DNA genómico fue extraído utilizando el método de extracción CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) (Winnepennickx et al., 1993). Para esto se rompió la concha de los animales separándola de las partes blandas y una pequeña porción del tejido muscular del pie fue disecada y depositada en un tubo conteniendo 600 µl de 100 mM de Tris, 1.4 M de NaCl₂, 20 mM de ácido etilendiaminotetraacético, 2% CTAB, 0.2% de β-mercaptoethanol y 0.01 mg de Proteinasa K. Las muestras fueron maceradas e incubadas a 65°C por 40 min con agitación constante cada 15 min. Las proteínas y lípidos fueron removidos utilizando 300 µl de cloroformo mediante centrifugación a 13.000 rpm por 10 min. El DNA fue precipitado manteniendo las muestras en isopropanol frío por 30 min a 4°C y luego centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 min. Finalmente el DNA fue lavado en etanol 70%, secado y resuspendido en 50 µl de agua destilada.

Amplificación de DNA

Se obtuvieron secuencias parciales en 1-5 especímenes por cuenca y locus (Tabla 1). Para la amplificación mediante PCR del gen mitocondrial 16S se utilizaron los primers 16Sar (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') y 16Sbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') (Palumbi, 1996). La region nuclear ITS1 fue amplificada con los primers ETTS2 (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3) (Kane y Rollinson, 1994) e ITS1R (5'-ACGAGCGAGTGATCC ACCGC-3) (Vidigal et al., 2004). La región ITS2 fue amplificada con los primers ETTS1 (5'-TGCTTAAGTTC

AGCGGGT-3') (Kane & Rollinson, 1994) e ITS2F (5-CGTCCGTCTGAGGGTCGGTTTGC-3) (Vidigal et al., 2000a). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un volumen de reacción de 50 μ l con 0.8 unidades de TaqDNApolimerasa, 15 mM de MgCl₂, 200 μ M de dNTPs y 1 μ M de cada primer. El programa PCR para el gen 16S consistió de una denaturación inicial a 94°C por 60 s, 35 ciclos de amplificación (94°C por 40 s, 55°C por 50 s, 72° por 60 s) y una extensión final a 72° por 10 min. El programa PCR para las regiones nucleares consistió de una denaturación inicial a 95°C por 3 min, 34 ciclos de amplificación (95°C por 45 s, 54°C por 60 s, 72° por 2 min) y una extensión final a 72° por 5 min. Los productos amplificados fueron secuenciados a través de la empresa Macrogen. El estudio incorpora 33 secuencias originales para el locus 16S, 27 para ITS1 y 29 para ITS2 (Tabla 1).

Edición de secuencias y análisis filogenético

Las secuencias de DNA fueron editadas utilizando el programa BioEdit (Hall, 1999) y alineadas empleando el programa Clustal X (Thompson et al., 1997) con un ajuste final mediante inspección visual. Los porcentajes de divergencia entre las secuencias fueron calculadas utilizando el programa MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Para las reconstrucciones filogenéticas se utilizaron los métodos de Máxima Parsimonia (MP), Máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI). El análisis MP se realizó en el programa PAUP* (Swofford, 2003) empleando una búsqueda heurística utilizando el algoritmo TBR (tree bisection and reconnection) con adición de secuencias random y reteniendo 100 árboles en cada análisis. La confianza estadística de los nodos fue evaluada utilizando 100 pseudoréplicas "bootstrap" (Felsenstein, 1985). El análisis ML

se realizó en el programa PAUP* utilizando el mejor modelo evolutivo seleccionado bajo el Akaike Information Criterion (AIC) en el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). El análisis bayesiano se implementó en el programa MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) con el mejor modelo evolutivo seleccionado bajo el Bayesian Information Criterion (BIC) en jModelTest y se aplicó a los grupos de datos combinados. Se utilizó la aproximación condicional para evaluar si los distintos grupos o particiones de datos (16S, ITS1 e ITS2) tienen diferente señal filogenética, y de esta manera determinar si es posible que sean combinados en un único análisis filogenético. La congruencia entre grupos de datos fue evaluada por pares mediante la prueba ILD (incongruence length difference) (Farris et al., 1994) implementado en PAUP* como el "the homogeneity partition test", mediante 100 réplicas. Un valor P mayor o igual a 0.05 permite combinar los datos. Una forma alternativa de analizar dos o más grupos de datos es utilizar Evidencia Total, la cual permite combinar datos si estos se encuentran disponibles (Kluge, 1989). Los análisis de congruencia y Evidencia Total se realizaron adoptando dos estrategias adicionales. Una consistió en construir una matriz de datos que incluyó todos los taxa para los cuales las secuencias de los tres loci utilizados en este trabajo estaban disponibles. La segunda estrategia incluyó taxa para alguno de los cuales no había secuencias correspondientes a algunos loci. En este caso, los sitios en la matriz de datos de los taxa incompletos fueron tratados como "missing data". Esto ha mostrado aumentar la resolución filogenética sin llegar a producir resultados ambiguos (Wiens y Reeder, 1995; Wiens, 1998). El resultado de este procedimiento fue la obtención de una matriz de 67 secuencias concatenadas en el primer caso y una de 90 secuencias para el segundo, y en resultados y discusiones utilizaremos esta terminología

para describir este tipo de análisis. Los caracteres no informativos para parsimonia fueron excluidos de los análisis.

Tiempos de divergencia

Para estimar los tiempos de divergencia de los clados y linajes se construyó un árbol bajo inferencia bayesiana utilizando un reloj molecular estricto el programa BEAST (Drummond y Rambaut, 2007). La distancia de los taxa terminales existentes y de los ancestros hipotetizados a los nodos puede ser convertida en tiempos de divergencia si se dispone de una fecha de referencia (como un registro fósil o evento geológico) o una tasa de mutación conocida. En este estudio utilizamos una tasa de sustitución nucleotídica de 1.9% por millón de años para el gen 16S, valor promedio entre 1.6% y 2.2%/Ma, correspondiente al rango de tasa de divergencia de este gen determinada para invertebrados (Cunningham et al., 1992; Patarnello et al., 1996) y que fue usado por DeJong et al. (2001) para estimar tiempos divergencia entre *B. glabrata* y las especies africanas del grupo.

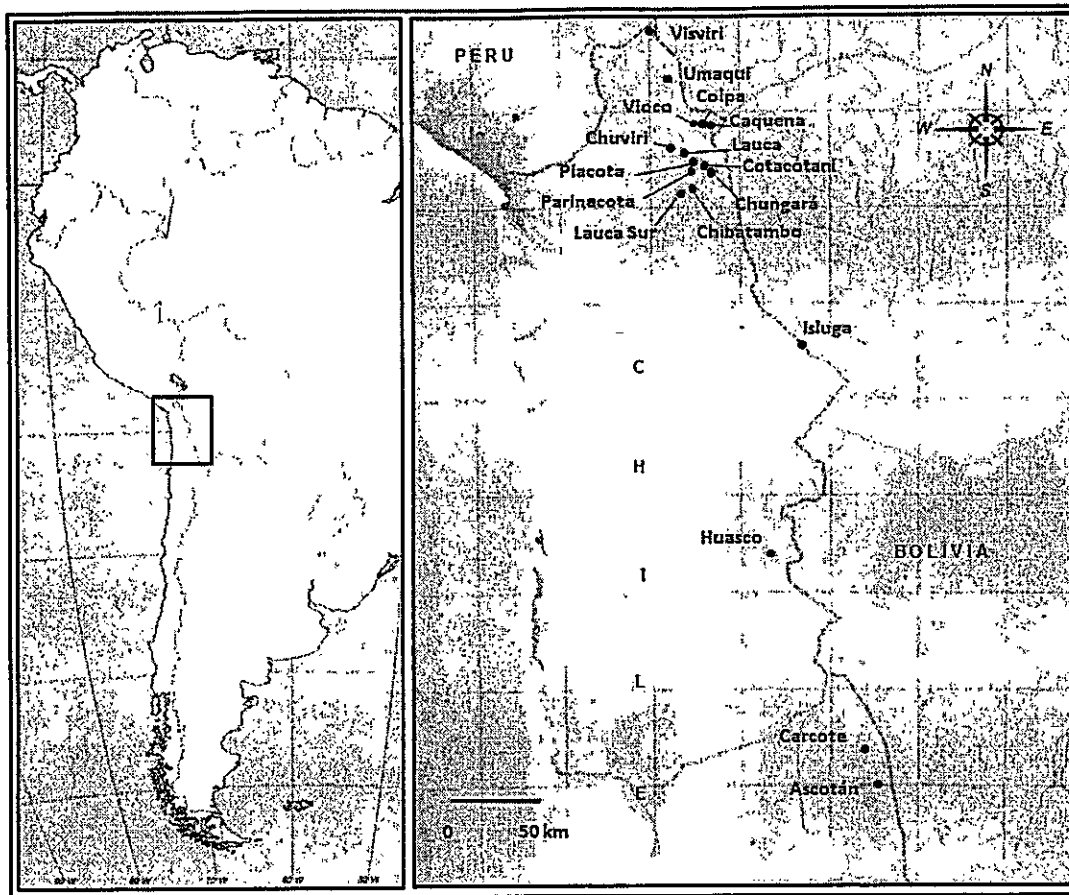


Figura 2.1. Localidades de muestreo de poblaciones de *Biomphalaria* del Altiplano Sur.

Tabla 2.1. Origen geográfico de las muestras de *Biomphalaria* y números de acceso GenBank de las secuencias de DNA utilizadas en el análisis filogenético.

Especie/población	Nº Acceso			Origen
	16S	ITS1	ITS2	
<i>B. alexandrina</i> (Ehrenberg, 1831) ^a	AY030203	AY030371	AY030371	Egipto(1)
	AY030204	AY030372	AY030372	Egipto(2)
<i>B. amazonica</i> Paraense, 1966 ^a	AY030216	AY030384	AY030384	Brazil(1)
	AY030217	AY030385	AY030385	Brazil(2)
<i>B. angulosa</i> ^b	DQ084848	DQ084889	---	Tanzania
<i>B. camerunensis</i> (Boettger, 1941) ^a	AY030198	AY030366	AY030366	Cameroon(1)
	AY030199	AY030367	AY030367	Cameroon(2)
<i>B. choanomphala</i> (Martens, 1879) ^a	AY030202	AY030370	AY030370	Tanzania
<i>B. edisoni</i> Estrada et al. (2006) ^c	---	AY364446	AY364450	Colombia(1)
	---	AY364448	AY364451	Colombia(2)
	---	AY364449	AY364452	Colombia(3)
<i>B. glabrata</i> (Say, 1818) ^a	AY030206	AY030374	AY030374	Rep. Dominicana

	AY030207	AY030375	AY030375	Puerto Rico
	AY030208	AY030376	AY030376	Brasil
	AY030209	AY030377	AY030377	Venezuela
<i>B. helophila</i> (Orbigny, 1835) ^a	AY030230	AY030399	AY030399	Cuba
<i>B. intermedia</i> (Paraense y Deslandes, 1962) ^a	AY030215	AY030383	AY030383	Paraguay
<i>B. kuhniiana</i> (Clessin, 1883) ^a	AY030210	AY030378	AY030378	Dominica
	AY030211	AY030379	AY030379	Colombia
	AY030212	AY030380	AY030380	Venezuela
<i>B. obstructa</i> (Morelet, 1849) ^a	AY030228	AY030397	AY030397	USA
	AY030229	AY030398	AY030398	México
<i>B. occidentalis</i> Paraense, 1981 ^a	AY030221	AY030389	AY030389	Brasil
<i>B. oligoza</i> ^d	---	---	AF198679	Brasil(1)
	---	---	AF198680	Brasil(2)
<i>B. peregrina</i> (Orbigny, 1835) ^a	AY030231	AY030400	AY030400	Uruguay
	AY030232	AY030401	AY030401	Brasil (Minas Gerais1)
<i>B. peregrina</i> (Orbigny, 1835) ^d	---	---	AF198676	Brasil (Minas Gerais2)
	---	---	AF198677	Brasil (RS)
<i>B. peregrina</i> (Orbigny, 1835) ^e	GU168591	---	---	Argentina (Mendoza1)
	GU168592	---	---	Argentina (Mendoza2)
<i>B. peregrina</i> (Orbigny, 1835) ^f	---	---	DQ143961	Brasil (Ourinhos1)
	---	---	DQ143962	Brasil (Ourinhos2)
<i>B. pfeifferi</i> (Krauss, 1848) ^a	AY030193	AY030361	AY030361	Senegal
	AY030194	AY030362	AY030362	Camerún
	AY030195	AY030363	AY030363	Sudán
	AY030196	AY030364	AY030364	Madagascar
<i>B. prona</i> (Martens, 1873) ^a	AY030222	AY030390	AY030390	Venezuela
	AY030223	AY030391	AY030391	Venezuela
<i>B. schrammi</i> (Crosse, 1864) ^a	AY030233	AY030402	AY030402	Brasil (Minas Gerais1)
<i>B. schrammi</i> (Crosse, 1864) ^d	---	AY425743	AF198681	Brasil (Minas Gerais2)
	---	AY425744	AF198682	Brasil (Minas Gerais3)
<i>B. smithi</i> Preston, 1910 ^a	AY030205	AY030373	AY030373	Uganda
<i>B. sp. Bolivia</i> ^a	AY030218	AY030386	AY030386	Bolivia
<i>B. sp. Cuba</i> ^a	AY030224	AY030393	AY030393	Cuba1
<i>B. sp. Cuba</i> ^a	AY030225	AY030394	AY030394	Cuba2
<i>B. sp. Puerto Rico</i> ^a	AY030226	AY030226	AY030226	Puerto Rico
<i>B. stanleyi</i> (Smith, 1888) ^a	AY030197	AY030365	AY030365	Uganda
<i>B. straminea</i> (Dunker, 1848) ^a	AY030213	AY030381	AY030381	Brasil(1)
	AY030214	AY030382	AY030382	Brasil(2)
<i>B. sudanica</i> (Martens, 1873) ^a	AY030200	AY030368	AY030368	Kenia
	AY030201	AY030369	AY030369	Tanzania
<i>B. temascalensis</i> Rangel-Ruiz, 1987 ^a	AY030227	AY030396	AY030396	México
<i>B. tenagophila</i> (Orbigny, 1835) ^a	AY030219	AY030387	AY030387	Paraguay
	AY030220	AY030388	AY030388	Brasil
Visviri ^b	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Umaqui ^b	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur

Vioco ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Caquena ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Colpa ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Lauca Norte ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Lauca Sur ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Chungará ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Cotacotani ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Piacota ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Parinacota ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Chuviri ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Chibatambo ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Salar de Huasco ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Isluga ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Salar de Carcote ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
Salar de Ascotán ^g	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur
	Pendiente	Pendiente	Pendiente	Altiplano Sur

Secuencias incorporadas en este estudio: a: DeJong et al., 2001, b: Jorgensen et al., 2007, c: Estrada et al., 2000, d: Vidigal et al., 2000a, e: Standley et al., (no publicadas); f: Tuan y dos Santos (no publicadas); g: presente estudio.

Resultados

Con las secuencias originales determinadas en este estudio y las obtenidas desde GenBank se construyeron matrices de datos que resultaron en 78 secuencias para el gen 16S, 75 secuencias para la región ITS1 y 83 secuencias para ITS2 que fueron analizadas de manera separada y combinada.

Gen 16S

La amplificación por PCR del gen 16S produjo un fragmento parcial de 412 a 439 nucleótidos en 30 ejemplares del Altiplano Sur y tres de La Plata, Argentina. La composición nucleotídica considerando todas las secuencias analizadas fue 36.4% A, 10.5% C, 37.4% T y 15.7% G. La longitud final del alineamiento fue 457 sitios nucleotídicos considerando estas secuencias y las obtenidas de GenBank. El número de caracteres informativos para parsimonia fue 108. El análisis MP entregó 100 árboles igualmente parsimoniosos de longitud 307 (índice de consistencia= 0.49; índice de retención= 0.88), a partir de los cuales se construyó un árbol de consenso de mayoría que se muestra en el Anexo (fig. A). Este análisis muestra a la especie *B. schrammi* posicionada fuera de *Biomphalaria* y recupera, además, dos grandes clados. El primero, más diverso, fue compuesto por la mayoría de las especies neotropicales y todas las africanas, que se agruparon en seis subclados. Tres subclados tuvieron bajo a moderado soporte bootstrap, el conformado por especies africanas (52%), el que incluye a *B. amazonica*, *B. prona* y *B. sp.* de Bolivia (68%) y el que conformaron *B. intermedia*, *B. straminea* y *B. kuhniana* (66%), mientras tres fueron bien soportados. Uno fue conformado por *B. glabrata* (97%), otro por especies de México y Caribe (100%) y un tercero por *B. occidentalis* y *B. tenagophila* (81%). *B. helophila* y *B. sp.* de Cuba1 no

fueron resueltas por este análisis. El segundo gran clado fue conformado por la especie neotropical *B. peregrina* más las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* (100%). En este clado fue posible distinguir cuatro subclados, uno conformado por secuencias obtenidas de las cuencas Lauca y Salar de Huasco (85%), otro formado por secuencias del Salar de Ascotán (54%), un tercero por secuencias del Salar de Carcote (69%) y un cuarto por secuencias de *B. peregrina* de Argentina (67%). El resto de las secuencias altiplánicas y de *B. peregrina* de Uruguay y Brasil no fueron resueltas con este gen. El análisis ML 16S (GTR+G; $-\ln L = 2284.154$) produjo tres árboles que muestran las mismas dos agrupaciones mayores de especies inferidas bajo MP, uno de los cuales se muestra en el Anexo (fig. B). En este análisis, *B. sp.* de Cuba aparece como el grupo hermano del clado de mayor diversidad.

Regiones nucleares ribosomales

La amplificación por PCR de la región de RNA ribosomal ITS1 produjo un fragmento de 385 a 395 nucleótidos en 26 ejemplares del Altiplano Sur y uno de La Plata. La composición nucleotídica considerando todas las secuencias analizadas fue 22.4% A, 25.8% C, 22.4% T y 29.3% G. El alineamiento final considerado en el análisis fue de 494 sitios nucleotídicos. El número de caracteres informativos para parsimonia fue 222. El árbol de consenso de mayoría de 100 árboles igualmente parsimoniosos (longitud= 460; índice de consistencia= 0.73; índice de retención= 0.97) que se muestra en el Anexo (Fig. C) resolvió cuatro clados, uno mayor, con un valor de soporte de 72%, fue compuesto por dos subclados, el de *B. glabrata* más las especies africanas (100%) y otro rico en especies neotropicales (70%). Un segundo clado lo conformaron *B. peregrina* y las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* (100%) y un

tercero las especies de México y Caribe (100%). Estos tres clados no muestran resolución entre sí ni respecto a *B. helophila*, que forma una rama independiente en el árbol. El cuarto clado, posicionado fuera de estas agrupaciones, fue conformado por *B. schrammi* (100%). Al interior del clado *B. peregrina*/taxa altiplánicos se resuelven las secuencias del Salar de Ascotán (72%), las de las cuencas Lauca y Salar de Huasco (72%) y las de *B. peregrina* de Argentina, Uruguay y Brasil (71%). El análisis ML ITS1 (GTR+G; $-\ln L= 3090.3933$) produjo un árbol que recuperó los mismos clados inferidos por MP, pero con las especies de México e islas del Caribe y *B. helophila* como grupos hermanos consecutivos del resto de las especies (Anexo; fig. D).

Para la región ITS2 se amplificó un fragmento de 418 a 471 nucleótidos en 28 ejemplares del Altiplano Sur y uno de La Plata. La composición nucleotídica considerando todas las secuencias analizadas fue 16.8% A, 26.8% C, 28.7% T y 27.7% G. El alineamiento final fue de 528 sitios nucleotídicos. Los caracteres informativos para parsimonia fueron 183. El árbol de consenso regla de la mayoría de 100 árboles igualmente parsimoniosos (longitud= 594; índice de consistencia= 0.58; índice de retención= 0.89) que se muestra en el Anexo (Fig. E) recuperó cinco clados. En este árbol el clado *B. peregrina*/taxa altiplánicos incluye un nuevo representante, *B. oligoza* (100%), para el cual no se dispone de secuencias para los loci 16S e ITS1. El análisis recupera también el clado *B. glabrata* más especies africanas (100%). El resto de las especies neotropicales conforma tres clados bien soportados, pero no resueltos. Al igual que en el análisis 16S e ITS1, no se resuelve la posición de la especie *B. helophila*, la cual forma una rama independiente del resto de las especies. El análisis ML ITS2 (TVM + G; $-\ln L= 3877.094$) produjo un árbol presentado en el Anexo (fig. F).

Análisis combinado

El análisis que combinó los tres grupos de datos para las cuales los tres loci estaban disponibles (Tabla 1) incluyó 1479 caracteres, de los cuales 469 resultaron informativos para parsimonia. El resultado de la prueba de homogeneidad de particiones ILD fue de 0.01 para todas las combinaciones de datos realizadas (16S e-ITS1, 16S e ITS2, ITS1 e ITS2, 16S, ITS1 e ITS2). Este valor de probabilidad no permite combinar los datos de acuerdo a la prueba de hipótesis, pero de acuerdo a Cunningham (1997), un valor de *P* mayor o igual a 0.001, mejora o no reduce la señal filogenética. Considerando este criterio, y la mayor resolución entregada por el árbol combinado, en este trabajo construimos filogenias combinando las tres particiones en una misma matriz de datos. Esta estrategia, además, es consistente con la aproximación Evidencia Total (Kluge, 1989). El árbol de consenso de mayoría (no mostrado) de 100 árboles igualmente parsimoniosos (longitud= 1269; índice de consistencia= 0.59; índice de retención= 0.92) recuperó dos clados. El primero, más diverso, incluye dos subclados con divisiones internas menores: un subclado fue conformado por especies de México y Caribe (*B. obstructa*, *B. temascalensis*, *B. sp. Cuba2*, *B. sp. Puerto Rico*), que son el grupo hermano de un conglomerado de especies mayoritariamente sudamericanas, las cuales forman cuatro clados menores (*B. tenagophila/B. occidentalis*; *B. sp. Cuba1/B. prona*; *B. sp. Bolivia/B. amazonica*; *B. straminea*, *B. intermedia* y *B. kuhniana*). En este análisis *B. helophila* aparece siendo el grupo hermano de estas especies con un soporte bootstrap significativo (75%). El segundo subclado recuperó a *B. glabrata* como el grupo hermano de las especies africanas (100% bootstrap), las cuales se subdividen en dos clados hermanos menores, uno conformado por *B. smithi*, grupo hermano de *B. alexandrina*, *B. choanomphala* y *B. sudanica*; y otro por *B. camerunensis*, *B. pfeifferi* y

B. stanleyi. El segundo subclado principal fue conformado por *B. peregrina* y las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria*, confirmando los hallazgos obtenidos en los análisis separados. Al interior de este clado, sólo los especímenes de *B. peregrina* y los muestreados en el Salar de Carcote y Salar de Ascotán forman grupos monofilético (77 y 95 y 92% bootstrap, respectivamente). En este análisis, al igual como aconteció en los análisis separados, *B. schrammi* se posiciona fuera de *Biomphalaria*. El análisis combinado realizado con la matriz de 90 secuencias entregó valores de soporte de nodos similares a los obtenidos en el análisis combinado de 67 secuencias. La topología obtenida en este análisis es prácticamente la misma, con la excepción de los nuevos taxa incorporados a la matriz de datos (Fig. 2.2). El análisis confirma la posición de *B. oligoza* al interior del clado junto a *B. peregrina* y los taxa altiplánicos recuperado en el análisis ITS2, aunque formando un grupo monofilético con *B. peregrina*, y de *B. andecola* formando un grupo monofilético con *B. prona*, y este clado siendo el grupo hermano de la especie *B. edisoni*. Al interior del clado africano se confirma la posición de *B. angulosa* recuperada en el análisis 16S e ITS1. El análisis ML con 90 secuencias recuperó dos árboles que difieren sólo en la posición que intercambian dos secuencias de la localidad altiplánica de Isluga. La topología de estos árboles, aunque similar a los obtenidos por MP, difieren de este análisis en que *B. helophila* y las especies de USA, México y Caribe aparecen como grupos hermanos consecutivos del resto de las especies neotropicales y africanas de *Biomphalaria* (Fig. 2.3). Al interior del clado *B. peregrina*/*B. oligoza*/taxa altiplánicos, *B. oligoza* aparece como el grupo hermano de *B. peregrina* y se recuperan los grupos que incluyen la secuencias de las cuencas de Lauca y Salar de Huasco, Salar de Carcote y Salar de Ascotán. El análisis realizado mediante IB con 90 secuencias entregó un árbol de consenso similar al análisis ML. En este árbol

las especies de USA, México y Caribe aparecen como el grupo hermano del resto de las especies, y se recuperaron los mismos dos clados principales inferidos en el análisis de MP y ML (Fig. 2.4).

Tiempos de divergencia

La divergencia entre los dos clados principales recuperados en el presente estudio fue estimada en 6.23 Ma. Los tiempos de divergencia entre linajes basales al interior del clado de mayor diversidad fueron estimados en el Plioceno. La divergencia entre *B. glabrata* y las especies africanas fue estimada haber ocurrido cerca de 2.6 Ma, concordando con estimaciones previas (Woodruff y Mulvey, 1997; Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001). DeJong et al. (2001) estimaron que la divergencia entre *B. glabrata* y las especies africanas ocurrió aproximadamente entre 2.9 y 4.0 Ma. La divergencia al interior del nuevo clado neotropical fue trazada hasta el Pleistoceno medio y tardío (fig. 2.5).

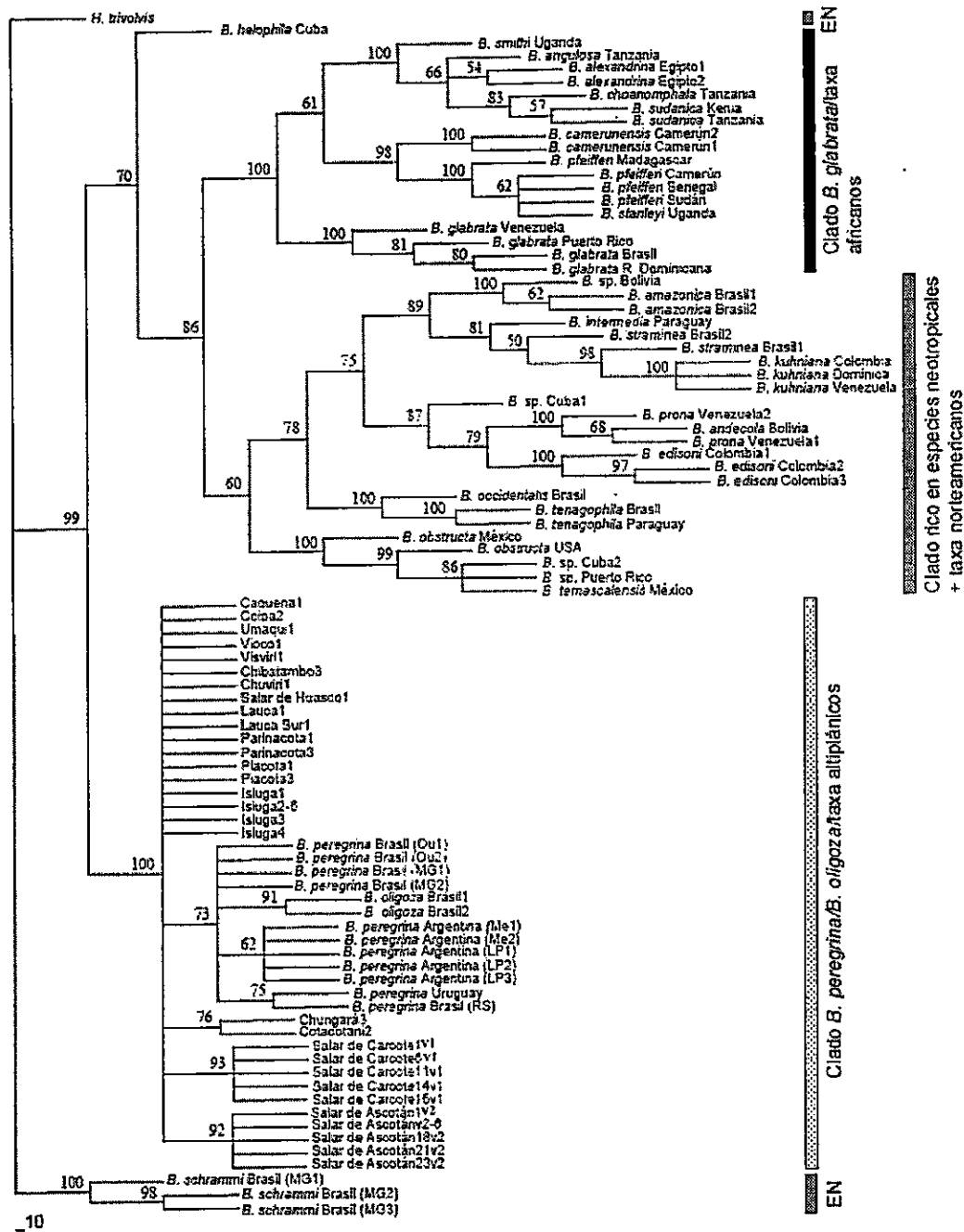


Figura 2.2. Arbol de consenso de mayoría obtenido del análisis de máxima parsimonia utilizando la matriz combinada de 90 secuencias. Los números en los nodos indican los valores de soporte bootstrap (sólo se muestran los valores superiores a 50%).

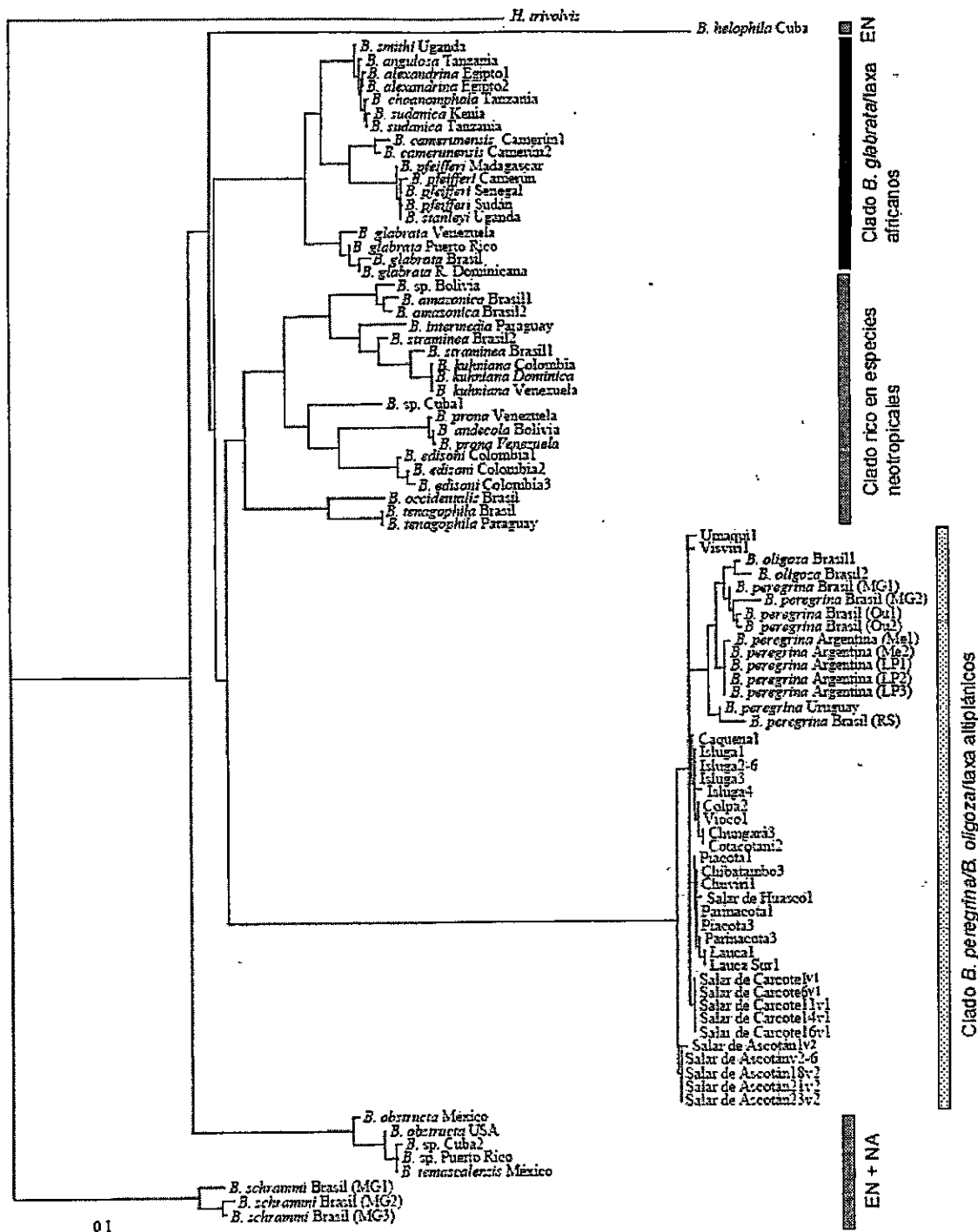


Figura 2.3. Arbol obtenido del análisis máxima verosimilitud utilizando la matriz combinada de 90 secuencias.

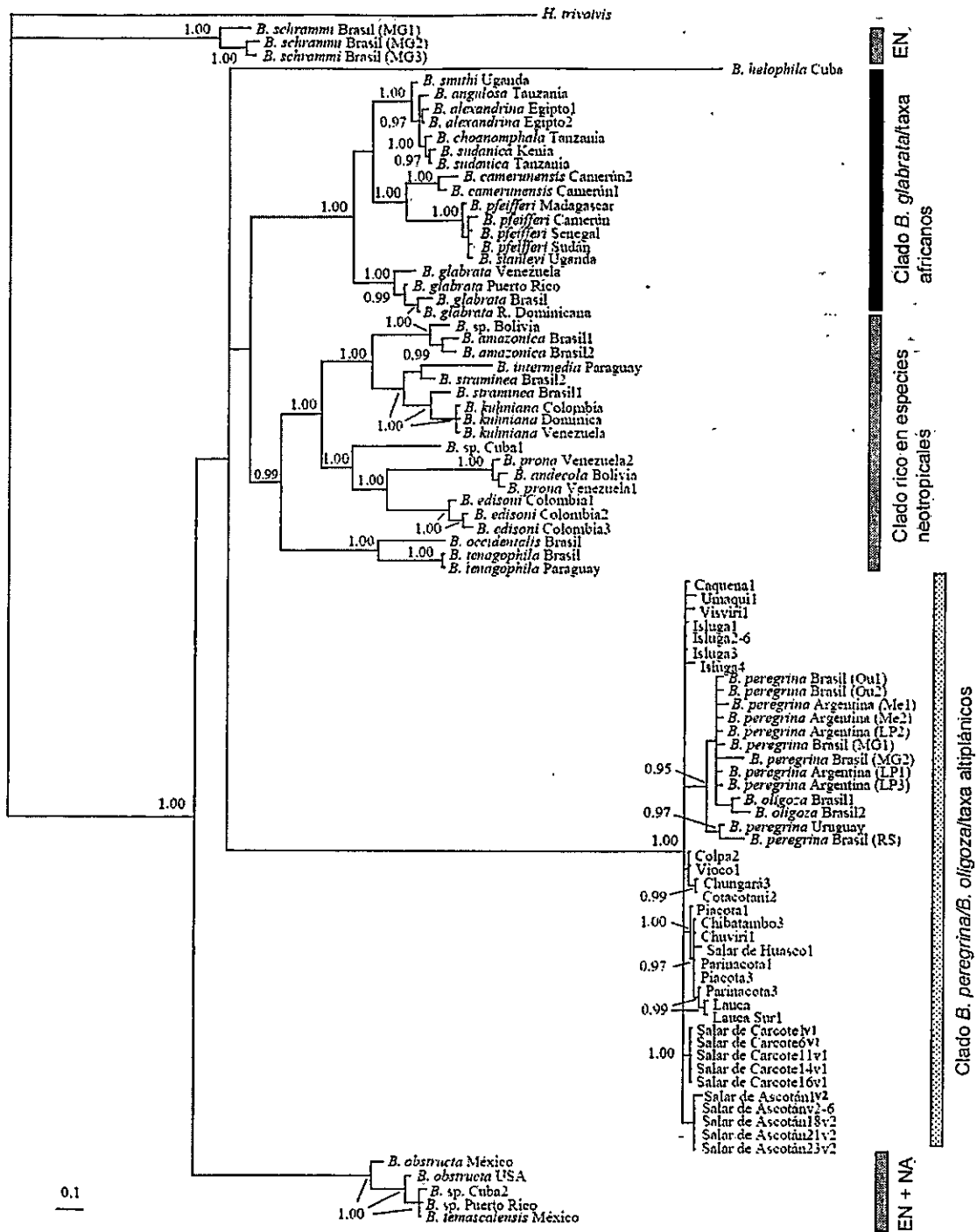


Figura 2.4. Arbol de consenso obtenido mediante inferencia bayesiana utilizando la matriz de 90 secuencias.

Discusión

Un nuevo clado neotropical en Biomphalaria

El análisis molecular realizado en el presente estudio revela que el género *Biomphalaria* está dividido filogenéticamente en dos clados principales, uno que incluye la mayoría de las especies neotropicales y todas las africanas, con *B. helophila* como grupo hermano, y un nuevo clado exclusivamente neotropical compuesto por *B. peregrina*, *B. oligoza* y los taxa altiplánicos. El respaldo para este grupo monofilético fue de 100% de soporte bootstrap bajo MP en los tres análisis realizados por separado (ITS1, ITS2 y 16S) y en los análisis combinados. Los análisis ML e IB también recuperaron esta agrupación, y en este último caso con una probabilidad posterior de 1.0. El tamaño más corto de los fragmentos ITS1 obtenidos por DeJong et al. (2001) en *B. peregrina* comparado a otras especies del género, probablemente indicativos de eventos de delección para estos autores, también fueron encontrados en las secuencias amplificadas en las poblaciones altiplánicas, sugiriendo una relación de ancestría común entre ambos grupos. Como consecuencia de este importante hallazgo, ahora se debe considerar a *B. peregrina* más estrechamente relacionado a las poblaciones/especies altiplánicas de *Biomphalaria* y no como el grupo hermano de todas las especies del género, como había sido previamente hipotetizado (DeJong et al., 2001).

Bandoni et al. (1995) utilizando alozimas hipotetizaron que la especie neotropical *B. glabrata* es el grupo hermano de las especies africanas de *Biomphalaria*. Posteriormente Campbell et al. (2000) y DeJong et al. (2001) utilizando secuencias de DNA corroboraron esta importante inferencia filogenética considerando que *B. glabrata* es uno de los más importantes hospederos intermediarios de *S. mansoni* en el mundo y, de hecho, todas las especies africanas son susceptibles al parásito. Si bien el análisis MP

16S no soporta esta hipótesis de relación de grupos hermanos, fue apoyada por el análisis MP ITS1 (98% bootstrap). El análisis MP ITS2 recuperó también a *B. glabrata* formando un grupo monofilético con las especies africanas, aunque siendo el grupo hermano de un subset de estas especies (*B. alexandrina*, *B. choanomphala*, *B. smithi*, *B. sudanica*), aunque con bajo soporte bootstrap (54%). El análisis combinado MP con las dos matrices de datos recupera a *B. glabrata* como el grupo hermano de las especies africanas (100% bootstrap), relación también recuperada en el análisis ML combinado e inferencia bayesiana combinado (1.00 de p.p).

DeJong et al. (2001) recuperaron además un clado rico en especies neotropicales y otro clado que denominaron “el complejo de especies del Nilo”, compuesto por especies africanas principalmente distribuidas en los cuerpos de agua aledaños a este sistema. Estos dos grupos monofiléticos fueron recuperados en el presente estudio, concordando con este estudio previo. Sin embargo, en otros aspectos de la filogenia ambos estudios no son concordantes. Por ejemplo, en niveles basales del árbol el estudio de DeJong et al. (2001) resultó controversial. Su hipótesis filogenética escogida, uno de 234 árboles igualmente parsimoniosos, topológicamente congruente con el árbol ML, recuperó a *B. peregrina* como el grupo hermano del resto de las especies del género, aunque su posición sistemática no fue consistente a través de todos los análisis ya que intercambiaba posiciones con *B. helophila*. La inclusión en el presente estudio de 17 poblaciones altiplánicas, analizadas en conjunto con secuencias de especies neotropicales y africanas, permitió obtener un nuevo cuadro conceptual de la filogenia del género. La inclusión de *B. peregrina* en el nuevo clado neotropical permitió que la posición de *B. helophila* se haya estabilizado en la filogenia como grupo hermano del clado de mayor diversidad con un soporte bootstrap significativo de acuerdo al análisis

MP (70%). Esta hipótesis de relaciones no fue recuperada, sin embargo, en la inferencia bayesiana ni en el análisis ML ya que en ambos casos se infiere el nuevo clado neotropical, pero un subclado compuesto por especies de México y Caribe aparece ahora como grupo hermano del resto de las especies (excluyendo a *B. schrammi*). DeJong et al. (2001) recuperaron también a *B. prona* y *B. andecola* formando un grupo monofilético con alto soporte bootstrap, apareciendo como su grupo hermano el taxón *B. sp. Cuba*1. La inclusión de *B. edisoni* realizada en el presente estudio permite un nuevo reposicionamiento de taxa en la filogenia de *Biomphalaria*, ya que esta especie se incluye en el clado con alto soporte bootstrap como grupo hermano de las especies *B. prona* y *B. andecola*. Basado en evidencia morfológica Paraense (1988) propuso el complejo *B. straminea* para incluir esta especie, *B. kuhniiana* y *B. intermedia*. En el presente estudio se recuperó consistentemente este grupo monofilético, concordando con la evidencia morfológica. Como grupo hermano de este clado aparece *B. amazonica*, concordando con los hallazgos de estudios filogenéticos previos (Vidigal et al., 2000a; DeJong et al., 2001; Pontier et al., 2002). El clado formado por *B. tenagophila* y *B. occidentalis* fue recuperado con altos valores de soporte en todos los análisis realizados en el presente estudio. Estos resultados concuerdan con análisis filogenéticos previos (Woodruff y Mulvey, 1997; Vidigal et al., 2000; DeJong et al., 2001) y con caracteres morfológicos descritos por Paraense (1981; 1984) que muestran una estrecha relación entre ambas especies. De hecho, considerando este tipo de caracteres y perfiles de RFLP, Spatz et al. (1999) propusieron agrupar ambas especies más la subespecie *B. tenagophila guabensis* en el complejo *B. tenagophila*. Otro grupo de especies estrechamente relacionadas recuperado en el análisis ITS2 fue el conformado por *B. peregrina* y *B. oligoza*, corroborando los hallazgos previos

informados por Vidigal et al. (2000a) utilizando este mismo locus y por Spatz et al. (2000) que consideraron perfiles de RFLP.

Origen de Biomphalaria

Dos hipótesis alternativas acerca del origen de *Biomphalaria* pueden ser encontradas en la literatura. Una de ellas postula que *Biomphalaria* tiene un origen Gondwánico, lo que explicaría la presencia de estos caracoles en Africa y en el Neotrópico (Pilsbry, 1911; Davis 1980, 1992). Más recientemente Woodruff y Mulvey (1997) utilizando alozimas sugirieron que *Biomphalaria* se originó en Sudamérica y la presencia de estos caracoles en Africa corresponde a un evento de dispersión pasiva ocurrida no más de 5 millones de años atrás. Más recientemente, análisis moleculares basados en secuencias de DNA (Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001) han confirmado que esta propuesta constituye la hipótesis más aceptable sobre el origen de *Biomphalaria*, lo cual fue corroborado por el presente estudio. Considerando líneas de evidencia independientes que soportan estos hallazgos, tales como el registro fósil, algunos autores incluso han llegado a suponer que *Biomphalaria* tenga un origen Norteamericano (DeJong et al., 2001; Morgan et al., 2002). Morgan et al. (2002) basaron su propuesta en un análisis filogenético que incluyó varios géneros de Planorbidae, incluyendo los géneros norteamericanos *Helisoma* (Wetherby, 1879) y *Pecosorbis* Taylor, 1985, los cuales aparecieron en una “posición basal” respecto a *Biomphalaria*. La sugerencia de Morgan et al. (2002) ciertamente es una posibilidad, pero el género *Helisoma* también tiene representantes en Sudamérica (Paraense, 2003a,b; Vidigal et al., 2000a) y la escases del registro fósil en esta área puede ser un simple artefacto de muestreo, haciendo esta conclusión prematura. El hecho de que el

género *Helisoma* sea más diverso en Norteamérica y esté poco representado en Sudamérica (DeJong et al., 2001) tampoco es conclusivo.

Filogenia de Biomphalaria y su relación con S. mansoni

Las tres especies neotropicales infectadas naturalmente con *S. mansoni*, *B. glabrata*, *B. tenagophila* y *B. straminea* (Lutz, 1916, 1918, 1934) pertenecen a distintos clados. Lo mismo acontece para la cuatro especies que han sido infectadas experimentalmente con el parásito, *B. amazónica*, *B. helophila* (bajo *Tropicorbis albicans*), *B. havanensis* y *B. peregrina* (Richards, 1963; Corrêa y Paraense 1971; Michelson, 1976; Paraense y Corrêa, 1973; 1985), las cuales se consideran potenciales hospederos de *S. mansoni*. Otras especies del género tales como *B. occidentalis*, *B. obstructa*, *B. schrammi*, *B. orbignyi*, *B. kuhniiana* y *B. tenagophila guaibensis* han sido consideradas refractarias del parásito (Floch y Fauran, 1954; Paraense et al., 1964; Paraense 1975; Paraense y Corrêa, 1982, 1987; Sullivan y Hu, 1996) o no existe información al respecto. Esto indica que los eventos de cladogénesis en este grupo de especies neotropicales no están relacionados con la evolución del parásito sino que la ocurrencia de este se debe a eventos de adquisición independientes. Lo anterior no sería efectivo para *B. glabrata* y las especies africanas, considerando que *B. glabrata* es uno de los hospederos intermediarios más importantes del grupo y todas las especies africanas son vectores, una consecuencia de la herencia filogenética ocurrida en este clado.

Implicancias taxonómicas

Los análisis filogenéticos moleculares muestran que la sinonimia de las especies nominales descritas para el Altiplano chileno, es decir, *B. thermalis* y *B. costata* con *B.*

andecola y *B. peregrina*, respectivamente, no es apropiada. Para el caso *B. thermalis/B. andecola* sólo podemos remitirnos al análisis filogenético realizado con la región ITS2, que es la región para la cual se dispone de una secuencia de *B. andecola* para comparación (DeJong et al., 2001), además del análisis combinado con la matriz de 90 secuencias que incluye también a este taxón. De acuerdo al análisis filogenético molecular, *B. andecola* forma parte del clado neotropical rico en especies, al interior del cual forma un grupo monofilético con un ejemplar de la especie *B. prona*, cuyas secuencias fueron obtenidas de caracoles de Venezuela (DeJong et al., 2001). Las cinco secuencias obtenidas de especímenes del Salar de Ascotán, localidad tipo de *B. thermalis* (vea Biese, 1951) forman parte del clado que agrupa a *B. peregrina/B. oligoza* más las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria*. De esta manera, es claro que ambos taxa corresponden a diferentes linajes, y pertenecen a diferentes clados. Para el caso *B. peregrina/B. costata* podemos comparar secuencias considerando todos los grupos de datos utilizados en el presente estudio. Si bien en el análisis ITS1 e ITS2 *B. peregrina* conforma un clado junto a las poblaciones altiplánicas, división que incluye la vertiente norte del Salar de Carcote, localidad tipo de *B. costata* (vea Biese, 1951), las cinco secuencias de esta especie nunca forma un grupo monofilético con las de *B. peregrina*. En el análisis MP 16S, las tres secuencias de *B. peregrina* de La Plata obtenidas en este estudio forman un grupo monofilético con una de las secuencias de esta especie obtenida por DeJong et al. (2001). Más aún todavía, el árbol ML obtenido con el gen 16S muestra que *B. costata* no forma parte de *B. peregrina*. Así, la evidencia molecular no apoya la sinonimia establecida para las especies altiplánicas. Con las secuencias utilizadas en este estudio podemos concluir muy poco acerca de la identidad de la

especie altiplánica *B. aymara* debido a la escasa resolución obtenida al interior del clado *B. peregrina*/taxa altiplánicos.

Aunque varios estudios filogenéticos en *Biomphalaria* han incluido a *B. schrammi*, su posición sistemática al interior del género ha sido puesta en duda. En realidad, varias líneas de evidencia sugieren que esta especie no pertenece a *Biomphalaria*, lo que refleja, como en muchos otros grupos de moluscos, la necesidad de incorporar estudios filogenéticos en este tipo de problemas. Vidigal et al. (2000) sugieren que *B. schrammi* es un taxón "intermedio" entre *H. trivolvis* y otras especies de *Biomphalaria*. De acuerdo a DeJong et al. (2001) *B. schrammi* parece estar tan distantemente relacionada a otras *Biomphalaria* como a *Helisoma*, pudiendo representar un linaje separado o intermedio. De hecho, las secuencias 5.8S resultaron idénticas para casi todas las especies de *Biomphalaria* examinadas y *H. trivolvis*, con la excepción de *B. schrammi*, que presentó dos diferencias nucleotídicas. Por otro lado, el estudio filogenético realizado por Morgan et al. (2002) utilizando el gen de RNA ribosomal 28S y el exón 2 de actina posiciona a *B. schrammi* al interior de un clado conformado por ocho especies de *Biomphalaria*, lo que soporta la inclusión de esta especie en el género. Sin embargo, este resultado puede ser producto del escaso número de especies consideradas. El presente estudio, el más inclusivo en términos del número de taxa considerados hasta ahora en *Biomphalaria*, muestra que en todos los análisis *B. schrammi* forma un linaje independiente del resto de las especies del género.

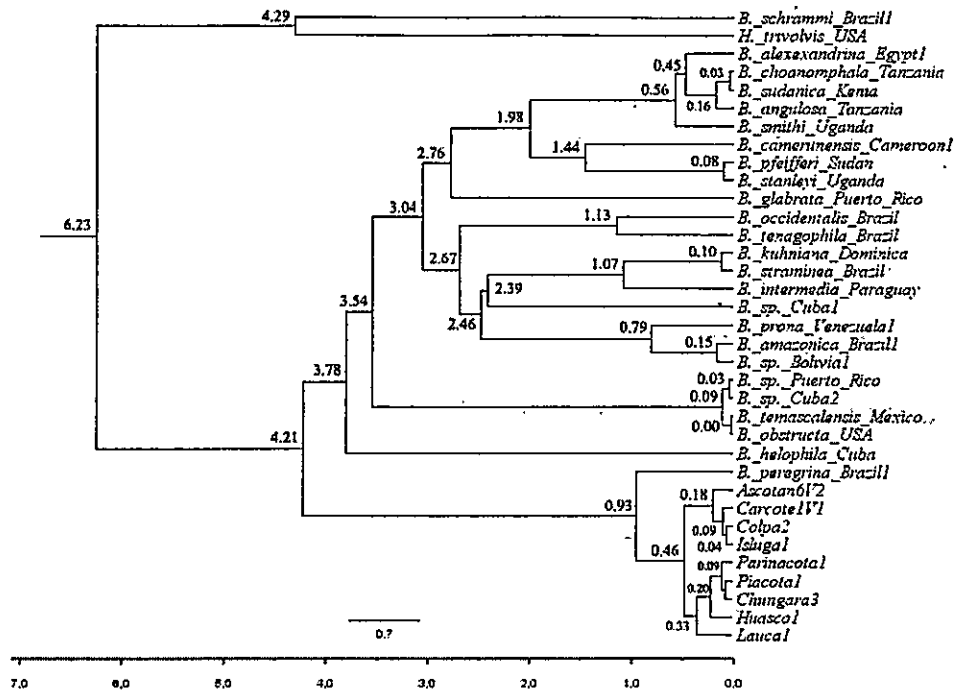


Figura 2.5. Reconstrucción de los tiempos de divergencia entre linajes de *Biomphalaria* estimados utilizando una tasa de sustitución de 1.9% por millón de años para el locus 16S. Los números en los nodos representan millones de años. Se incluyó una secuencia por población/especie para generar un árbol bayesiana utilizando un reloj molecular estricto. La escala pequeña indica 0.7 sustituciones por sitio por millón de años. La escala mayor está dada en millones de años.

Biogeografía de las poblaciones/especies altiplánicas

Todos los análisis realizados en el presente estudio recuperaron las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* al interior de un nuevo clado exclusivamente neotropical. Esto se suma a otros grupos monofiléticos previamente recuperados en el género (Bandoni et al., 1995; Campbell et al., 2000; Vidigal et al., 2000a; DeJong et al., 2001), permitiendo obtener un cuadro conceptual más acabado sobre la filogenia de este médica y económicamente importante grupo de caracoles. Considerando un reloj molecular estricto, la variación de las secuencias 16S indica que los diferentes linajes

altiplánicos de *Biomphalaria* evolucionaron a fines del Cuaternario, durante el Pleistoceno medio. Calibraciones del tiempo evolutivo utilizando secuencias del gen citocromo *b* determinadas en taxa codistribuidos como los peces del género *Orestias* Valenciennes, 1839 fueron estimados en cerca de 370.000 a 600.000 años atrás (Lüssen et al., 2003), concordando con las estimaciones realizadas aquí. Aparte de estos hallazgos y del reconocimiento de las especies nominales altiplánicas *B. thermali* y *B. costata* como integrantes del nuevo clado neotropical, la escasa resolución obtenida internamente no permite establecer conclusiones sobre los patrones que influyeron en la actual distribución geográfica de las poblaciones en el área. Para clarificar las relaciones al interior de este nuevo grupo monofilético se requiere investigar loci de evolución más rápida, tales como secuencias del gen mitocondrial citocromo *c* oxidasa subunidad 1 (COI), las cuales probaron ser altamente resolutivas en un estudio que consideró taxa africanos pertenecientes a un complejo de especies estrechamente relacionadas de *Biomphalaria* del río Nilo de reciente divergencia (Jørgensen et al., 2007).

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Sergio Letelier, curator del Museo Nacional de Historia Natural de Santiago, Chile, por su colaboración durante el desarrollo de este estudio. Se agradece también a la Dra. Alejandra Rumi por proporcionar muestras de *Biomphalaria* de Argentina. Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto MULT 05/04-2 y Domeyko: Biodiversidad Iniciativa Transversal I de la Universidad de Chile; FONDECYT 1061256 y 1080390. G. Collado agradece a CONICYT.

Literatura citada

- Allen, G.P., P.B. Bartley, A.C., Sleigh, G.R. Olds, Y. Li, G.M. Williams y D.P. Mcmanus. 2002. Schistosomiasis. *New England Journal of Medicine* 346: 1212–1220.
- Bandoni, S.M., M. Mulvey y E.S. Loker. 1995. Phylogenetic analysis of eleven species of *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae) based on comparisons of allozymes. *Biol. J. Linn. Soc.* 54:1–27.
- Biese, W.A. 1951. Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte 4: Planorbidae. *Boletín Museo de Historia Natural, Chile* 25: 115-137.
- Caldeira, R.L., Vidigal, T.H.D.A., Paulinelli, S.T., Simpson, A.J.G. y O.S. Carvalho. 1998. Molecular Identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a PCR-RFLP. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93: 219–225.
- Caldeira, R.L., Vidigal, T.H.D.A., Matinela, L., Simpson, A.J.G. y O.S. Carvalho. 2000. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism of ITS of the RNA ribosomal gene. *Mem. Inst. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 171–177.
- Campbell, G., C.S. Jones, A.E. Lockyer, S. Hughes, D.L. Brown, R. Nobley D. Rollinson. 2000. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267: 2351–2358.

- Corrêa, L.R. y W.L. Paraense. 1971. Susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to infection with two strains of *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 13: 387-390.
- Cunningham, C.W. 1997. Can three incongruence tests predict when data should be combined? Mol. Biol. Evol. 14: 733-740.
- Cunningham, C. W., N. W. Blackstone, And L. W. Buss. 1992. Evolution of king crabs from hermit crab ancestors. Nature 355:539-542.
- Davis, G.M. 1980. Snail hosts of Asian *Schistosoma* infecting man: evolution and coevolution. Malacol. Rev. (Suppl. 2): 195-238.
- DeJong, R.J., Morgan, J.A.T., Paraense, L., Pointier, J.-P., Amarista, M., Aye-Kumi, P.F.K., Babiker, A., Barbosa, C.S., Br_ emond, P., Canese, A.P., de Souza, C.P., Dominguez, C., File, S., Gutierrez, A., Incani, R.N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N.J.S., Mimpfoundi, R., Njiokou, F., Poda, J.N., Sene, M., Vel_ asquez, L.E., Yong, M., Adema, C.M., Hofkin, B.V., Mkoji, G.M., Loker, E.S. (2001). Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke *Schistosoma mansoni*. Molecular Biology and Evolution 18: 2225-2239.
- Drummond, A.J. y A. Rambaut. 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees". BMC Evolutionary Biology 7: 214.
- Estrada, V.E., Velásquez, L.E., Caldeira, R.L., Bejarano, E.E., Rojas, W. y O.S. Carvalho. 2006. Phylogenetics of South American *Biomphalaria* and description of a new species (Gastropoda: Planorbidae). Journal of Molluscan Studies 72: 221-228.

- Farris, J.S., M. Källersjö, A.G. Kluge, C. Bult. 1994. Testing significance of congruence. *Cladistics* 10: 315-319
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Floch, H. y P. Fauran. 1954. Bilharziose intestinale et "*Tropicorbis kühnianus*" (Clessin, 1883) em Guyane Française. *Archc. Inst. Pasteur Guyane Française* 325: 1-7.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT, Version 5.0.9, 2001. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Jørgensen A., T.K. Kristensen y J.R. Stothard. 2007. Phylogeny and biogeography of African *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae), with emphasis on endemic species of the great East African lakes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 151: 337-349.
- Kane, R.A. & Rollinson, D. 1994. Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 63: 153-156.
- Kluge, A.G. 1989. A concern for evidence and a phylogenetic hypothesis of relationships among *Epicrates* (Boidae, Serpentes). *Syst. Zool.* 38: 7-25.
- Lüssen, A. T.M. Falk, and Villwock, W. 2003. Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 151-160.

- Lutz, A., 1916. Observações sobre a evolução do *Schistosomum mansoni*. Nota prévia. Brazil-Medico 30: 385-387.
- Lutz, A., 1918. Caramujos de água doce do genero *Planorbis*, observados no Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 10: 65-82.
- Lutz, A., 1934. Transmission du *Schistosoma mansoni* dans l'Etat de Mins Gerais (Brésil) par le *Planorbis centimétralis*. C.R. Soc. Biol. (Paris) 116: 1149-1150.
- Malek, E.A. 1985. Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual. Pan American Health Organization Scientific Publication No. 478. PAHO, Washington.
- Michelson, E.A. 1976. A potential intermediate host of *Schistosoma mansoni* from Haiti. J Parasitol 6: 648-649.
- Morgan, J.A.T., R.J. Dejong, S.D. Younghun Jung, K. Khallaayoune, S. Kock, G.M. Mkoji y E.S. Loker. 2002. A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of *Schistosoma* parasites. Molecular Phylogenetics and Evolution 25: 477-488.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: D.M. Hillis, C. Moritz and B.K. Mable (Eds) *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc: Sunderland. Pp. 205-247.
- Paraense, W.L., Fauran, P., Courmes, E., 1964. Observations sur la morphologie la taxonomie la répartition géographique et les gites D' *Australorbis schrammi*. Bull. Soc. Pathol. Exotique 57: 1236-1254.
- Paraense, W.L. 1966. The synonymy and distribution of "*Biomphalaria peregrina*" in the Neotropical region. Revista Brasileira de Biologia, 26, 269-296.

- Paraense, W.L. 1975. *Biomphalaria orbignyi* sp.n. from Argentina (Gastropoda: Basommatophora: Planorbidae). Rev. Brasil. Biol. 35: 211-222.
- Paraense, W.L. 1981. *Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 76:199-211.
- Paraense, W.L. 1984. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* sp.n. from Southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. Mem Inst Oswaldo Cruz 79: 465-469.
- Paraense, W.L. 1988. *Biomphalaria kuhniiana* (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83: 1-12.
- Paraense, W.L. 2003a. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Peru (Mollusca: Basommatophora). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98(6): 767-771.
- Paraense, W.L. 2003b. A Bird's Eye Survey of Central American Planorbid Molluscs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98(1): 51-67.
- Paraense, W.L. y L. Corrêa. 1973. Susceptibility of *Biomphalaria peregrina* from Brazil and Ecuador to two strains of *Schistosoma mansoni*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 15: 127-130.
- Paraense, W.L. y L. Corrêa. 1982. Unsusceptibility of *Biomphalaria occidentalis* to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. Mem Inst Oswaldo Cruz 77: 55-58.
- Paraense, W.L. y L. Corrêa. 1985. Further experiments on susceptibility of *Biomphalaria amazonica* to *Schistosoma mansoni*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 80: 259-262.
- Patarnello, T., L. Bargelloni, V. Varotto y B. Battaglia. 1996. Krill evolution and the Antarctic ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by molecular data. Mar. Biol. 126:603-608.

- Pilsbry, H. A. 1911. Non-marine mollusca of Patagonia. Report of the Princeton University Expedition to Patagonia, Pp. 1896–1899.
- Pointier, J.P., W.L. Paraense, R.J. DeJong, E.S. Loker, M.D. Barges y S. Mas-Coma. 2002. A Potential Snail Host of Schistosomiasis in Bolivia: *Biomphalaria amazonica* Paraense, 1966. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 97(6): 793-796.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol. Biol. Evol. 25(7): 1253-1256.
- Richards, C.S. 1963. Infectivity of *Schistosoma mansoni* for Puerto Rican mollusks, including a new potential intermediate host. Am. J. Trop. Med. Hyg. 12:26–33.
- Ronquist, F. y J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.
- Spatz L, T.H.D.A. Vidigal, R.L. Caldeira, E. Dias Neto, S.M.G. Cappa y O.S. Carvalho. 1999. Study of *Biomphalaria tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. J. Moll. Stud. 65: 143-149.
- Spatz, L., T.H.D.A. Vidigal, M.C.A. Silva, S.M. González Cappa y O.S. Carvalho. 2000. Characterization of *Biomphalaria orbignyi*, *B. peregrina* and *B. oligoza* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion of the internal transcribed spacer region of the RNA ribosomal gene. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 807-814.
- Sullivan, J.T. y P.C. Hu. 1996. Fate of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria obstructa*. J. Parasitol. 82: 743-747.

- Swofford, D.L. 2003. PAUP*: *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Ver. 4. [Computer software and manual]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Tamura, K, Dudley, J., Nei, M. y Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8):1596-1599.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.
- Valdovinos, C. y J. Stuardo. 1991. Planorbidos altoandinos del norte de Chile y *Biomphalaria aymara* spec. nov. (Mollusca: Basommatophora). *Studies on Neotropical fauna and Environment* 26: 213-224.
- Velásquez, L.E., R.L. Caldeira, V. Estrada y O.S. Carvalho. 2002. Morphological and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Characterization of *Biomphalaria kuhniana* and *Biomphalaria amazonica* from Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97(7): 997-1004.
- Vidigal, T.H.D.A., L. Spatz, N.D. Nunes, A.J.G. Simpson, O.S. Carvalho y E. Dias Neto. 1998. *Biomphalaria* spp: Identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Experimental Parasitology* 89: 180-187.
- Vidigal, T.H.D.A., R.L. Caldeira, A.J.G. Simpson y O.S. Carvalho. 2000a. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 57-66.

- Vidigal, T.H.D.A., J.C. Kissinger, R.L. Caldeira, E.C.R. Pires, E. Monteiro, A.J.G. Simpson, y O.S. Carvalho. 2000b. Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. *Parasitology* 121: 611–620.
- Vidigal, T.H.D.A., R.L. Caldeira, A.J.G. Simpson, O.S. Carvalho. 2001. Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* Populations from Cuba Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism of the Ribosomal RNA Intergenic Spacer. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 96(5): 661-665.
- Vidigal, T.H.D.A., E. Dias Neto, A.J.G. Simpson y O.S. Carvalho. 1996. A low stringency polymerase chain reaction approach to identification of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91: 739-744.
- Vidigal THDA, Spatz L, Nunes DN, Simpson AJG, Carvalho OS, Dias Neto E 1998. *Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Exp. Parasitol.* 89: 180-187.
- Vidigal, T.H.D.A., Spatz, L., Kissinger, J.C., Redondo, R.A.F., Pires, E.C.R., Simpson, A.J.G. y Carvalho, O.S. 2004. Analysis of the first and second internal transcribed spacer sequences of the ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca: Planorbidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 153–158.
- Wiens, J.J., 1998. Does adding characters with missing data increase or decrease phylogenetic accuracy? *Syst. Biol.* 47, 625–640.

Wiens, J.J., Reeder, T.W., 1995. Combining data sets with different numbers of taxa for phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* 44, 548–558.

WHO-World Health Organization. 1993. The control of schistosomiasis. Second report of the WHO expert committee. Technical Report Series Geneva, Switzerland, 830: 86 pp.

WHO-World Health Organization. 1998. Rapport de la Consultation informelle de L'OMS sur la lutte contre la schistosomiase. OMS, Gene`ve (WHO/CDS/SIP/99).

228

Winnepennickx, B., Backeljau, T. & De Wachter, R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9: 407.

Woodruff, D.S. y M. Mulvey. 1997. Neotropical schistosomiasis: African affinities of the host snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 60: 505-516.

ANEXO

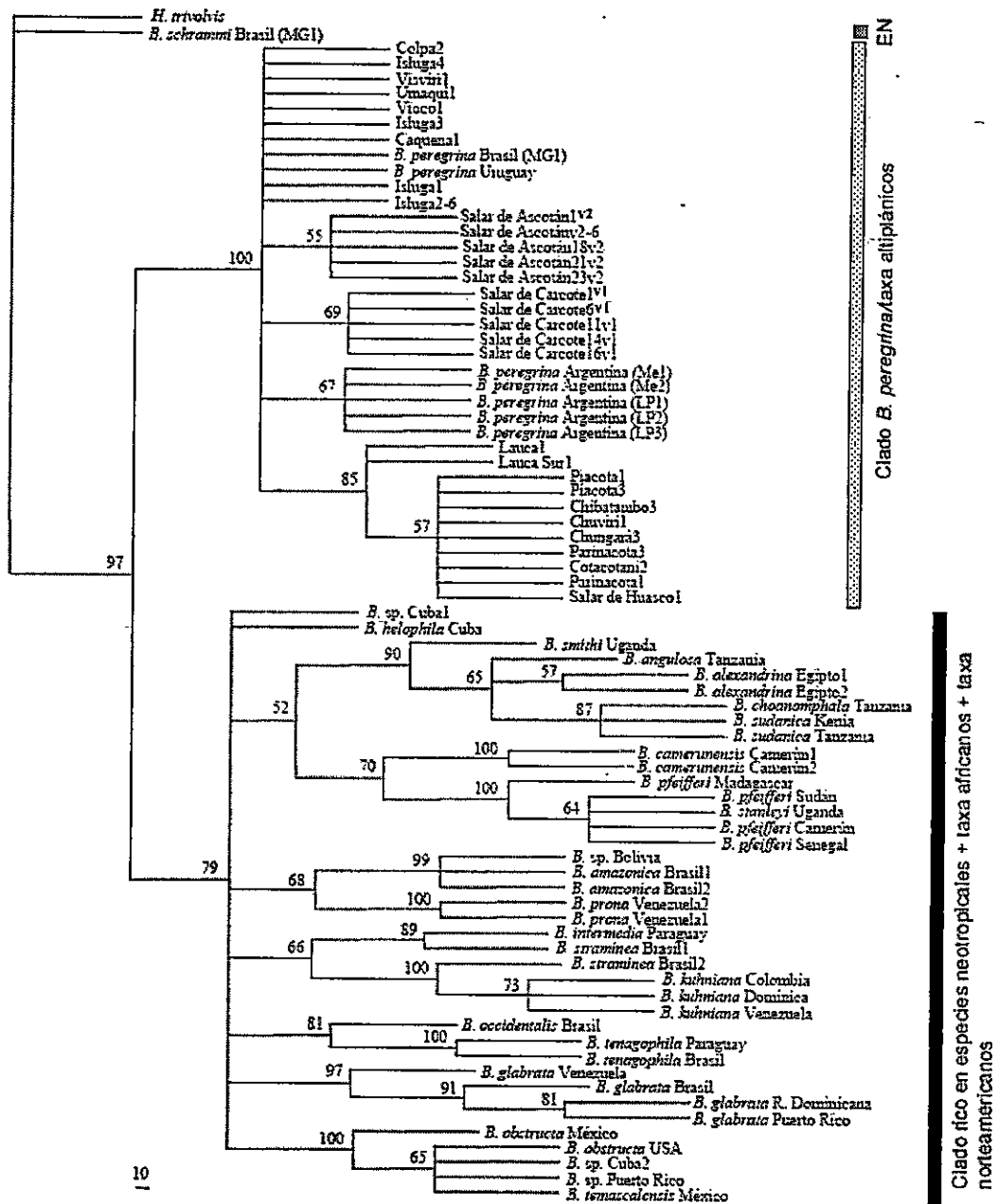


Figura A. Arbol de consenso de mayoría obtenido del análisis de máxima parsimonia utilizando secuencias de mtDNA 16S. Los numero en los nodos indican los valores de soporte bootstrap (sólo se muestran los valores superiores a 50%).

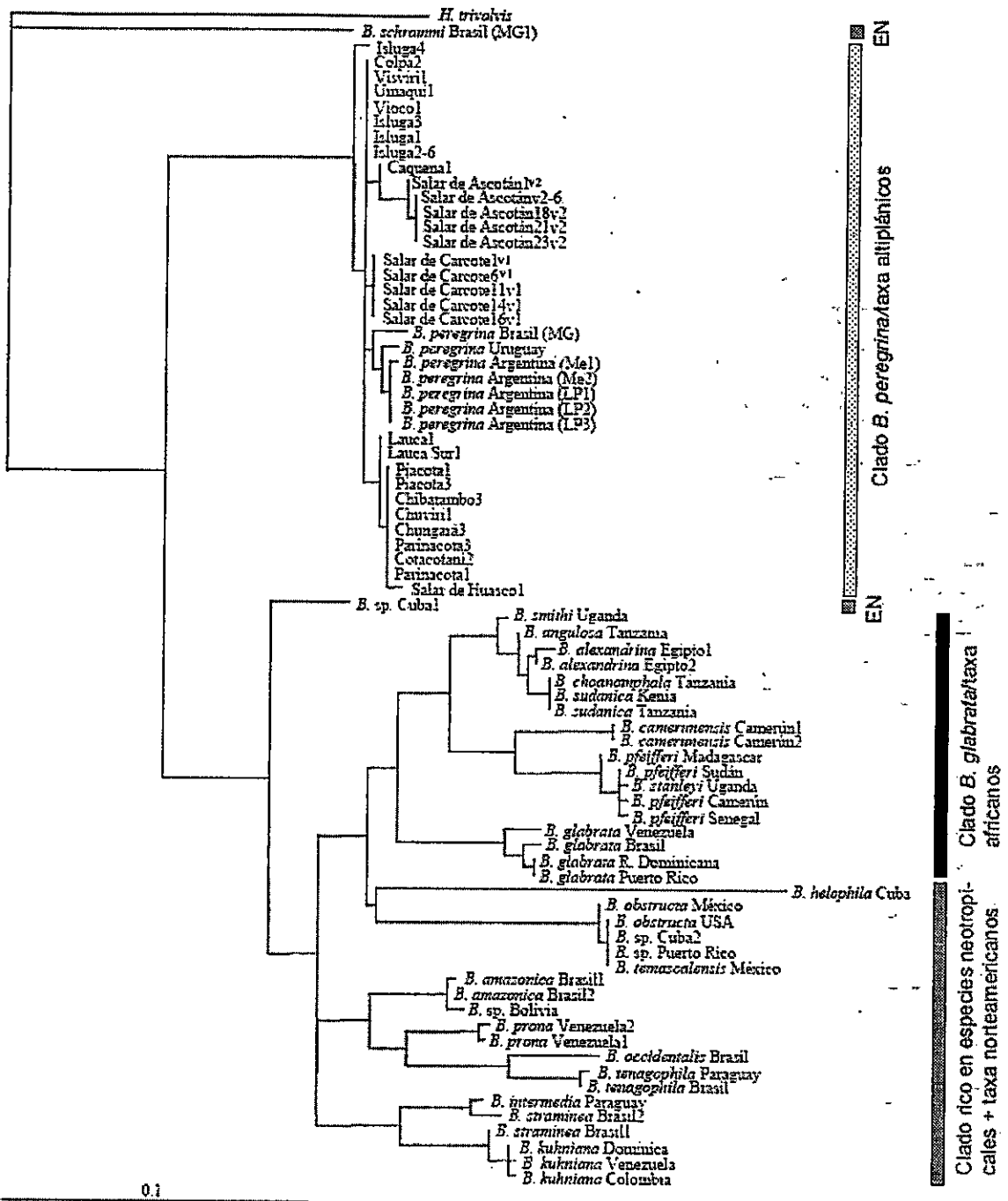


Figura B. Arbol obtenido del análisis de máxima verosimilitud utilizando secuencias de mtDNA 16S.

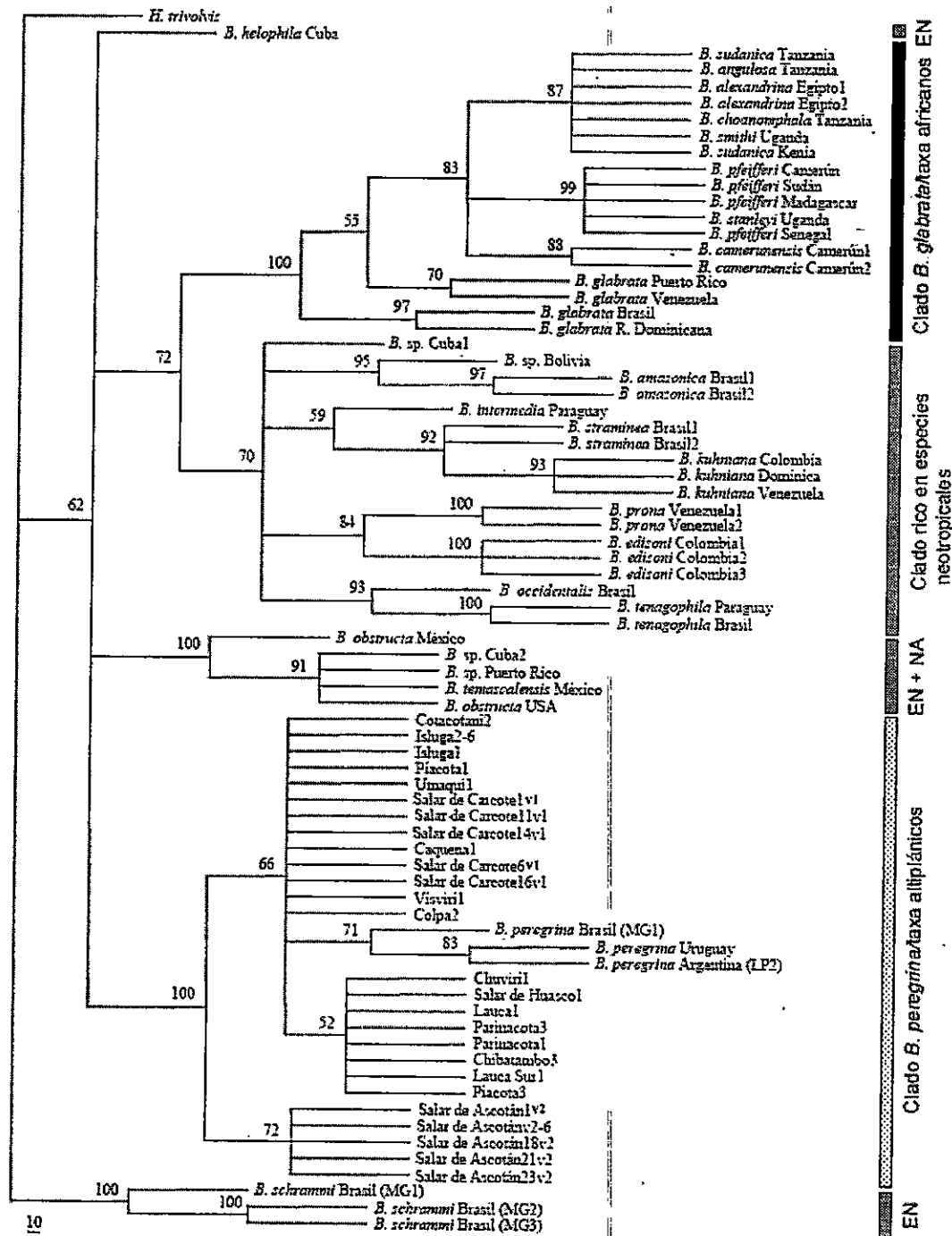


Figura C. Arbol de consenso de mayoría obtenido del análisis de máxima parsimonia utilizando secuencias de la región nuclear ITS1 de rRNA. Los números en los nodos indican los valores de soporte bootstrap (sólo se muestran los valores superiores a 50%).

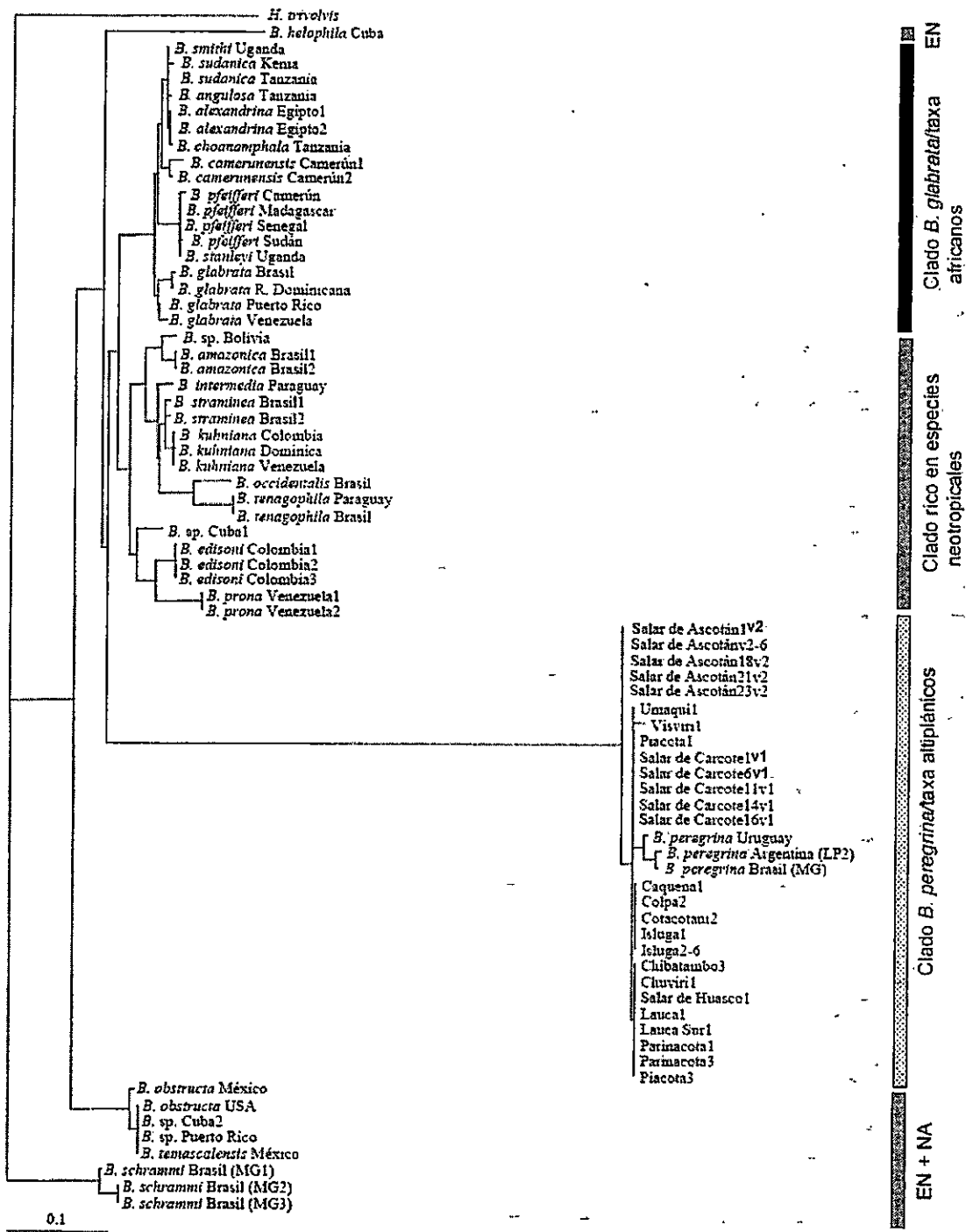


Figura D. Arbol obtenido del análisis de máxima verosimilitud utilizando secuencias de la región nuclear ITS1 de rRNA.

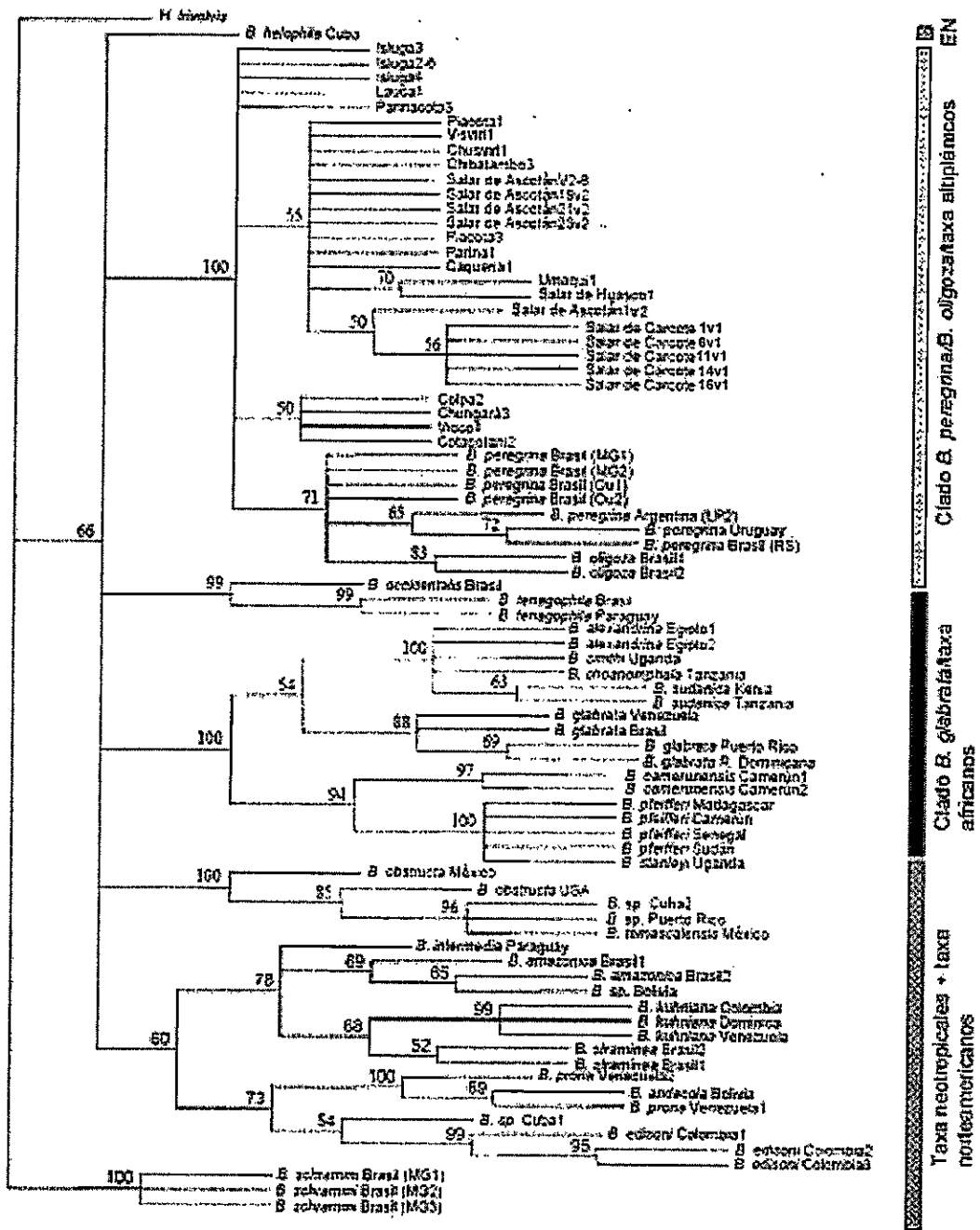


Figura E. Arbol de consenso de mayoría obtenido del análisis de máxima parsimonia utilizando secuencias de la región nuclear ITS2 de rRNA. Los números en los nodos indican los valores de soporte bootstrap (sólo se muestran los valores superiores a 50%).

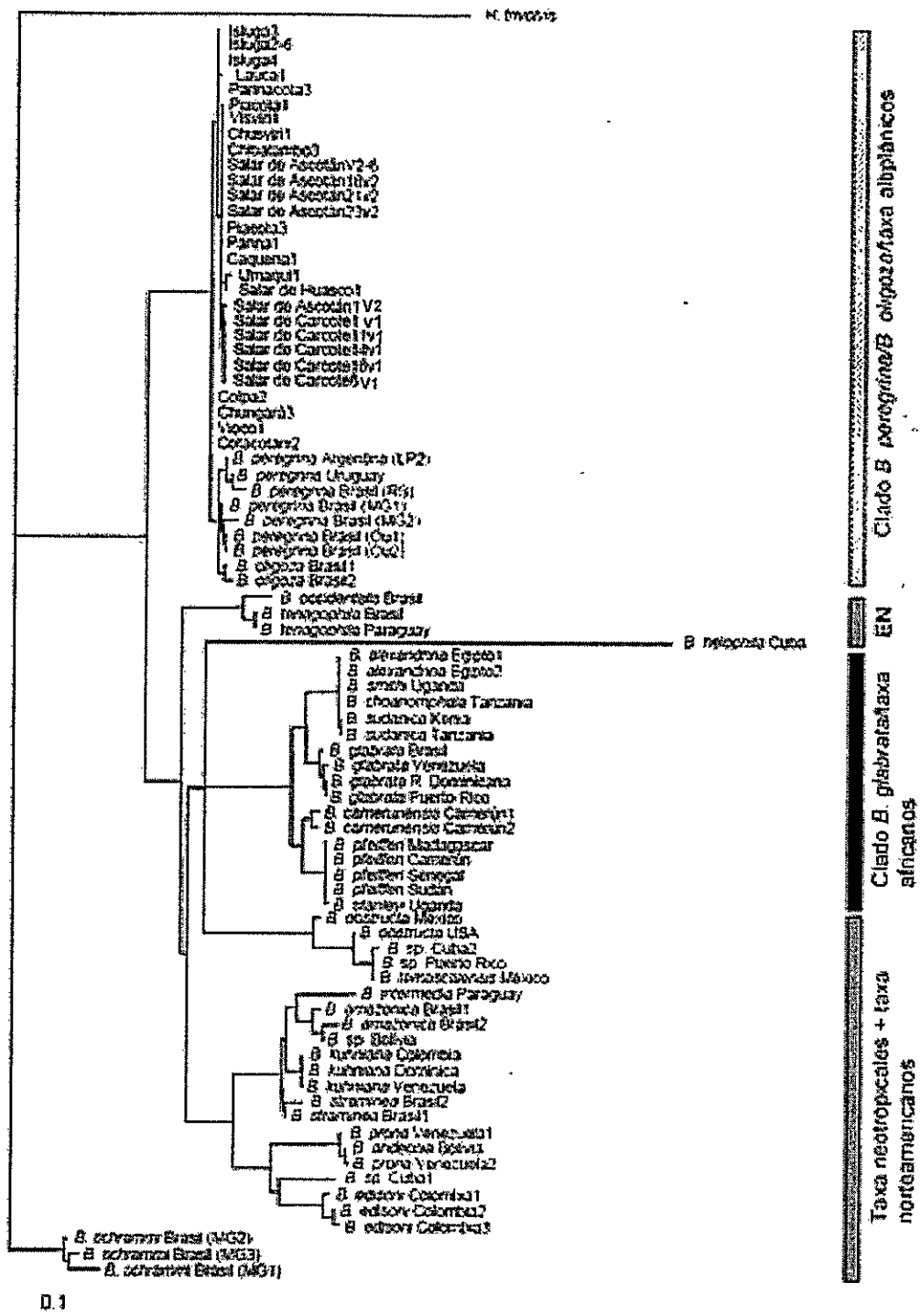


Figura F. Arbol obtenido del análisis de máxima verosimilitud utilizando secuencias de la región nuclear ITS2 de rRNA.

CAPITULO 3

ARTICULO PARA SER SOMETIDO A LA REVISTA

ZOOLOGICAL SCRIPTA

**MONOPHYLY, CANDIDATE SPECIES AND VICARIANCE IN
POPULATIONS OF FRESHWATER SNAILS OF THE GENUS
BIOMPHALARIA PRESTON, 1910 (MOLLUSCA: PLANORBIDAE)
FROM THE SOUTHERN ALTIPLANO**

Gonzalo. A. Collado¹, Irma Vila² and Marco. A. Méndez¹

¹*Laboratorio de Genética y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Chile. g.collado@eudoramail.com; mmendez@uchile.cl*

²*Laboratorio de Limnología, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras 3354, Santiago, Chile.*

limnolog@uchile.cl

Abstract

The landscape of the Neotropical southern Andean Altiplano is characterized by a succession of closed basins originated from the Miocene to the Holocene. In this region, the number of species and phylogenetic relationships among freshwater snails of the genus *Biomphalaria* are uncertain. Here we obtained sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I from 17 Altiplano populations, including topotypes of three nominal species, which were analyzed together with published sequences of the genus using different methods of phylogenetic reconstruction and a species of *Helisoma* as outgroup. The Altiplano populations conform a monophyletic group whose sister group is the Neotropical species *B. peregrina*. Within this clade we recovered four main lineages well supported and congruent with geographical distributions. One clade includes topotypes restricted exclusively to the Ascotán basin, the type locality of the nominal species *B. thermalis*. A second clade includes sequences that correspond to topotypes restricted to the Isluga and Carcote basins, the type localities of the nominal species *B. aymara* and *B. costata*, respectively. Two monophyletic groups clustered snails restricted to several aquatic systems within the Caquena and Lauca basins, which may represent candidate species. The branching pattern of the sequences suggests that in the diversification of these snails, events of vicariance inferred in the Pleistocene have predominated over dispersal phenomena.

1. Introduction

The freshwater lunged snails of the genus *Biomphalaria* Preston, 1910 are restricted to tropical and subtropical areas of America, Africa and the Middle East (Malek, 1985; Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001). At present, 30-35 species of the genus are considered valid species (DeJong et al., 2001; Estrada et al., 2006; Jørgensen et al., 2007), although its taxonomy is open to modifications, mainly by the description of new species.

The Neotropical southern Andean Altiplano, located in the Andean Western Cordillera, is a region whose landscape is characterized by a large number of closed basins originated as consequence of a high tectonic, sedimentary and volcanic activity occurred from the Miocene to the Holocene, in addition to complex climatic events (Fornari et al., 2001; Risacher et al., 2003; Strecker, 2007). In fact, it has been reported that the region has suffered the activity of more than 170 Upper Miocene and Pliocene-Pleistocene volcanoes (Wörner et al., 2000) and the development of a succession of several paleolakes (Clapperton 1993; Fornari et al., 2001; Placzek et al., 2006). At present, the basins constitute restricted environments generally delineated by volcano chains reaching 4000-6500 m in elevation (Risacher et al., 2003) and whose central depression is occupied by numerous hydrological systems, including rivers, springs, lakes, lagoons, streams, swamps and salars. Its isolation, climatic effects and the composition of deposits of the drainage area have influenced the characteristics of water quality in relation to the range of temperature, content and concentration of salts, dissolved oxygen and ionic composition (Dorador et al., 2003; Risacher et al., 2003; Marquez et al., 2010). The climate of southern Altiplano is cool and semi-arid to arid and its geological and ecological features provide an interesting scenario to study the

diversification of the species and populations of the aquatic organisms that live there. Despite its great apparent aridity, this area does receive water, mostly from the so-called "Bolivian winter", which produces rain and snowstorms from December to March. This precipitation amounts to between 50 and 200 mm along the south-north axis (Hurlbert and Chang 1984; Chong, 1988). Although this climatic phenomenon does not reach the lower altitudes of the desert, precipitation from the high mountains reaches the drainage system from runoff and subterranean filtration (Keller and Soto, 1998). Additionally, according to investigations carried out in some aquatic systems of the region, the geology and climate have led to surface waters that contain a very high saline load (Vila, 1975; Muhlhauser et al., 1995; Dorador et al., 2003), which could limit the type and distribution range of the biota (e.g. Keller and Soto, 1998). Several species of invertebrates and vertebrates are found in these systems; although the fish fauna, composed principally of the endemic killifish of the genus *Orestias* Valenciennes, 1839 is the most studied group (Parenti, 1984; Pinto and Vila, 1987; Northcote, 2000; Lussen et al., 2003). Concerning zoogeographic patterns, the current latitudinal distribution of these cyprinodontiforms in the southern Altiplano is hypothesized to be a consequence of the fragmentation of populations during the Pleistocene after the large lakes Ballivian and Minchin dried up (Vila, 2006).

In some aquatic systems of the southern Altiplano is possible to find populations of *Biomphalaria*. The number of valid species of this group is uncertain. The species *Biomphalaria thermala* (Biese, 1951), *Biomphalaria costata* (Biese, 1951) and *Biomphalaria aymara* Valdovinos and Stuardo, 1991 have been described in the region (Sielfeld, 2001; Valdovinos 1999, 2006), although some authors do not agree with this classification. Malek (1985), for example, argued that *B. thermala* is only a

population of *Biomphalaria. andecola* (Orbigny, 1835), which also inhabits Peru and Bolivia, while according to Paraense (1966), *B. costata* corresponds to *Biomphalaria peregrina* (Orbigny, 1835), a widespread species in South America (Paraense, 1966). In a recent phylogenetic analysis of the genus *Biomphalaria*, the Altiplano populations were recovered in a strongly supported clade together *B. oligoza* (Orbigny, 1835) and *B. peregrina* (Collado and Méndez, 2010), but the internal resolution of the relationships was poor.

Although in the southern Altiplano several geological studies have been carried out (Charrier, 1997; Wörner et al., 2000; Coutand et al., 2001; Carrapa et al., 2006; Strecker, 2007), a comprehensive framework of the geological events concerning the chronology of the origin of the basins is far from being completed. The species of *Biomphalaria* are hermaphroditic snails with direct development and limited vagility, and thus constitute a suitable model to test biogeographic hypotheses concerning geographic isolation in isolated habitats, or alternatively passive dispersal phenomena. In this study we obtained DNA sequences of the mitochondrial gene cytochrome oxidase subunit I (COI) from 17 Altiplano populations of *Biomphalaria* to test the hypothesis that the phylogenetic structure of these snails is congruent with the geographic splitting of the region. To obtain a robust phylogeny of the group, we analyzed mtDNA sequences of Altiplano populations, including topotypes of the three nominal species, together with published sequences of species of the genus from other geographic regions available in GenBank (see below). Under a vicariance hypothesis, we expect to find Altiplano lineages restricted to the basins where the snails were sampled. The alternative hypothesis is a shallow phylogeny.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Individuals of *Biomphalaria* were collected from 17 localities belonging to six different closed hydrological basins of the southern Andean Altiplano (Table 3.1; Fig. 3.1), a geographic area located between 17° and 22° S latitude that forms part of the South American biogeographic province of the Puna (Morrone, 2004). Some localities are isolated by terrestrial barriers, and are all above 3500 m altitude. The Caquena basin includes five collection sites: Umaqui, Vioco, Colpa, Caquena and Visviri. The Lauca basin includes eight collection sites: Parinacota, Chuviri, Piacota, Cotacotani, Lauca River (sample 1), Lauca River (sample 2 “Lauca Sur”), Chibatambo and Lago Chungará. The Isluga basin contains a homonymous town, river and swamp that correspond to the type locality of *B. aymara*. We obtained snails from the swamp. The Salar de Huasco basin includes one collection site in a spring of the salar. The fifth basin was Salar de Carcote, which includes one collection site in the spring of the salar that corresponds to the type locality of *B. costata* (see Biese, 1951). The sixth basin was Salar de Ascotán, type locality of *B. thermalis*. Two collection sites from this salar were included.

2.2. DNA sequencing and phylogenetic analyses

Genomic DNA was extracted from snails preserved in absolute ethanol using the CTAB method (Winnepennickx et al., 1993). The COI region corresponding to the mitochondrial gene cytochrome oxidase 1 (COI) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in 2-17 specimens per basin (Table 1) using the primers HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') and LCO1490 (5'-

GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') developed by Folmer et al. (1994). Amplified products were sequenced by the Macrogen Company. These sequences were edited and aligned by visual inspection using the program BioEdit (Hall, 1999). Percentages of sequence divergence were calculated using the program MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Phylogenetic relationships were examined using the methods of Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML) and Bayesian inference (BI); the first two of these were performed using the program PAUP* (Swofford, 2003). The MP analyses used a heuristic search with the TBR (tree bisection and reconnection) branch swapping algorithm, with the addition of random sequences. Character states were treated as unordered, assuming equal weight. The statistical confidence of the nodes was evaluated using 1000 bootstrap pseudoreplicates (Felsenstein, 1985). For the ML analyses we selected the best evolutionary model under the Akaike Information Criterion (AIC) using the program jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). The phylogenies have been estimated by Bayesian inference with MrBayes v. 3.1.2. For the Bayesian analyses we used MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) with the best model of sequence evolution obtained with jModelTest under the Bayesian Information Criterion (BIC). The COI ingroup included 64 sequences: 48 from Neotropical Altiplano populations, eight from non Altiplano Neotropical species and eight from Africa (Table 2). For the phylogenetic analyses the outgroup utilized was *Helisoma trivolvis* (Say, 1817) based on previous phylogenetic analyses (Bandoni et al., 1995; DeJong et al., 2001; Morgan et al., 2002) [GenBank access number COI, AY227371, sample from Canada (Remigio and Herbert, 2003)].

Table 3.1. Geographic position of Altiplano localities sampled and number of sequences obtained in the present study. NSB: number of sequences by basin.

Population	Hydrological system	N° COI sequences	Latitude (S)	Longitude (W)	Altitude (m)
<i>Caquena basin</i>					
Visviri	Swamp	3	17°35'46"	69°28'32"	4078
Umaqui	Swamp	3	17°44'12"	69°23'26"	4132
Vioco	Swamp	3	18°02'30"	69°16'45"	4383
Colpa	Stream-swamp	1	18°03'29"	69°13'52"	4384
Caquena	River-swamp	3	18°03'33"	69°12'16"	4398
NSB		13			
<i>Lauca basin</i>					
Parinacota	Stream-swamp	3	18°12'51"	69°18'05"	4399
Chuviri	Swamp	3	18°10'09"	69°20'05"	4374
Piacota	Lagoon	3	18°12'02"	69°16'04"	4427
Cotacotani	Lake	2	18°12'21"	69°13'50"	4525
Lauca River 1	River	1	18°11'39"	69°16'25"	4395
Lauca River 2	River	1	18°22'37"	69°20'49"	4232
Chibatambo	Stream-swamp	1	18°22'37"	69°20'49"	4232
Chungará	Lake	3	18°13'56"	69°10'52"	4583
NSB		17			
<i>Isluga basin</i>					
Isluga	River-swamp	3	19°15'10"	68°42'15"	3776
NSB		3			
<i>Huasco basin</i>					
Salar de Huasco	Spring	2	20°15'33"	68°52'24"	3805
NSB		2			
<i>Carcote basin</i>					
Salar de Carcote	Spring	7	21°16'04"	68°19'21"	3688
NSB		7			
<i>Ascotán basin</i>					
Salar de Ascotán	Spring 2 (V2)	5	21°29'07"	68°15'21"	3716
	Spring 6 (V6)	3	21°29'53"	68°15'26"	3716
NSB		8			

Divergence times

Divergence times among *Biomphalaria* lineages were estimated using the BEAST program, which employs a bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithm (Drummond et al., 2007), using a COI substitution rate of 2-4% My⁻¹ (see Campbell et al., 2000). The bayesian tree included one sequence by population/species of

Biomphalaria analyzed under a strict molecular clock and the COI model of evolution obtained in JModelTest.

2.3. Biogeography

In order to examine the diversification pattern of populations of *Biomphalaria* from the southern Altiplano, the localities were coded according to their basins and mapped onto a phylogenetic hypothesis in the software Mesquite 2.6 (Maddison and Maddison, 2010).

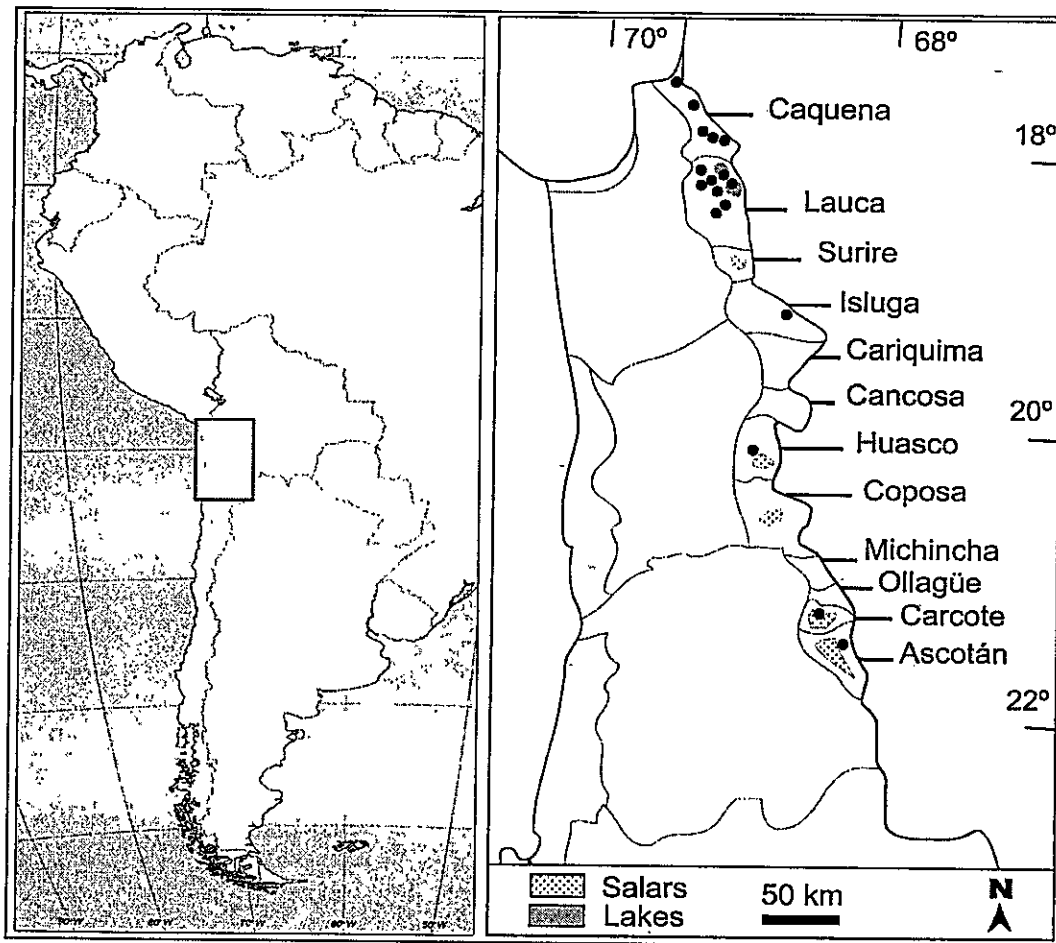


Figure 3.1. Sampling localities of *Biomphalaria* populations within the closed basins in the southern Andean Altiplano.

Table 3.2. Geographic origin of *Biomphalaria* samples studied, GenBank accession numbers and sources of the sequences of the mtDNA COI gene utilized in the present study.

Species/Population	Accession n°	Location	Source
<i>B. alexandrina</i> (Ehrenberg, 1831)	DQ084825	Egypt	Jorgensen et al. (2007)
<i>B. angulosa</i>	DQ084826	Ruaha River, Tanzania	Jorgensen et al. (2007)
<i>B. camerunensis</i> (Boettger, 1941)	DQ084827	Lake Bakassi, Cameroon	Jorgensen et al. (2007)
<i>B. choanomphala</i> (Martens, 1879)	DQ084828	Lake Victoria, Uganda	Jorgensen et al. (2007)
<i>B. glabrata</i> (Say, 1818)	DQ084824	Puerto Rico	Jorgensen et al. (2007)
<i>B. occidentalis</i> Paraense, 1981	AF199090	Brazil	Martin and Rollinson, unpublished
<i>B. pfeifferi</i> (Krauss, 1848)	AF199105	Madagascar	Martin and Rollinson, unpublished
<i>B. peregrina</i> (Orbigny, 1835)	GU168593	Mendoza, Argentina La Plata, Argentina	Standley et al, unpublished Present study
<i>B. smithi</i> Preston, 1910	DQ084836	Lake Edward, Uganda	Jorgensen et al. (2007)
<i>B. stanleyi</i> (Smith, 1888)	DQ084837	Lake Albert, Uganda	Jorgensen et al. (2007)
<i>B. straminea</i> (Dunker, 1848)	AF199084	Brazil	Martin and Rollinson, unpublished
<i>B. sudanica</i> (Martens, 1873)	DQ084838	Lake Albert, Uganda	Jorgensen et al. (2007)
<i>B. tenagophila</i> (Orbigny, 1835)	AF199089	Brazil	Martin and Rollinson, unpublished
<i>B. sp. Visviri</i>	GU168060-GU168062	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Vioco</i>	GU168063-GU168065	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Caquena</i>	GU168066-GU168068	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Colpa</i>	GU168069		
<i>B. sp. Umaqui</i>	GU168070-GU168072	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Piacota</i>	GU168073-GU168075		
<i>B. sp. Cotacotani</i>	GU168076-GU168077	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Parinacota</i>	GU168078-GU168080	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Chungará</i>	GU168081-GU168083	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Chuviri</i>	GU168084	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Huasco</i>	GU168085-GU168086	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Lauca Sur</i>	GU168087	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Chibatambo</i>	GU168088	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Lauca</i>	GU168089	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Isluga</i>	GU168090-GU168092		
<i>B. sp. Carcote</i>	GU168093-GU168099	Altiplano, Chile	Present study
<i>B. sp. Ascotan</i>	GU168100-GU168107	Altiplano, Chile	Present study

3. Results

The amplification of the COI gene produced a fragment of 663 nucleotides for the specimens of the southern Altiplano, which was reflected in the final length of the alignments. The nucleotide composition considering all the sequences was 25.8% A, 14.0% C, 41.7% T and 18.4% G. The number of informative characters for parsimony was 108. The COI MP analyses produced 48 equally parsimonious trees (length= 266; consistency index = 0.55; retention index = 0.88). All these trees recovered the Altiplano populations as a monophyletic group within *Biomphalaria* (84% bootstrap support), with *B. peregrina* as sister group (100%) (see the consensus tree, fig. 3.2). The analyses also inferred the Neotropical species *B. glabrata* as sister group of all the African species (83%) and *B. tenagophila* as sister group of *B. occidentalis* (69%). The COI ML analyses (GTR + G; $-\ln L = 2691.591$) produced three trees with minimum differences in the topologies, one of them is show in Figure 3. The Bayesian analyses produced a consensus tree (not show) with the same topology in basal and terminal nodes compared to the ML analyses. As in MP, the last two methods recovered the Altiplano populations as a particular lineage within *Biomphalaria* (1.00 posterior probability (p.p.) under BI). Within the Altiplano clade, four lineages were identified for all three methods utilized in the present study to reconstruct phylogenies. One clade is composed of the populations of the Caquena basin (97% bootstrap under MP/ 1.00 p.p. under BI); a second clade by the populations sampled from the Lauca and Salar de Huasco basin (86% /1.00 p.p.); and a third by the populations sampled from Isluga and Salar de Carcote basin (95%/1.00 p.p.). The fourth lineage was formed by the population from the Salar de Ascotán (99%/1.00 p.p.).

The mean genetic divergence among all *Biomphalaria* taxa was 4.7% using the two-parameter model (K2P) of Kimura (1980). The minimum genetic divergence observed was 2.8% between the Neotropical *B. peregrina* and Altiplano taxa, corroborating its close phylogenetic relationship. The highest distance occurs between this last group and the African taxa (Table 3.3). The COI distances among Altiplano populations and *B. peregrina* is given in Table 4. The divergence times between *B. peregrina* and Altiplano taxa was estimated around 1.01 to 0.47 My. All the divergence times among the Altiplano lineages were estimated in the Pleistocene (Fig. 3.3).

Table 3.3. Percent of mean genetic sequence divergence (K2P) among groups of taxa from COI data.

	<i>B. glabrata</i>	African species	Neotropical species	
			Non Altiplano	<i>B. peregrina</i>
<i>B. glabrata</i>				
African species	6.4			
Neotropical species (non Altiplano)	8.0	8.6		
<i>B. peregrina</i>	9.9	10.4	9.9	
Altiplano taxa	10.6	11.1	10.3	2.8

Table 3.4. Percent of divergence between pairs of sequences of mtDNA COI from Altiplano populations using K2P. (Only one sequence per population was selected).

Taxa/Population	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1. <i>B. peregrina</i>																	
2. Visviri	2.5																
3. Umaqui	2.5	0.0															
4. Colpa	2.5	0.0	0.0														
5. Vioco	2.5	0.0	0.0	0.0													
6. Caquena	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0												
7. Parinacota	3.3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0											
8. Piacota	3.6	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	0.3										
9. Chungará	3.6	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	0.3	0.3									
10. Chibatambo	3.3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.0	0.3	0.3								
11. Cotacotani	3.6	2.3	2.3	2.3	2.3	2.3	0.3	0.0	0.3	0.3							
12. Chuviri	3.3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.3						
13. Lauca	3.4	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	0.2	0.5	0.5	0.2	0.5	0.2					
14. Lauca Sur	3.3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.2				
15. Huasco	3.3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	0.0	0.3	0.3	0.0	0.3	0.0	0.2	0.0			
16. Isluga	3.3	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.8	2.2	2.2	1.8	2.2	1.8	2.0	1.8	1.8		
17. Carcote	2.9	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.5	1.8	1.8	1.5	1.8	1.5	1.7	1.5	1.5	0.6	
18. Ascotán	2.9	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6	2.8	3.1	2.8	2.8	3.1	2.8	2.9	2.8	2.8	2.9	2.6

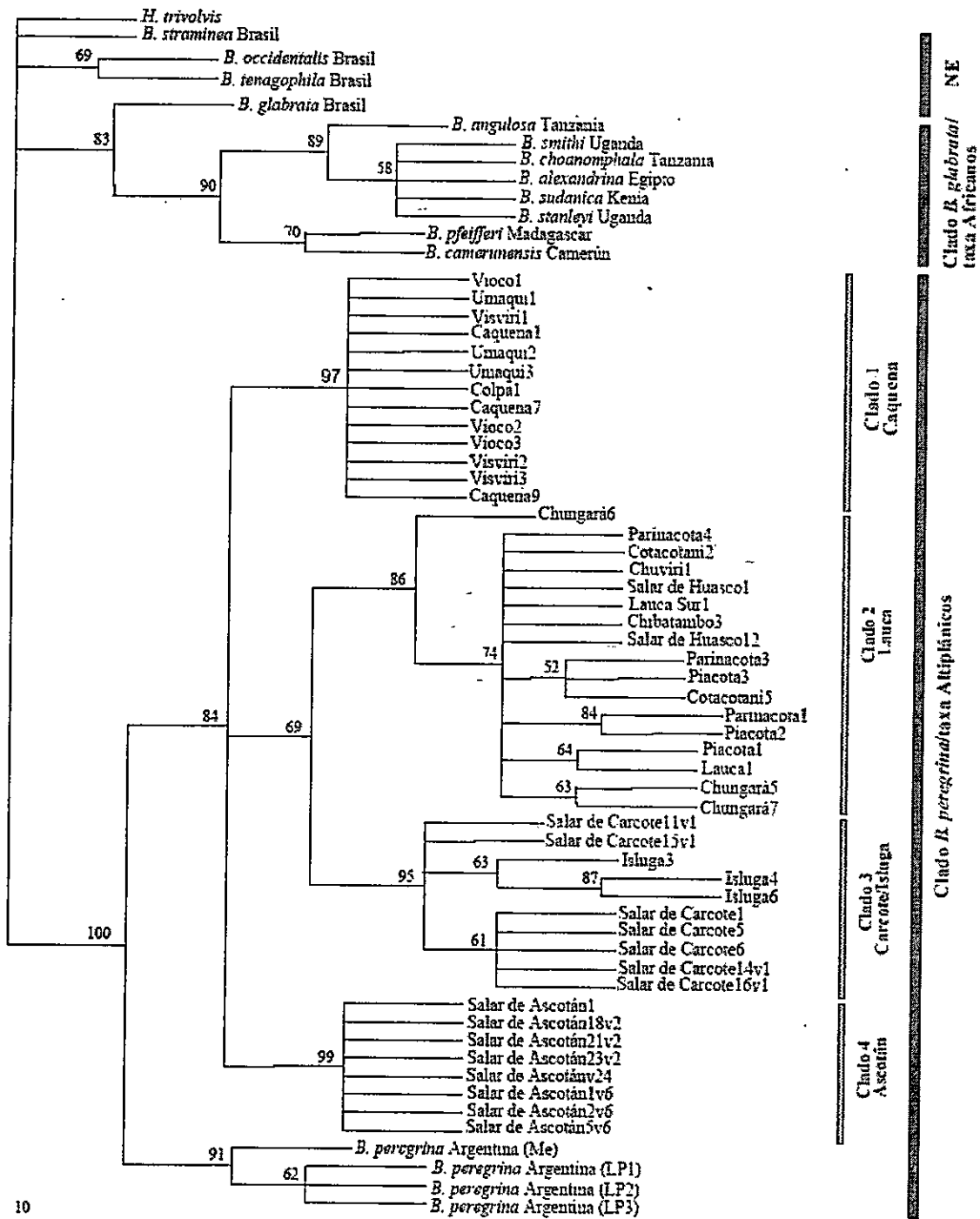


Figure 3.2. Consensus tree (majority rule) obtained by the maximum parsimony analyses using mtDNA COI sequences. Numbers at the nodes indicate the bootstrap support values (only values above 50% are given).

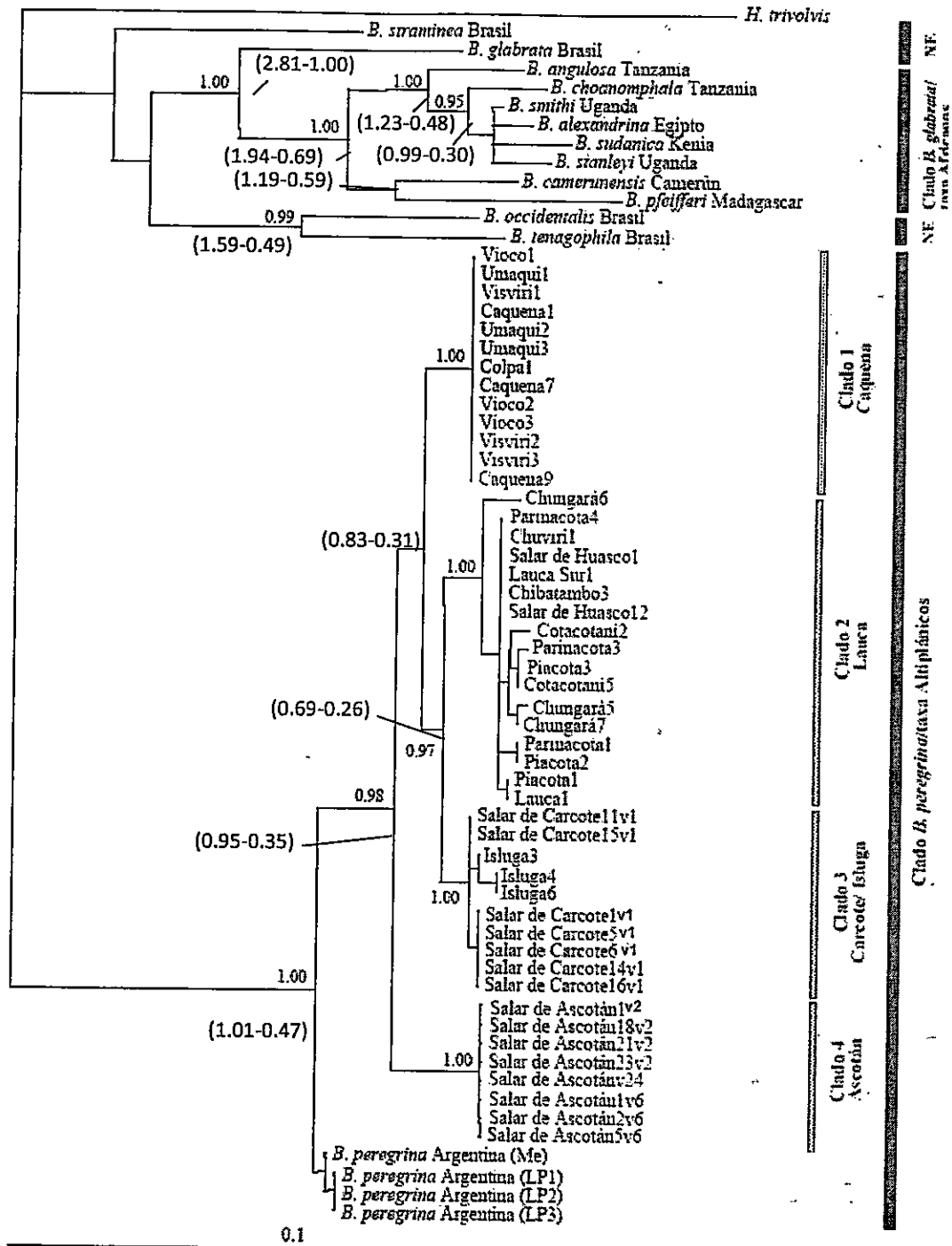


Figure 3.3. Tree obtained by the maximum likelihood analyses using mtDNA COI sequences. Numbers at the nodes indicate the posterior probabilities obtained in the bayesian analysis (only values above or equal to 0.95 are given). The range of divergence times are given in parenthesis.

4. Discussion

4.1. Molecular analyses

In this paper we used molecular phylogenetic analyses to examine relationships and deal with the taxonomic status of a poorly defined group of populations of *Biomphalaria* from the Neotropical southern Altiplano, and test biogeographic hypothesis regarding its diversification pattern. The COI molecular analyses retrieved Altiplano populations in a well supported clade, with the neotropical species *B. peregrina* as its sister group. The Altiplano populations are not closely related to African taxa according to the phylogenies obtained, which is consistent with the geographic separation of these groups of species and the molecular phylogenies that shows a sister group relationships between these species and the Neotropical *B. glabrata* (Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001).

The COI percentage sequence divergence among lineages within the Altiplano clade (0.2-3.1%, Table 4) show similar values relative to the nucleotide variation within the Nilotic species complex (1.1-3.0%), a clade of closely related species of *Biomphalaria* from Africa, which was identified in the molecular analyses carried out by DeJong et al. (2001) and whose phylogenetic relationships were further studied by Jørgensen et al. (2007). The COI genetic distances between non-Altiplano Neotropical species ranged from 5.7% to 10.9%; values that are greater than the pairwise distances found between Altiplano species and between African species, indicating that these Neotropical taxa are more ancient as suggested by the nucleotide polymorphism. Thus, considering the phylogenetic structure and the range of nucleotide divergence found in the Altiplano clade, we may define this monophyletic group as the "Southern Altiplano species complex" of *Biomphalaria*.

4.2. Taxonomic implications

Besides the monophyly of Altiplano populations recovered in the present study, the COI sequences revealed the existence of four main lineages within this monophyletic group (clades 1-4; Fig. 3.2 and 3.3). Clade 1 contains the snails from the five collection sites sampled within the Caquena basin, a drainage located in the northern part of the study area. Clade 2 includes snails restricted to eight localities within the Lauca basin, plus sequences of the snails from the Salar de Huasco basin. The MP, ML and BI analyses suggest that these two lineages may represent candidate species for which there are no available scientific names, and the percentage sequence divergence support this consideration (Table 3.4). To explain the finding that snails sampled in the Salar de Huasco, Huasco basin, appear forming a monophyletic groups with snail from the Lauca basin, we hypothesize that this distribution pattern may be the result of common ancestry starting from a stem population that suffered recent vicariance, that the species has a larger distribution range and that we have not found samples at intermediate localities between the basins, or alternatively be the product of passive avian transport as has been demonstrated for other species of gastropods (Rees, 1965; Malone, 1965; Wesselingh et al., 1999). Clade 3 contains sequences that correspond to topotypes restricted to the Isluga and Carcote basins; the type localities of *B. aymara* and *B. costata*, respectively. These nominal species could not be differentiated phylogenetically in the present study, but Collado and Méndez (2010) inferred that these taxa do not form a monophyletic group. According to Valdovinos and Stuardo (1991), *B. costata* and *B. aymara* are valid species considering size, shell morphology and the presence of a vaginal pouch in the first species; this character is not present in the later species. Despite that the basins where these snails live are separated

by five other basins that span near 300 km and are not interconnected, and therefore gene flow is unlikely, additional gene sequences or morphological data are required to further evaluate the hypothesis of one or two different taxa. Collado and Méndez (2010), on the other hand, suggested that *B. costata* is a different species of *B. peregrina*, and the present study corroborate this. Clade 4 was formed by the sequences from the Salar de Ascotán, Ascotán basin, the type locality of *B. thermala*. This taxon, distinguished on the basis of the phylogenetic analyses and genetic divergence constitutes the most southern and divergent of all Altiplano population examined in the present study.

4.3. Divergence times

Using a rate of evolution of the COI gene of 2%-4% per million years (My), Campbell et al. (2000) estimated that the lineage of African species diverged from an ancestor similar to *B. glabrata* approximately 3.6-1.8 million years ago (My). Based on this rate of evolution and a strict molecular clock we estimated this divergence between 2.81-1.00 My. All the divergence times among Altiplano populations were estimated in the Pleistocene (0.95 to 0.26 My) (Fig. 3.3), suggesting that the isolation of some hydrological systems could have occurred in this period. Using mitochondrial control region sequences of the killifish *Orestias*, divergence times in species of the “*agassii* complex” of the southern Andean Altiplano were estimated at 0.37 to 0.88 My by Lüssen et al. (2003) and between the Middle Pleistocene and the Holocene (Scott, 2010), which is concordant with our estimates. In the Altiplano there have been repeated episodes where extensive paleolakes have expanded and retracted, attributed to climatic changes (Servant and Fontes 1978; Clapperton 1993; Fornari et al. 2001; Fritz et al. 2004). Although a number of paleolakes have been described in the region, their

ages have not always been determined. Recently, Placzek et al. (2006) recognized six lacustrine phases, from the Coipasa formation (13.000-11.000 years BP) to the Ouki formation (120.000-98.000 years). These datings, together with that of the oldest dated Altiplano lake [Lake Escara, 191.000 years (Fornari et al., 2001)] suggest possible vicariance events as a product of the expansions and regressions of these paleolakes for populations found in the Lauca basin as suggested by the percentage sequence divergence. The estimated divergence times among the snail populations of the Salar de Carcote and Salar de Ascotán, and between these populations and those belonging to other lineages predate any of the known dated lacustrine cycles, but all of them are situated within the Pleistocene, a period where the volcanism and tectonic events influenced and molded the landscape of the southern Altiplano and coincident with the development of the paleolake Ballivian (Wörner et al., 2000; Fornari et al., 2001; Risacher et al., 2003).

4.4. Biogeography

Phylogenetic analyses suggest that the species and populations of *Biomphalaria* from Southern Altiplano comprise a monophyletic group that includes four distinct lineages. Using a phylogeny of this group is feasible to hypothesize events of geological evolution of this area mapping the character "basin occurrence" onto a tree. We base the inference in a ML analysis. The mapping of the distribution of *Biomphalaria* snails onto the tree, using *B. peregrina* as outgroup, is shown in Figure 3.4. The biogeographical reconstruction supports the hypothesis of vicariance among isolated basins, with three splitting events of the area. The first event separated the Ascotán basin from the rest of the area. Subsequently the Caquena basin split from the Lauca and Isluga-Carcote basins and finally Lauca from these last two drainages. The splitting occurred between

the Isluga and Carcote basins could not be inferred using the COI nucleotide variation. The position of the sequences of Salar de Huasco within the Lauca clade constitutes the only possible case of dispersal.

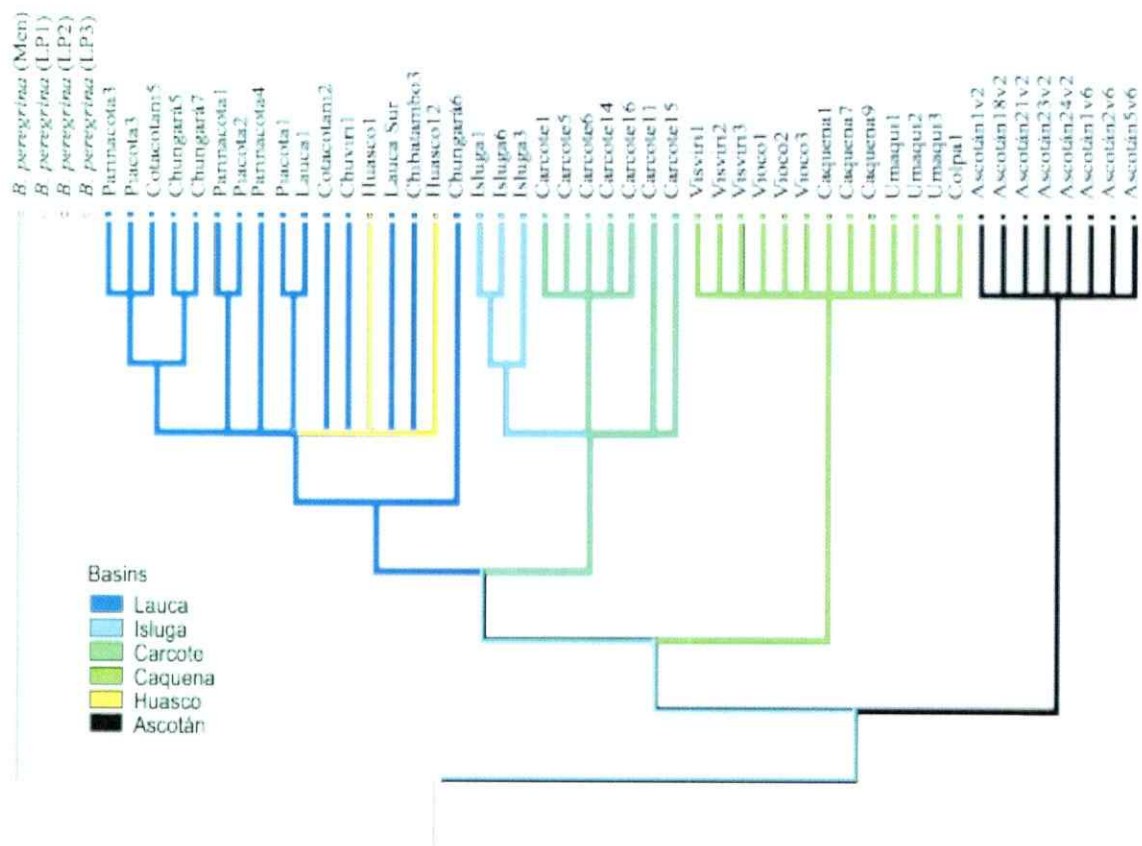


Figure 3.4. Mapping of localities upon a maximum likelihood tree reconstructed with COI sequences (HKY85 + G + I model). In the left corner of the figure are shown the drainage basins from the southern Altiplano.

This investigation was undertaken to address the origin and diversification of southern Altiplano populations of *Biomphalaria*. Phylogenetic trees revealed that these populations constitute a monophyletic group of closely related species, two of which need to be described formally. Additionally, the data provide evidence that Pleistocene events possibly linked to complex geological processes such as tectonics and volcanism

in the region, associated to climate effect, have promoted allopatric speciation in the group.

Acknowledgments

We thank Claudio Correa, Michell Sallaberry, Marjorie Correa and Luis Pastenes for their help in obtaining the snails of the Altiplano populations. We also thank Dr. Sergio Letelier, curator of the Museo Nacional de Historia Natural de Santiago, Chile, for his collaboration during the development of this study. This study was partially financed by projects MULT 05/04-2 and Domeyko: Biodiversidad Iniciativa Transversal 1 of the Universidad de Chile; FONDECYT 1061256 and 1080390. G. Collado thanks CONICYT.

References

- Biese, W.A. 1951. Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte 4: Planorbidae. *Boletín Museo de Historia Natural, Chile*, 25: 115-137.
- Campbell, G., Jones, C.S., Lockyer, A.E., Hughes, S., Brown, D.L., Noble, R., and Rollinson, D. 2000. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267: 2351–2358.
- Carrapa, B., Strecker, M.R. and Sobel, E. 2006. Sedimentary, tectonic and thermochronologic evolution of the southernmost end of the Puna Plateau (NW Argentina). *Earth Planet. Sci. Lett.* 247: 82–100.
- Charrier, R. 1997. Ciencias de la tierra y recursos mineros y energéticos en el Altiplano Chileno. In: González C (ed) *El Altiplano: Ciencia y Conciencia en los Andes*: 5-14. Universidad de Chile, Santiago.
- Chong, G. 1988. The Cenozoic saline deposits of the Chilean Andes between 18°00' and 27°00' south latitude, Vol. 17, p. 137–151. In: *The Southern Andes. Lecture Notes in Earth Sciences*. H. Bahlburg, Ch. Breitkreuz, and P. Geise (eds.). Springer Verlag, Berlin.
- Clapperton, C. 1993. Quaternary paleolakes of the arid regions of South America. In: *Quaternary geology and geomorphology of South America*. Elsevier, pp 489.
- Collado, G. A. and M.A. Méndez. 2010. Relaciones filogenéticas en *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae): reposicionamiento de taxa e identificación de un nuevo clado al interior del género. Capítulo 2 de esta tesis.

- Coutand, I., Cobbold, P.R., de Urreiztieta, M., Gautier, P. and Chauvin, A. 2001. Style and history of Andean deformation, Puna plateau, Northwestern Argentina. *Tectonics* 20: 210–34.
- DeJong, R.J., Morgan, J.A.T., Paraense, L., Pointier, J.-P., Amarista, M., Ayeh-Kumi, P.F.K., Babiker, A., Barbosa, C.S., Br_ emond, P., Canese, A.P., de Souza, C.P., Dominguez, C., File, S., Gutierrez, A., Incani, R.N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N.J.S., Mimpfoundi, R., Njiokou, F., Poda, J.N., Sene, M., Vel_ asquez, L.E., Yong, M., Adema, C.M., Hofkin, B.V., Mkoji, G.M. and Loker, E.S. 2001. Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution* 18: 2225-2239.
- DeJong, R.J., Emery, A.M. and Adema, C.M. 2004. The mitochondrial genome of *B. glabrata* (Gastropoda: Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 90: 991-997.
- Dorador, C., Pardo, R. and Vila, I. 2003. Variaciones temporales de parámetros físicos, químicos y biológicos de un lago de altura: el caso del lago Chungará. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76: 15–22.
- Drummond, A.J. and Rambaut, A. 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees". *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Estrada, V.E., Velásquez, L.E., Caldeira, R.L., Bejarano, E.E., Rojas, W. and Carvalho, O.S. 2006. Phylogenetics of South American *Biomphalaria* and description of a new species (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies* 72: 221–228.

- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and 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.
- Fornari, M., Risacher, F. and Féraud, G. 2001. Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 172: 269–282.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT, Version 5.0.9, 2001. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hurlbert, S. and Chang, C. 1984. Ancient ice islands in salt lakes of the Central Andes. *Science*, vol. 224.
- Jørgensen A., Kristensen, T.K. and Stothard, J.R. 2007. Phylogeny and biogeography of African *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae), with emphasis on endemic species of the great East African lakes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 151: 337-349.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Lüssen A., Falk, T.M. and Villwock, W. 2003. Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of

- mitochondrial DNA analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 151-160.
- Maddison, W.P. and Maddison, D.R., 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.6 <http://mesquiteproject.org>
- Malek, E.A. 1985. Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual. Pan American Health Organization Scientific Publication No. 478. PAHO, Washington.
- Malone, C.R. 1965. Killdeer (*Charadrius vociferus* Linnaeus) as a means of dispersal for aquatic gastropods. *Ecology* 46: 551-552.
- Morrone, J.J. 2004. La zona de transición sudamericana: caracterización y relevancia evolutiva. *Acta Entomológica Chilena* 28: 41-50.
- Paraense, W.L. 1966. The synonymy and distribution of "*Biomphalaria peregrina*" in the Neotropical region. *Revista Brasileira de Biologia* 26: 269-296.
- Parenti, L. 1981. A taxonomic revision of the Andean killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 178: 107-214.
- Placzek, C., Quade, J. and Patchett, P. 2006. Geochronology and stratigraphy of late Pleistocene lake cycles on the southern Bolivian Altiplano: Implications for causes of tropical climate change. *The Geological Society of America Bulletin* 118: 515-532
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25(7): 1253-1256.

- Remigio, E.A. and Herbert, P.D.N. 2003. Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropods relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 641-647.
- Rees, W.J. 1965. The aerial dispersal of mollusca. *Proceedings of the Malacological Society of London* 36 : 269-282.
- Risacher, F., Alonso, H. and Salazar, C. 2003. The origin of brines and salts in Chilean salars: a hydrochemical review. *Earth-Science Reviews* 63 : 249-293
- Ronquist, F. and J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Scott, S.A. 2010. Sistemática y filogenia de Orestias del complejo *agassizii* (Teleostei: Cyprinodontidae) de la Puna. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Universidad de Chile:-82 pp.
- Servant, M. and Fontes, J.C. 1978. Les laces quaternaires des hauts plateaux des Andes boliviennes. Premières interprétations paléoclimatiques. *Cahiers, ORSTOM, Géologie* 10(1) : 9-23. Paris.
- Sielfeld, W. 2001. Phylum Mollusca. Guías de Identificación y Biodiversidad Fauna Chilena. *Apuntes de Zoología* (pp. 1-15). Universidad Arturo Prat, Iquique. Chile.
- Strecker, M.R., Alonso, R.N., Bookhagen, B., Carrapa, B., Hilley, G.E., Sobel, E.R. and Trauth, M.H. 2007. Tectonics and Climate of the Southern Central Andes. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 35: 747-87.
- Swofford, D.L. 2003. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Ver. 4. [Computer software and manual]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

- Tamura, K, Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software. Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8): 1596-1599.
- Valdovinos, C. and Stuardo, J. 1991. Planorbidos altoandinos del norte de Chile y *Biomphalaria aymara* spec. nov. (Mollusca: Basommatophora). *Studies on Neotropical fauna and Environment* 26: 213-224.
- Valdovinos, C. 1999. Biodiversidad de moluscos chilenos: Base de datos taxonómica y distribucional. *Gayana Zoología* 63: 111-164.
- Valdovinos, C. 2006. Estado de conocimiento de los gastrópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana Zoología*, 70, 88-95.
- Vidigal, T.H.D.A., Spatz, L., Nunes, N.D., Simpson, A.J.G., Carvalho, O.S. and Dias Neto, E. 1998. *Biomphalaria* spp: Identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Experimental Parasitology* 89: 180-187.
- Vila, I. 2006. A New Species of Killifish in the Genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the Southern High Andes, Chile. *Copeia* 3: 472-477.
- Wesselingh, F.P., Cadée, G.C. and Renema, W. 1999. Flying high: on the airborne dispersal of aquatic organisms as illustrated by the distribution histories of the gastropod genera *Tryonia* and *Planorbarius*. *Geologie En Mijnbouw* 78: 165-174.
- Villwock, W., Sienknecht, U. and Lüssen, A., 2000. Taxonomic considerations on the genus *Orestias* Valenciennes, 1839 (Teleostei: Cyprinodontidae) of the Chilean Altiplano. In: Rheinwald, G. (Ed.), *Isolated Vertebrate Communities in the Tropics*, 46. Bonn. zool. Monogr., Germany, pp. 55-67.

- Winnepennickx, B., Backeljau, T. and De Wachter, R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9: 407.
- Wörner, G., Hammerschmidt, K., Henjes-Kunst, F., Lezaun, J. and Wilke, H. 2000. Geochronology ($^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$, K-Ar and He-exposure ages) of Cenozoic magmatic rocks from Northern Chile (18-22°S): implications for magmatism and tectonic evolution of the central Andes. *Revista Geológica de Chile* 27: 205-240.

CAPITULO 4

ARTICULO PARA SER SOMETIDO A LA REVISTA

JOURNAL OF BIOGEOGRAPHY

VARIACION MORFOLOGICA Y GENETICA EN POBLACIONES
DEL GENERO *BIOMPHALARIA* PRESTON, 1910 (MOLLUSCA:
PLANORBIDAE) DE DOS SISTEMAS EVAPORITICOS DEL
ALTIPLANO CHILENO: ¿DISPERSION O DIFERENCIACION A
ESCALA MICROGEOGRAFICA?

Gonzalo. A. Collado y Marco. A. Méndez

*Laboratorio de Genética y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las
Palmeras 3425, Ñuñoa, Chile. g.collado@eudoramail.com; mmendez@uchile.cl*

Resumen

Objetivo Las cuencas de Ascotán y Carcote encierran salares alimentados por una serie de vertientes total o parcialmente aisladas por barreras terrestres representando experimentos naturales que permiten investigar la diferenciación de las poblaciones a escala microgeográfica. Análisis filogenéticos sugieren que las poblaciones de *Biomphalaria* que habitan estos sistemas corresponderían a dos unidades evolutivas independientes. En este trabajo examinamos la variación morfológica y genética dentro y entre salares para 1) evaluar la hipótesis de dos diferentes taxa, 2) examinar la divergencia genética y morfológica entre poblaciones y 3) estimar el rango de distribución de las especies al interior de ambos sistemas evaporíticos para saber si coexisten en simpatria o alopatria.

Lugar de estudio Altiplano Sur, Cordillera de los Andes, Región Neotropical.

Métodos Para estimar la variación morfológica se midieron nueve variables de la concha en 263 caracoles provenientes de nueve localidades (vertientes) del Salar de Ascotán y tres del Salar de Carcote. De un subset de caracoles se obtuvieron secuencias del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) que fueron analizadas utilizando los métodos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud, inferencia bayesiana y red de haplotipos.

Resultados Los análisis moleculares recuperaron dos clados con alto soporte bootstrap, uno consistiendo de caracoles muestreados en la vertiente 1 del Salar de Carcote, localidad tipo de *B. costata*, y otro que incluye caracoles de 11 vertientes diseminadas en ambos salares conteniendo poblaciones adjudicadas a *B. thermali*. La red de haplotipos revela dos haplogrupos claramente diferenciados. De un total de siete

haplotipos encontrados, ambos taxa presentan haplotipos únicos (dos y cinco, respectivamente). En *B. thermali* uno de los haplotipos presentó fuerte estructura filogeográfica mientras el más común estuvo presente en nueve localidades considerando ambos salares. El análisis discriminante asignó correctamente los ejemplares de *B. costata* a su localidad tipo el 78.1% de las veces.

Conclusiones principales Los análisis moleculares y morfológicos revelan la existencia de dos linajes alopátricos en estas cuencas endorreicas. Los haplotipos compartidos muestran que la dispersión entre salares es un proceso biogeográfico común en *B. thermali*. Como unidad de manejo, la población aislada de *B. costata* es prioritaria para la conservación.

Palabras clave:

Gasterópodos, Planorbidae, vicarianza, dispersión, análisis filogenético, filogeografía, análisis multivariado, Salar de Ascotán, Salar de Carcote, Altiplano Sur, Chile.

Introducción

El Altiplano de los Andes centrales es la segunda planicie más alta del mundo, con una altura promedio sobre los 3.800 m (Fornari et al., 2001). El Altiplano Sur contiene numerosas cuencas endorreicas intravolcánicas que albergan un lago, una costra salina o un salar en su depresión central. La mayoría de estos sistemas hidrológicos son remanentes de lagos más profundos que alguna vez cubrieron grandes extensiones de tierra, inundando cuencas que en la actualidad se encuentran aisladas por cadenas montañosas de gran altura (Risacher et al., 2003) que funcionan como barreras terrestres teóricamente infranqueables para la biota restringida al agua dulce (Keller y Soto, 1998; Chong, 1988; Vila, 2006). El Altiplano Sur ha sido afectado por volcanismo, sedimentación y oscilaciones paleoclimáticas (Clapperton 1993; Wörner et al., 2000; Fornari et al., 2001; Risacher et al., 2003; Strecker, 2007; Placzek et al., 2006), constituyendo un escenario ideal para evaluar hipótesis biogeográficas que promueven la especiación.

El Salar de Ascotán y el Salar de Carcote

En la región austral del Altiplano Sur correspondiente a territorio chileno existen dos sistemas evaporíticos endorreicos colindantes, las cuencas de Carcote (561 km²) y de Ascotán (1.757 km²). Se desconoce si estos sistemas se originaron de manera independiente o surgieron después de un evento eruptivo del volcán Chiliapichina (3900 m), el cual presenta conos con extensiones de terreno que actualmente forman una barrera terrestre que divide ambas cuencas. La cuenca de Carcote, que yace a 3.690 m de altura, tiene una precipitación anual de 100-150 mm y una temperatura media de 5.8°C. En su interior encierra el Salar de Carcote (104-108 km²) y poco más de 45

sistemas hídricos aislados y semiaislados, incluyendo el Lago Verde y el Lago Flaco, que en conjunto alcanzan 3 a 4 km² de superficie (Hulbert et al., 1976; Risacher et al., 2003). La cuenca de Ascotán, localizada a 3.716 m, incluye el Salar de Ascotán (243 km²), una laguna central de 18 km² (Risacher et al., 2003) y cerca de una veintena de vertientes aisladas y semiaisladas, la mayoría de ellas ubicadas en la ribera este del salar. Este salar presenta la misma temperatura y precipitaciones promedio que las registradas en el Salar de Carcote.

Relaciones filogenéticas

El género *Biomphalaria* Preston, 1910, familia Planorbidae, es un grupo de caracoles de agua dulce que se encuentra ampliamente distribuido en zonas tropicales y subtropicales de América y África (Paraense, 1966, 1975; Malek, 1985; Campbell et al., 2000; Jørgensen et al., 2007), siendo la región neotropical la que concentra el mayor número de especies (Vidigal et al., 2000; Estrada et al., 2000; DeJong et al., 2001). En el Altiplano Sur, análisis filogenéticos utilizando secuencias de las regiones nucleares ITS1 e ITS2 y del gen mitocondrial de RNA ribosomal 16S recuperaron las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* en un grupo monofilético junto a las especies neotropicales *B. peregrina* (Orbigny, 1835) y *B. oligoza* (Orbigny, 1835) (Collado y Méndez, 2010). Análisis moleculares posteriores utilizando el gen de evolución más rápida citocromo c oxidasa subunidad I permitieron inferir el complejo de especies altiplánicas de *Biomphalaria*, conformado por 4-5 especies (Collado et al., 2010); entre las que se encuentran *Biomphalaria thermalis* (Biese, 1951), confinada al Salar de Ascotán, y *Biomphalaria costata* (Biese, 1951), restringida al Salar de Carcote. Estos hallazgos concuerdan con la diferenciación morfológica realizada por Biese (1951) en el paper en que originalmente se nombraron las especies, pero estaban en desacuerdo con

Malek (1985), quien consideró a *B. thermali* como una población de *Biomphalaria andecola* (Orbigny, 1835), y también con Paraense (1966), quien sinonimizó a *B. costata* con *B. peregrina*. Si bien los análisis filogenéticos indican que *B. costata* y *B. thermali* son especies válidas (Collado y Méndez, 2010; Collado et al., 2010), estas investigaciones sólo incluyeron muestreos restringidos a una sola vertiente del Salar de Carcote en el caso de *B. costata* y dos vertientes del salar de Ascotán en el caso de *B. thermali*, por lo cual la taxonomía, distribución geográfica y relaciones filogenéticas entre las poblaciones de caracoles que habitan estos sistemas evaporíticos aún restan por ser clarificadas.

Evaluación de hipótesis

En este trabajo se examinan las relaciones filogenéticas entre poblaciones de *Biomphalaria* del Salar de Carcote y Salar de Ascotán mediante el análisis de secuencias mitocondriales del gen citocromo c oxidasa subunidad 1 (COI) y se investiga la variación morfológica utilizando análisis multivariado de la concha en caracoles obtenidos durante extensos muestreos al interior de ambos salares para responder tres preguntas fundamentales. La primera intenta evaluar más profundamente la hipótesis de dos diferentes taxa distribuidos en estas cuencas endorreicas. Morales (2009) y Scott (2010) recientemente han informado de la presencia de dos taxa distintos de peces del género *Orestias* Valenciennes 1839 en estos salares, *O. ascotanensis* Parenti, 1984 del Salar de Ascotán y *O. sp.* del Salar de Carcote. En la segunda evaluamos si las barreras terrestres han promovido la diferenciación a microescala geográfica entre vertientes considerando que estos caracoles son hermafroditas potencialmente autofecundables que presentan desarrollo directo y vagilidad limitada. En las especies citadas de *Orestias* se ha encontrado una estructura genética relativamente alta en ambas cuencas

endorreicas (Morales, 2009). Finalmente estamos interesados en estimar el rango de distribución de las poblaciones de *Biomphalaria* al interior de ambos sistemas evaporíticos.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Se recolectaron ejemplares de *Biomphalaria* en cada una de las localidades (vertientes) de cada salar donde estos caracoles fueron encontrados. Los animales fueron preservados en alcohol absoluto para el posterior análisis morfométrico y genético. En el Salar de Ascotán se muestreó toda la ribera Este y Sur, encontrándose caracoles en nueve vertientes. El Salar de Carcote fue rodeado completamente, encontrándose caracoles en tres vertientes (Fig. 4.1).

Estudio morfológico

Para el estudio morfológico se muestreó un total de 263 caracoles considerando ambos salares (Tabla 4.1). En 20-32 individuos por sitio se midieron nueve variables de la concha utilizando un ocular micrométrico (Fig. 2). Para reducir las diferencias entre los promedios y varianzas entre las muestras y variables las medidas fueron transformadas a logaritmo (Sokal y Rohlf, 1981). Para evaluar la variabilidad en la morfología de la concha entre sitios se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Para determinar si los individuos pueden ser correctamente asignados a cada una de las localidades se realizó un análisis discriminante lineal (LDA), el cual maximiza la discriminación entre los grupos usando combinaciones lineales de variables. Para este análisis se consideraron las cinco primeras componentes principales como datos de

entrada. Cada uno de los análisis fue realizado en el programa Statistica v 6.0 (Statsoft, 2004).

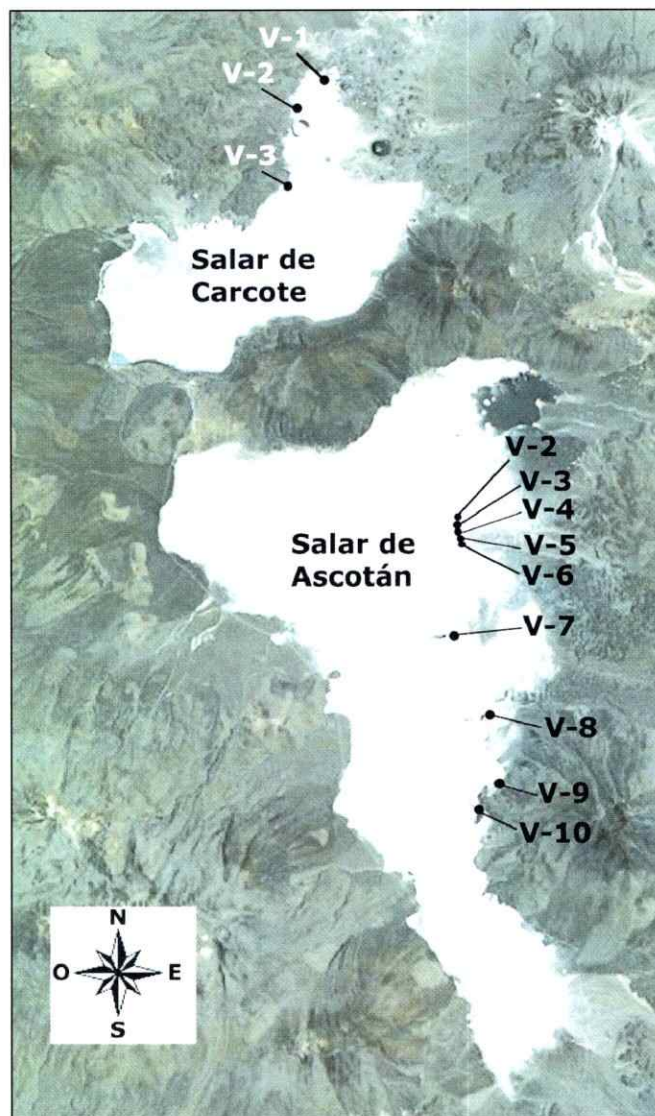


Figura 4.1. Localidades de muestreo en el Salar de Carcote y Salar de Ascotán.

(V= vertiente).

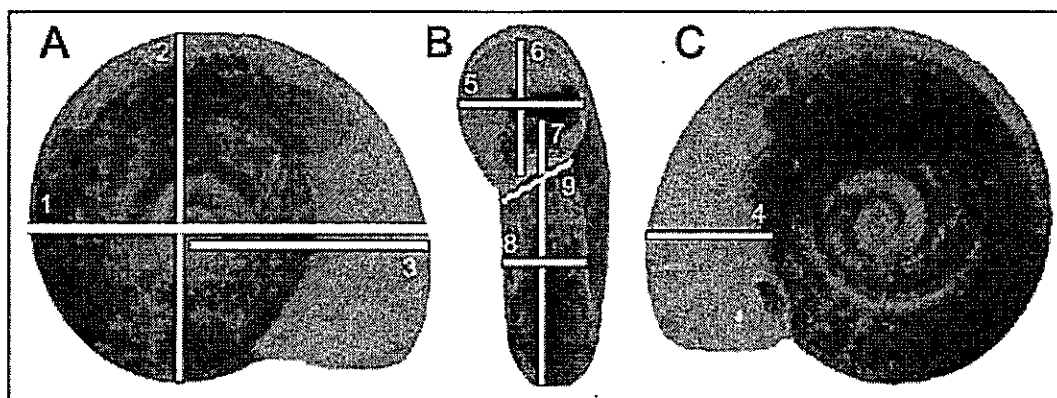


Figura 4.2. Imagen de la morfología externa de la concha de *Biomphalaria* (A: lado derecho, B: lado ventral, C: lado izquierdo) mostrando las nueve variables lineales medidas en el presente estudio: 1. Longitud de la concha, 2. Alto de la concha, 3. Longitud umbo extremo anterior, 4. Longitud anterior de la última vuelta, 5. Ancho del peristoma, 6. Alto del peristoma, 7. Longitud ventral de la concha, 8. Ancho ventral de la concha, 9. Longitud del callo peristomal.

Análisis molecular

El DNA genómico fue extraído de 77 caracoles, correspondientes a un subset de ejemplares utilizados en el análisis morfológico, mediante el método de extracción CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) (Winnepenickx et al., 1993). Las secuencias COI fueron amplificadas mediante PCR en ambos sentidos utilizando los partidores HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') y LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') desarrollados por Folmer et al. (1994). Las condiciones para el PCR fueron las siguientes: 2 min a 94 °C, 35 ciclos a 94 °C por 30 s, 40 °C por 30 s y 75 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos amplificados fueron secuenciados a través de la empresa Macrogen. Para la edición de las secuencias se utilizó el programa BioEdit (Hall, 1999). Las secuencias obtenidas en el presente estudio fueron alineadas junto a ocho secuencias de caracoles

de las vertientes 2 y 6 del Salar de Ascotán, siete de la vertiente 1 del Salar de Carcote y tres de *B. peregrina* correspondientes al grupo externo que fueron secuenciadas previamente (Collado et al., 2010) (Tabla 4.1). Para el análisis filogenético se utilizaron los métodos de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB). El análisis de MP fue realizado en el programa PAUP*4.0 (Swofford, 2000) implementando una búsqueda heurística con el algoritmo de branch swapping TBR (tree bisection and reconnection) y adición al azar de secuencias. Los caracteres fueron considerados como desordenados y tratados con igual peso. El soporte de los nodos fue evaluado usando el método de bootstrap (Felsenstein, 1985) con 1000 pseudoréplicas. Para el análisis ML se seleccionó el mejor modelo de evolución de secuencias mediante el Akaike Information Criterion (AIC) utilizando el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). El análisis bayesiano fue realizado en el programa MrBayes 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) utilizando el mejor modelo de evolución de secuencias seleccionado bajo el Bayesian Information Criterion (BIC) obtenido en jModelTest. La constitución nucleotídica y el porcentaje de divergencia entre grupos de secuencias provenientes de los diferentes sitios de muestreo fue estimada utilizando el programa MEGA 4.0 (Kumar et al., 2004). Las relaciones entre los haplotipos fueron visualizadas mediante un median joining network implementado en el programa Network. Los índices de diversidad (S: número de sitios polimórficos, K: número de haplotipos, H: diversidad de haplotipos y π : diversidad nucleotídica) fueron estimados en el programa DnaSP 4.0. Para estimar desviaciones del modelo de neutralidad selectiva se calcularon valores de significancia realizando las pruebas de Tajima (D) y Fu y Li (D).

Tabla 4.1. Localidades de muestreo, números de acceso GenBank y número de ejemplares utilizados en el presente estudio.

Salar/sitio	Latitud/longitud	N° GenBank	n	
			Morfología	Secuencias
<i>Salar de Carcote</i>				
Carcote v1	21°16'04"/68°19'21"		32	16
Carcote v2	21°17'49"/68°20'08"		25	13
Carcote v3	21°16'59"/68°20'28"		26	17
<i>Salar de Ascotán</i>				
Ascotán v2	21°29'07"/68°15'21"		20	5
Ascotán v3	21°29'28"/68°15'27"		20	3
Ascotán v4	21°29'39"/68°15'26"		20	3
Ascotán v5	21°29'47"/68°15'26"		20	5
Ascotán v6	21°29'53"/68°15'26"		20	3
Ascotán v7	21°32'03"/68°15'43"		20	6
Ascotán v8	21°33'58"/68°14'39"		20	8
Ascotán v9	21°35'47"/68°14'27"		20	7
Ascotán v10	21°36'32"/68°15'10"		20	6
Grupo externo				
<i>B.peregrina</i>	La Plata, Argentina			3
Total			263	95

Resultados

Análisis filogenético y variación genética

La amplificación del gen COI produjo un fragmento de 663 nucleótidos en los caracoles del Salar de Ascotán y Salar de Carcote, resultando en la longitud final del alineamiento. La composición nucleotídica considerando las 95 secuencias utilizadas en este estudio fue 26.5% A, 13.3% C, 17.5% G y 42.7% T. El número de caracteres informativos para parsimonia fue 30. El análisis MP entregó un árbol con una longitud mínima de 34 pasos (índice de consistencia= 0.94; índice de retención= 0.99) que se muestra en la Figura 4.3. Dos clados fueron recuperados, uno mayor que incluye las secuencias de las nueve vertientes del Salar de Ascotán y las secuencias de las vertientes 2 y 3 del Salar de Carcote, y otro menor consistiendo exclusivamente de las secuencias

de la vertiente 1 (norte) del Salar de Carcote. El análisis bootstrap apoya la separación de ambos clados con un valor de soporte de 100%, mientras que cada clado fue apoyado por un 97% y 100%, respectivamente. Al interior del clado mayor las secuencias de las vertientes 9 y 10 del Salar de Ascotán formaron un subclado respaldado por un 98% de bootstrap, correspondiente a un haplotipo único. El análisis ML recuperó la misma topología que la obtenida bajo MP y en la IB sólo varió la posición de una secuencia al interior de uno de los clados (árboles no mostrados). En este último caso, las agrupaciones fueron respaldadas por una probabilidad posterior de 1.00. La variación nucleotídica entre las secuencias de ejemplares dentro de las localidades fue mínima y en varios casos no se detectó variación. Un ejemplo de esto último lo constituyen las secuencias de caracoles de las vertientes 2, 3, 4, 6, 7, 9 y 10 del Salar de Ascotán y de las vertientes 2 y 3 del Salar de Carcote. Las secuencias de las vertientes 5 y 8 del Salar de Ascotán y de la vertiente 1 del Salar de Carcote tuvieron un 0.1% de variación. La divergencia entre caracoles de la vertiente 1 del Salar de Carcote y el resto de las vertientes fue estimada entre 2.5 y 3.2% (Tabla 4.2).

Red de haplotipos

Los índices de diversidad COI asociados a las cuencas de Ascotán y Carcote fueron $k=7$, $S=22$, $H=0.45$ y $\pi=0,0061$. El despliegue de los haplotipos recuperó dos grupos independientes separados por cerca de 15 pasos mutacionales, uno correspondiente a la vertiente 1 del Salar de Carcote y otro que incluye las secuencias de todos los caracoles muestreados en el Salar de Ascotán y en las vertientes 2 y 3 del Salar de Carcote (Fig. 4.4). Estos haplogrupos son concordantes con los dos clados inferidos en los árboles filogenéticos obtenidos con los tres métodos utilizados para

construir filogenias. Considerando estos resultados, cada haplogrupo fue analizado separadamente. Para los haplotipos del clado 1 los índices de diversidad fueron $k=5$, $S=8$, $H=0.352$ y $\pi=0,00229$ y para el clado 2 $k=2$, $S=1$, $H=0.46$ y $\pi=0,00069$. Las pruebas D de Tajima y F de Fu y Li no rechazaron la hipótesis de neutralidad selectiva en las poblaciones del clado 1 ($D= -0.181$, $P > 0.10$; $F= -0.88760$, $P > 0.10$) ni en el clado 2 ($D= 1,0344$, $P > 0.10$; $F=0,885$, $P > 0.10$). Un haplotipo exclusivo de los caracoles muestreados en las vertientes 9 y 10 del Salar de Ascotán estuvo relacionado al primer grupo, confirmando los resultados del análisis filogenético. No se encontró ningún otro haplotipo en estas dos últimas localidades.

Tabla 4.2. Porcentajes de divergencia entre grupos de secuencias COI provenientes de los diferentes sitios de muestreo ("v" significa vertiente) utilizando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980).

Sitio	Cv1	Cv2	Cv3	Av2	Av3	Av4	Av5	Av6	Av7	Av8	Av9
Carcote v1											
Carcote v2	2.6										
Carcote v3	2.6	0.0									
Ascotán v2	2.6	0.0	0.0								
Ascotán v3	2.6	0.0	0.0	0.0							
Ascotán v4	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0						
Ascotán v5	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0					
Ascotán v6	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				
Ascotán v7	2.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
Ascotán v8	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0		
Ascotán v9	3.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	
Ascotán v10	3.2	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.0

Morfología

En el PCA el primer componente principal fue altamente correlacionado con el longitud de la concha y explicó el 93.4% de la varianza total mientras el segundo componente fue altamente correlacionado con el alto de la apertura de la concha y explicó el 1.9% de la varianza. De esta manera, los primeros dos ejes ortogonales explicaron el 95.4% de la variación en la morfología de la concha entre los sitios, con el primer eje capturando la mayor parte de la variación. El análisis de componentes principales (fig. 4.5) muestra que en el espacio multivariado hay una separación completa de las poblaciones de las vertientes 1 y 3 del Salar de Carcote y cierta sobreposición entre las vertientes 1 y 2. Para el Salar de Ascotán el análisis muestra una considerable sobreposición entre las vertientes, pero se separan de las del Salar de Carcote. El LDA mostró una capacidad de discriminación significativa (Wilk's $\lambda = 0.019$; $P < 0.0001$) y reveló que entre el 35.0 y 84.0% de los individuos fueron correctamente clasificados en las localidades, con un promedio de 68.1% (Tabla 4.3). Este análisis asignó correctamente los ejemplares de *B. costata* a la vertiente 1 del Salar de Carcote el 78.1% de las veces.

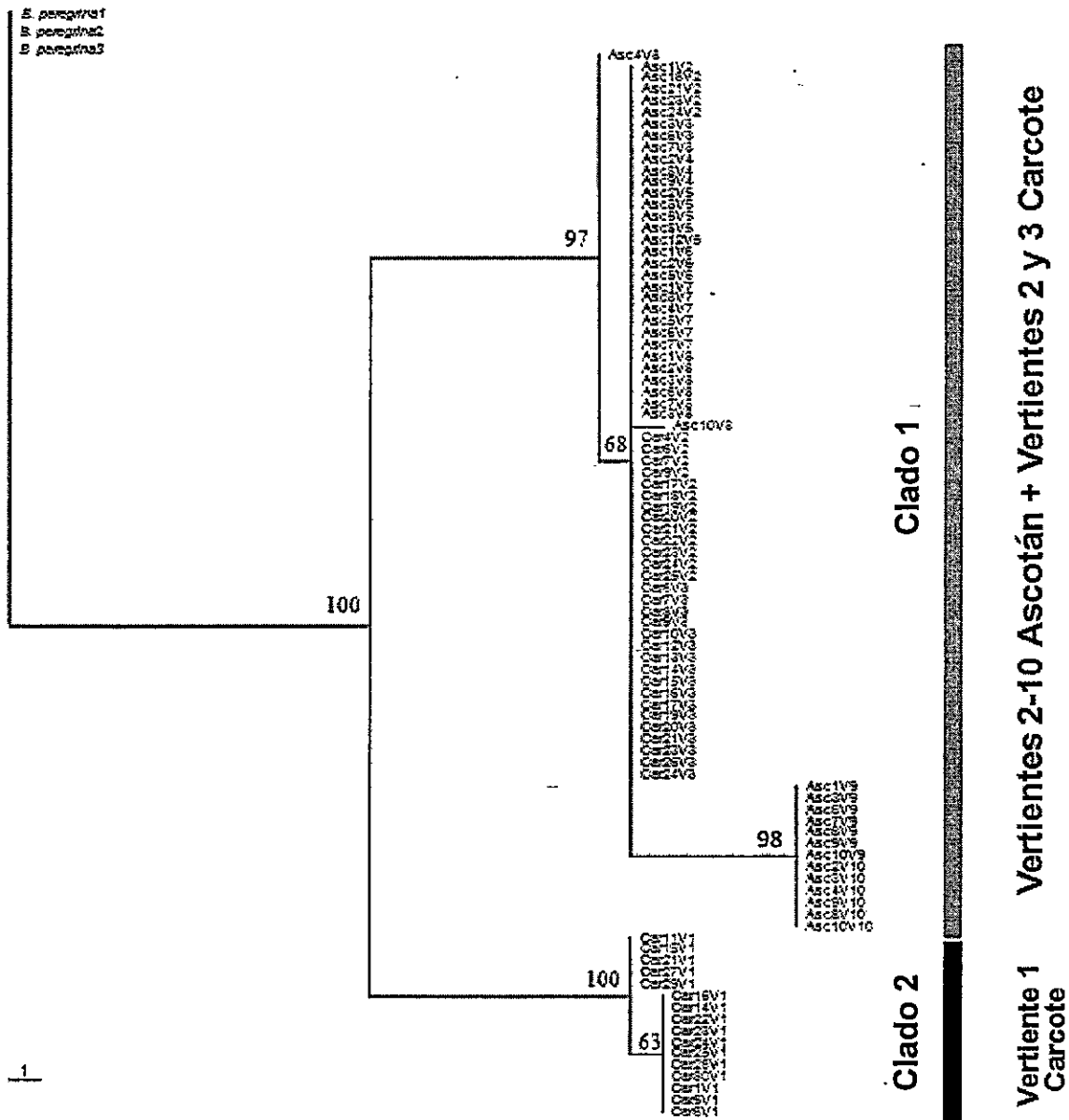


Figura 4.3. Arbol obtenido del análisis de máxima parsimonia utilizando secuencias de mtDNA COI. Los números en los nodos indican los valores de soporte bootstrap.

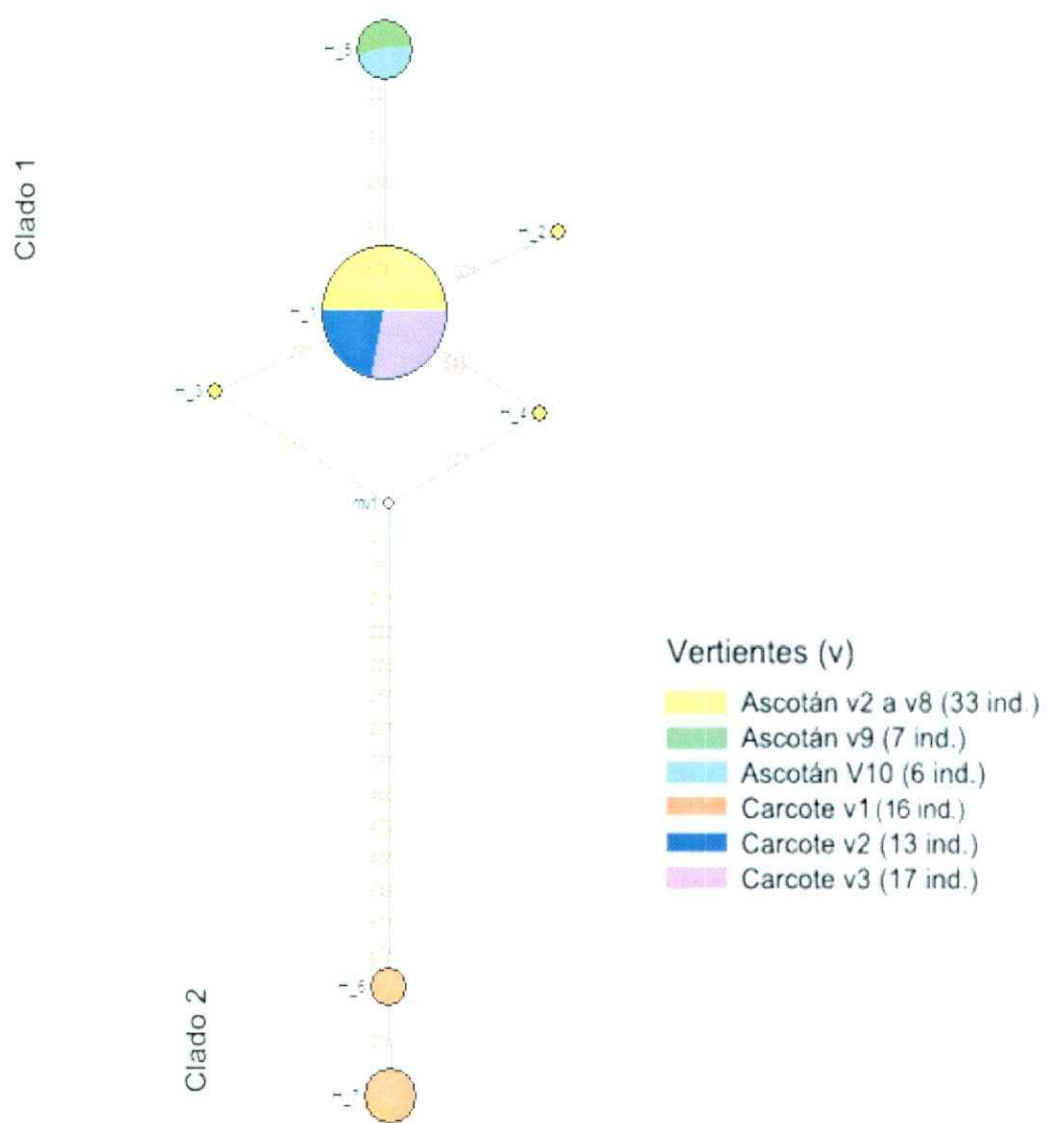


Figura 4.4. Red de haplotipos COI obtenidos de caracoles muestreados en el Salar de Carcote y Salar de Ascotán. Se muestran los clados obtenidos mediante el análisis filogenético.

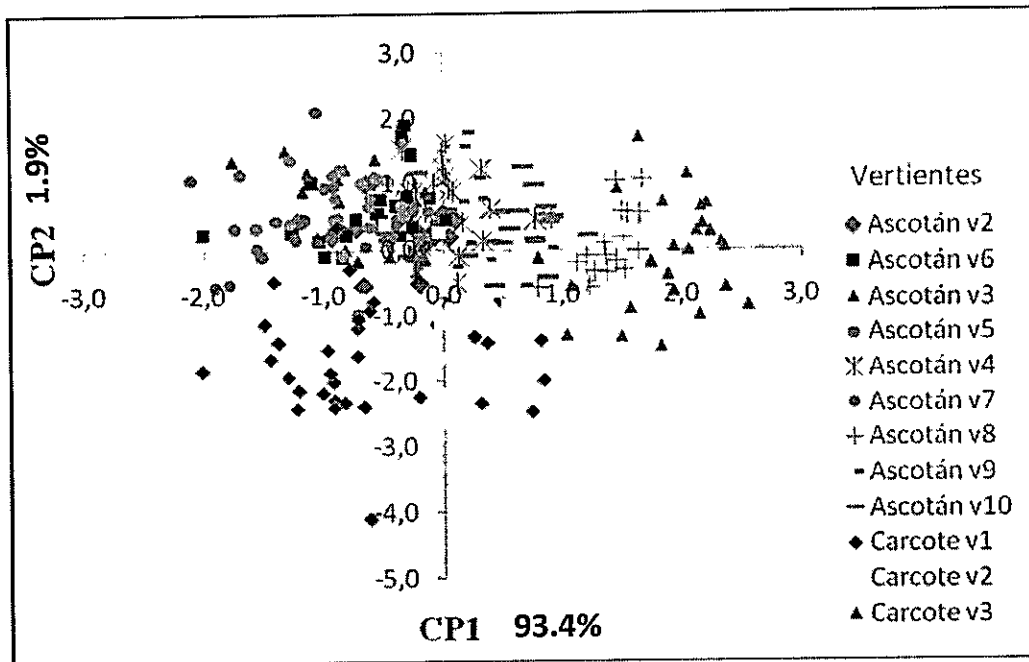


Figura 4.5. Representación gráfica de las medidas de la concha de ejemplares de *Biomphalaria* obtenidas de poblaciones del Salar de Carcote y Salar de Ascotán en función de las dos primeras componentes principales.

Tabla 4.3. Matriz de clasificación obtenida del LDA de las frecuencias de los casos asignados a las vertientes (v) del Salar de Carcote (C) y Salar de Ascotán (A). Filas: clasificaciones observadas; columnas: clasificaciones predichas. P= porcentaje de clasificación correcta.

Localidad	Av2	Av3	Av4	Av5	Av6	Av7	Av8	Av9	Av10	Cv1	Cv2	Cv3	P
Ascotán v2	7	2	3	2	4	0	0	1	0	0	1	0	35.0
Ascotán v3	1	10	1	5	2	1	0	0	0	0	0	0	50.0
Ascotán v4	1	2	14	0	1	0	1	0	1	0	0	0	70.0
Ascotán v5	0	3	0	13	2	1	0	0	0	0	1	0	65.0
Ascotán v6	2	6	2	2	6	2	0	0	0	0	0	0	30.0
Ascotán v7	2	0	1	1	1	15	0	0	0	0	0	0	75.0
Ascotán v8	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	0	4	80.0
Ascotán v9	3	0	0	0	0	0	0	15	2	0	0	0	75.0
Ascotán v10	0	0	3	0	0	0	0	1	16	0	0	0	80.0
Carcote v1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	25	6	0	78.1
Carcote v2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	21	0	84.0
Carcote v3	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	1	21	80.8
Total	17	24	24	23	16	19	21	17	20	27	30	25	68.1

Discusión

En el presente estudio se examinó la variación morfológica y genética entre poblaciones de caracoles restringidas a las cuencas de Ascotán y Carcote, ubicadas en el Altiplano Sur andino. Independiente del método usado para construir filogenias, los caracoles muestreados en la vertiente 1 del Salar de Carcote conformaron un grupo monofilético separado de los caracoles de las vertientes 2 y 3 de este mismo salar, cuyas secuencias se agruparon en un clado mayor junto a las secuencias de las vertientes del Salar de Ascotán. Los porcentajes de divergencia genética utilizando el gen COI estimados entre estos grupos (2.5-3.2%) caen dentro del rango estimado para delimitar especies de *Biomphalaria* (Jorgensen et al., 2007; Collado et al., 2010) y otros gastrópodos de agua dulce (Hershler et al., 1999, 2003; Liu et al., 2003; Bichain et al., 2007). Por otro lado, los caracoles de las vertientes 2 a 8 del Salar de Ascotán presentaron el haplotipo más común, el cual fue compartido por los caracoles de las vertientes 2 y 3 del Salar de Carcote. Concordante con esto, la red de haplotipos muestra dos grupos claramente diferenciados cuyo porcentaje de divergencia es 2.7% (K2P). De esta manera, las filogenias obtenidas, la red de haplotipos y los porcentajes de divergencia genética sugieren que en estos salares existen dos linajes evolutivos distintos, uno confinado a la vertiente 1 del Salar de Carcote, localidad tipo de *B. costata* (vea Biese, 1951), y otro que abarca todas las vertientes del Salar de Ascotán más las vertientes 2 y 3 del Salar de Carcote, adjudicadas a *B. thermalis*, especie cuya localidad tipo corresponde a la “vertiente Sur del Salar de Ascotán” (vea Biese, 1951). Estos resultados tienen implicancias biogeográficas más profundas que análisis filogenéticos previos que identificaron dos linajes distintos con muestras puntuales realizadas en ambos salares (Collado y Méndez, 2010; Collado et al., 2010), ya que se infiere una distribución

geográfica amplia en *B. thermalis*, con poblaciones diseminadas en ambos salares, mientras *B. costata* queda restringida a sólo una vertiente del Salar de Carcote. La estructura filogenética también sugiere que ambas taxa estarían aislados desde el punto de vista reproductivo, aunque experimentos de fertilización y estudios de historia de vida son necesarios para evaluar más profundamente esta hipótesis.

Aunque la morfología de la concha ha sido cuestionada en el reconocimiento de especies de *Biomphalaria* (Parensse, 1975, 1988; Caldeira et al., 1998; Vidigal et al., 1998, 2001; Estrada et al., 2006), en el presente estudio el análisis multivariado de la morfometría de la concha permitió separar *B. thermalis* de *B. costata*, considerando que los caracoles de las vertientes 2 y 3 del Salar de Carcote, genéticamente asignados a *B. thermalis*, fueron separados por el PCA. Por otro lado, los caracoles de las vertientes 9 y 10 del Salar de Ascotán también fueron separados en el espacio multivariado, sugiriendo cierta estructuración en la morfología de la concha, concordando con los datos genéticos. Sin embargo, los caracoles de las vertientes 2 a 8 de este mismo salar mostraron una considerable sobreposición en el espacio multivariado y genéticamente no fueron diferenciados, sugiriendo mezcla de las poblaciones o la existencia de una componente ambiental asociada al fenotipo.

El análisis molecular indica que *B. costata* y *B. thermalis* presentaron una baja diversidad genética. En relación a *B. costata*, que presentó dos haplotipos, sugiere que estarían fijados en la población. La baja diversidad en esta especie podría explicarse por haber pasado por un cuello de botella o mezcla de las poblaciones en posibles períodos de inundaciones. En *B. thermalis* la diversidad fue mayor. En esta especie 60 individuos presentaron el haplotipo más común, el cual fue detectado en vertientes de ambos salares; tres individuos presentaron haplotipos únicos, mientras otros 13 individuos

presentaron un haplotipo restringido exclusivamente a las vertientes 9 y 10 del Salar de Ascotán.

Los análisis morfométrico y genético realizados en el presente estudio permiten el reconocimiento de dos especies diferentes en el Salar de Ascotán y Salar de Carcote, *B. thermalis* y *B. costata*, aunque con patrones de distribución discordantes entre ambos taxa. Aunque fue revelada alguna sobreposición en las características morfométricas de los caracoles de las vertientes 1, 2 y 3 del Salar de Carcote, el análisis discriminante asignó correctamente los caracoles de estos sitios a las especies en un porcentaje superior al 78 %.

Patrones biogeográficos

Se ha estimado que los distintos linajes del complejo de especies altiplánicas de *Biomphalaria* divergieron promovidos principalmente por procesos vicariantes ocurridos durante el Pleistoceno Medio (Collado et al., 2010), concordando con tiempos de divergencia estimados entre poblaciones altiplánicas codistribuidas de *Orestias* del “complejo *agassizii*” (Lüssén et al., 2003). La actual distribución de estos peces en la región ha sido hipotetizada también como una consecuencia de eventos vicariantes ocurridos en el Pleistoceno una vez que los paleolagos Ballivian y Minchin se contrajeron (Lüssén et al., 2003; Vila, 2006). Esto habría ocurrido después de que poblaciones ancestrales de peces fueron fraccionadas cuando el clima seco afectó extensos paleolagos que comunicaron diferentes cuencas altiplánicas durante el Plioceno y Pleistoceno, incluyendo las cuencas de Carcote y Ascotán (Servant y Fontes, 1978; Clapperton, 1993; Fornari et al., 2001; Fritz et al., 2004; Placzek et al., 2006). Una de las interpretaciones posibles para explicar la presencia de *B. thermalis* en vertientes del Salar de Carcote es mediante colonización post especiación.

Considerando que el salar de Ascotán está ubicado a una mayor altura que el Salar de Carcote, la colonización pudo ser promovida por dispersión pasiva mediante deriva en aguas superficiales durante inundaciones o comunicaciones subterráneas entre ambos salares. Conexiones hídricas subterráneas entre distintos sistemas acuáticos han sido informadas en el Altiplano Sur. Dispersión mediada por aves, fenómeno documentado en gastrópodos (Rees, 1965; Malone, 1965; Wesselingh et al., 1999), constituye otra probable explicación. Cualquiera sea la causa, los haplotipos codistribuidos en ambos salares sugieren que la dispersión entre salares es un proceso biogeográfico común en *B. thermalis*. Esto indica que muestreos más inclusivos de un taxón pueden revelar patrones biogeográficos más complejos que los previamente hipotetizados en la región (Lüssen et al., 2003; Vila, 2006; Collado et al., 2010). Patrones similares de distribución geográfica de las especies de *Biomphalaria* reportadas en el presente estudio en los salares de Ascotán y Carcote se ha recientemente informado para especies de *Orestias* en estos mismos sistemas (Morales, 2009; Scott, 2010). En un análisis filogenético utilizando secuencias mitocondriales de la región control de estos ciprinodontes, Morales (2009) recuperó dos grandes clados, uno correspondiente a *O. ascotanensis* del Salar de Ascotán y *O. sp.* del Salar de Carcote, cuyos tiempos de divergencia fueron estimados en 280.000 años. Al interior de cada salar se encontraron grupos de haplotipos separados correspondientes a vertientes o grupos de vertientes. En el salar de Ascotán las vertientes 1 y 11 están diferenciadas entre sí y del resto de las vertientes. En Carcote se recuperaron dos grupos: uno que incluye exclusivamente haplotipos de la vertiente 1, y otro que incluye un haplotipo presente en las 3 vertientes, el cual se encuentra fijado en la vertiente 2 mientras que en las vertientes 1 y 3 se presente en baja frecuencia (2009).

El presente estudio revela que *B. thermali* es una especie cuya distribución geográfica abarca localidades distribuidas en ambos salares mientras *B. costata* estaría restringida a una única vertiente aislada del Salar de Carcote por lo que habrían dos linajes alopátricos en estas cuencas endorreicas. Este descubrimiento tiene profundas consecuencias en relación a la biodiversidad existente en esta área geográfica geológicamente dinámica y de ambientes frágiles potencialmente perturbables por actividades económicas mineras y de extracción de aguas ya que bajo las limitadas condiciones de confinamiento, *B. costata* es prioritaria para la conservación.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Sergio Letelier, curator del Museo Nacional de Historia Natural de Santiago, Chile, por su colaboración durante el desarrollo de este estudio. Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto MULT 05/04-2 y Domeyko: Biodiversidad Iniciativa Transversal 1 de la Universidad de Chile; FONDECYT 1061256 y 1080390. G. Collado agradece a CONICYT.

Literatura citada

- Bandelt H-J, Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16, 37-48.
- Biese, W.A. (1951). Revisión de los moluscos terrestres y de agua dulce provistos de concha de Chile. Parte 4: Planorbidae. *Boletín Museo de Historia Natural, Chile*, 25, 115-137.
- Campbell, G., Jones, C.S., Lockyer, A.E., Hughes, S., Brown, D.L., Noble, R., & Rollinson, D. (2000). Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267, 2351–2358.
- Carrapa, B., Strecker, M.R. & Sobel, E. (2006). Sedimentary, tectonic and thermochronologic evolution of the southernmost end of the Puna Plateau (NW Argentina). *Earth Planet. Sci. Lett.* 247:82–100.
- Charrier, R. (1997). Ciencias de la tierra y recursos mineros y energéticos en el Altiplano Chileno. In: González C (ed) *El Altiplano: Ciencia y Conciencia en los Andes*: 5-14. Universidad de Chile, Santiago.
- Chong, G. (1988). The Cenozoic saline deposits of the Chilean Andes between 18°00' and 27°00' south latitude, Vol. 17, p. 137–151. In: *The Southern Andes. Lecture Notes in Earth Sciences*. H. Bahlburg, Ch. Breitkreuz, and P. Geise (eds.). Springer Verlag, Berlin.
- Clapperton, C. (1993). Quaternary paleolakes of the arid regions of South America. In: *Quaternary geology and geomorphology of South America*. Elsevier, pp 489.

- Collado, G. A. & Méndez, M.A. (2010). Relaciones filogenéticas en *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae): reposicionamiento de taxa e identificación de un nuevo clado al interior del género. Capítulo 2 de esta tesis.
- Collado, G., Vila, I. & Méndez, M.A. (2010). Monophyly, candidate species and vicariance in populations of freshwater snails of the genus *Biomphalaria* Preston, 1910 (Mollusca: Planorbidae) from the southern altiplano. Capítulo 3 de esta tesis.
- DeJong, R.J., Morgan, J.A.T., Paraense, L., Pointier, J.-P., Amarista, M., Ayeh-Kumi, P.F.K., Babiker, A., Barbosa, C.S., Br_emon, P., Canese, A.P., de Souza, C.P., Dominguez, C., File, S., Gutierrez, A., Incani, R.N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N.J.S., Mimpfoundi, R., Njiokou, F., Poda, J.N., Sene, M., Vel_asquez, L.E., Yong, M., Adema, C.M., Hofkin, B.V., Mkoji, G.M. & Loker, E.S. (2001). Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke *Schistosoma mansoni*. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 2225–2239.
- DeJong, R.J., Emery, A.M. & Adema, C.M. (2004). The mitochondrial genome of *B. glabrata* (Gastropoda: Basommatophora), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*, 90, 991-997.
- Dorador, C., Pardo, R. & Vila, I. (2003). Variaciones temporales de parámetros físicos, químicos y biológicos de un lago de altura: el caso del lago Chungará. *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 76, 15–22.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007). "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees". *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.

- Estrada, V.E., Velásquez, L.E., Caldeira, R.L., Bejarano, E.E., Rojas, W. & Carvalho, O.S. (2006). Phylogenetics of South American *Biomphalaria* and description of a new species (Gastropoda: Planorbidae). *Journal of Molluscan Studies*, 72, 221-228.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & 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.
- Fornari, M., Risacher, F. & Féraud, G. (2001) Dating of paleolakes in the central Altiplano of Bolivia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 172, 269-282.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT, Version 5.0.9, 2001. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hurlbert, S. & Chang, C. 1984. Ancient ice islands in salt lakes of the Central Andes. *Science*, vol. 224.
- Jørgensen A., Kristensen, T.K. & Stothard, J.R. (2007). Phylogeny and biogeography of African *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae), with emphasis on endemic species of the great East African lakes. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 151, 337-349.

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5, 150–163.
- Lüssen A., Falk, T.M. & Villwock, W. (2003). Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 151-160.
- Malek, E.A. (1985). *Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual*. Pan American Health Organization Scientific Publication No. 478. PAHO, Washington.
- Malone, C.R. (1965). Killdeer (*Charadrius-vociferus* Linneaus) as a means of dispersal for aquatic gastropods. *Ecology*, 46, 551–552.
- Morales, P.M. (2009). Diferenciación genética y conectividad en ambientes fragmentados: el caso de *Orestias* (Teleostei; Cyprinodontidae) de los salares de Ascotan y Carcote en el Altiplano chileno. *Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva*. Universidad de Chile. 75 pp. Santiago, Chile.
- Morrone, J.J. (2004). La zona de transición sudamericana: caracterización y relevancia evolutiva. *Acta Entomológica Chilena*, 28, 41-50.
- Paraense, W.L. (1966). The synonymy and distribution of "*Biomphalaria peregrina*" in the Neotropical region. *Revista Brasileira de Biologia*, 26, 269–296.

- Parenti, L. (1984). A taxonomic revision of the Andean killifish genus *Orestias* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae). *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 178, 107-214.
- Placzek, C., Quade, J. & Patchett, P. (2006). Geochronology and stratigraphy of late Pleistocene lake cycles on the southern Bolivian Altiplano: Implications for causes of tropical climate change. *The Geological Society of America Bulletin*, 118, 515-532
- Pinto, M. & Vila, I. (1986). Relaciones tróficas del género *Orestias* en el sistema hidrográfico Lauca. *An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso* 18, 77-84.
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25(7): 1253-1256.
- Remigio, E.A. & Herbert, P.D.N. (2003). Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropods relationships. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 641-647.
- Rees, W.J. (1965). The aerial dispersal of mollusca. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 36, 269-282.
- Risacher, F., Alonso, H. & Salazar, C. (2003). The origin of brines and salts in Chilean salars: a hydrochemical review. *Earth-Science Reviews*, 63, 249-293
- Ronquist, F. y J.P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Scott, S.A. (2010). Sistemática y filogenia de *Orestias* del complejo *agassizii* (Teleosteis: Cyprinodontidae) de la Puna. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Universidad de Chile. 82 pp. Santiago, Chile.

- Servant, M. and Fontes, J.C. (1978). Les laces quaternaires des hauts plateaux des Andes boliviennes. Premières interprétations paléoclimatiques. *Cahiers, ORSTOM, Géologie* 10, (1) 9-23. Paris.
- Sielfeld, W. (2001). Phylum Mollusca. Guías de Identificación y Biodiversidad Fauna Chilena. *Apuntes de Zoología* (pp. 1-15). Universidad Arturo Prat, Iquique. Chile.
- Strecker, M.R., Alonso, R.N., Bookhagen, B., Carrapa, B., Hilley, G.E., Sobel, E.R. & Trauth, M.H. (2007). Tectonics and Climate of the Southern Central Andes. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.*, 35, 747-87.
- Swofford, D.L. (2003). PAUP*: *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Ver. 4. [Computer software and manual]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25, 4876-4882.
- Valdovinos, C. & Stuardo, J. (1991). Planorbidos altoandinos del norte de Chile y *Biomphalaria aymara* spec. nov. (Mollusca: Basommatophora). *Studies on Neotropical fauna and Environment*, 26, 213-224.
- Valdovinos, C. (1999). Biodiversidad de moluscos chilenos: Base de datos taxonómica y distribucional. *Gayana Zoología*, 63, 111-164.
- Valdovinos, C. (2006). Estado de conocimiento de los gastrópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana Zoología*, 70, 88-95.
- Vidigal, T.H.D.A., Spatz, L., Nunes, N.D., Simpson, A.J.G., Carvalho, O.S. & Dias Neto, E. (1998). *Biomphalaria* spp: Identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction

- enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Experimental Parasitology*, 89, 180-187.
- Vila, I. (2006). A New Species of Killifish in the Genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the Southern High Andes, Chile. *Copeia* 3, 472-477.
- Wesselingh, F.P., Cadée, G.C. & Renema, W. (1999). Flying high: on the airborne dispersal of aquatic organisms as illustrated by the distribution histories of the gastropod genera *Tryonia* and *Planorbarius*. *Geologie En Mijnbouw*, 78, 165-174.
- Villwock, W., Sienknecht, U. & Lüssen, A., (2000). Taxonomic considerations on the genus *Orestias* Valenciennes, 1839 (Teleostei: Cyprinodontidae) of the Chilean Altiplano. In: Rheinwald, G. (Ed.), *Isolated Vertebrate Communities in the Tropics*, 46. Bonn. zool. Monogr., Germany, pp. 55-67.
- Winnepennickx, B., Backeljau, T. & De Wachter, R. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9, 407.
- Wörner, G., Hammerschmidt, K., Henjes-Kunst, F., Lezaun, J. & Wilke, H. (2000). Geochronology ($^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$, K-Ar and He-exposure ages) of Cenozoic magmatic rocks from Northern Chile (18-22°S): implications for magmatism and tectonic evolution of the central Andes. *Revista Geológica de Chile*, 27, 205-240.

CAPITULO 5

DISCUSION GENERAL

En esta sección primero se entrega un resumen de las hipótesis y de los resultados obtenidos en relación a estos planteamientos para luego discutir los principales hallazgos realizados en esta tesis. Las principales preguntas de este trabajo se responden en la Tabla 5.1.

5.1. Análisis de hipótesis

Hipótesis 1. Las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* constituyen un grupo monofilético y estarían más estrechamente relacionadas con especies neotropicales que africanas del género. De esta hipótesis se esperaba que las especies altiplánicas compartieran un ancestro común con taxa distribuidos en la región neotropical.

Resultados obtenidos en los capítulos 2 y 3 de esta tesis:

- 1) Los análisis filogenéticos separados (16S, ITS1 e ITS2) y combinados (16S+ITS1+ITS2) recuperaron las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* formando un grupo monofilético con un subgrupo de taxa neotropicales con los cuales comparten un ancestro común.
- 2) Las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* no se encuentran estrechamente relacionadas con las especies africanas del grupo, las cuales derivan de un ancestro similar a *B. glabrata*, de amplia distribución en el neotrópico.

Hipótesis 2. La estructura filogenética de las poblaciones de *Biomphalaria* del Altiplano Sur es congruente con la división fisiogeográfica de la región. De esta hipótesis se esperaba que la topología de un árbol filogenético reflejara grupos monofiléticos (linajes) circunscritos a las cuencas hidrográficas donde los caracoles fueron muestreados.

Resultados obtenidos en el capítulo 3 de esta tesis:

1) Las secuencias de mtDNA COI revelaron que las poblaciones de *Biomphalaria* del Altiplano Sur conforman un grupo monofilético cuyo grupo hermano corresponde a la especie neotropical *B. peregrina*. Dentro de este clado fueron recuperados cuatro linajes bien soportados que resultaron en su mayoría congruentes con la procedencia geográfica de los animales, soportando la hipótesis de vicarianza.

Hipótesis 3. Las poblaciones de *Biomphalaria* restringidas a las vertientes del Salar de Carcote y Salar de Ascotán presentan alta estructura poblacional considerando las barreras terrestres que aíslan parcialmente estos sistemas hídricos. De esta hipótesis se esperaba que hubiese divergencia genética y morfológica entre salares y entre vertientes al interior de cada salar.

Resultados obtenidos en el capítulo 4 de esta tesis:

1) La hipótesis de estructuración poblacional fue soportada parcialmente por los datos obtenidos en esta tesis debido a que fue posible observar sólo agrupaciones morfológicas correspondientes a los caracoles de las vertientes del Salar de Carcote y las vertientes 9 y 10 del Salar de Ascotán. En estas dos últimas vertientes los caracoles compartieron un único haplotipo.

5.2. Relaciones filogenéticas en *Biomphalaria*

Uno de los hallazgos más importantes del presente estudio es que el género *Biomphalaria* consiste de dos grandes clados. En el árbol de evidencia total, en el cual se combinaron las secuencias ITS1, ITS2 y 16S, fue altamente soportada la monofilia de *B. peregrina*, *B. oligoza* y las poblaciones altiplánicas (100%), y de un clado conformado por el resto de las especies neotropicales y africanas de *Biomphalaria* (70%). La divergencia entre estos dos clados fue trazada hasta fines del Mioceno, de acuerdo a estimaciones hechas a través de un reloj molecular 16S.

En el clado *B. peregrina*/*B. oligoza*/taxa altiplánicos la escasa resolución interna utilizando estas secuencias no permitió establecer relaciones de grupos hermanos entre los taxa. Sin embargo, las distancias genéticas estimadas utilizando las secuencias ITS2 sugieren que el grupo hermano de las poblaciones altiplánicas podría corresponder a *B. peregrina* considerando que la similitud es mayor entre este taxón y las poblaciones altiplánicas que entre estas y *B. oligoza*. En un análisis posterior utilizando un gen de evolución más rápida como el citocromo c oxidasa subunidad 1 pudo determinarse que *B. peregrina* es una especie estrechamente relacionada a las poblaciones altiplánicas constituyendo la mejor hipótesis como grupo hermano para este grupo.

Las relaciones de grupos hermanos inferidas en el presente estudio entre la especie neotropical *B. glabrata* y las especies africanas de *Biomphalaria* fueron congruentes con hallazgos realizados en análisis filogenéticos previos (Bandoni et al., 1995; Campbell et al., 2000; DeJong et al., 2001). Una de las hipótesis planteadas para explicar el origen de las especies africanas es un evento de dispersión transatlántica mediante rafting sobre vegetales o transporte aéreo por aves de un ancestro similar a *B. glabrata*, lo que habría sido favorecido por la capacidad de autofecundación de estos

gasterópodos. El análisis filogenético molecular revela, de esta manera, que *Biomphalaria* es un grupo parafilético.

La inferencia realizada en el presente estudio respecto a que *B. schrammi* no pertenece al género *Biomphalaria* es consistente con análisis filogenéticos previos realizados en este grupo (Vidigal et al., 2000; DeJong et al., 2001), pero entra en conflicto con una hipótesis filogenética construida con secuencias del exón 2 de actina y del gen 28S de RNA nuclear ribosomal, el cual recuperó a esta especie al interior de un grupo restringido de especies del género (Morgan et al., 2002). Sin embargo, considerando el muestreo más inclusivo realizado en esta tesis y que todos los análisis filogenéticos realizados con las secuencias ITS1, ITS2 y 16S excluyeron a *B. schrammi* del grupo, esta especie podría alternativamente servir como grupo externo para futuros análisis filogenéticos en *Biomphalaria*, soportando apreciaciones previas (DeJong et al., 2001; Morgan et al., 2002).

El mayor muestreo realizado en el presente estudio permitió establecer una filogenia lo suficientemente robusta como para proponer un nuevo escenario evolutivo del género *Biomphalaria*. Sin embargo, aún resta por clarificar el origen del grupo. Además, en el presente estudio se incluyeron muestras de caracoles *Biomphalaria* de una región particular del Altiplano, correspondiente al área suroccidental de esta planicie altoandina por lo que un muestreo más extensivo, que abarque las zonas altiplánicas de los países vecinos, incluyendo la cuenca del lago Titicaca, podría revelar nuevos patrones biogeográficos y relaciones de grupos hermanos desconocidos hasta ahora.

5.3. Modelo biogeográfico de los taxa del Altiplano Sur

Las hipótesis filogenéticas construidas utilizando secuencias de DNA permiten postular un escenario biogeográfico que permite explicar en parte la actual distribución geográfica del complejo de especies de *Biomphalaria* del Altiplano Sur. Las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* divergieron de un ancestro similar a *B. peregrina* a mediados del Pleistoceno. Este resultado fue obtenido a través de dos estimaciones independientes basadas en el reloj molecular, una con el gen 16S y otra con el gen COI, siendo ambas concordantes. Específicamente, con el gen 16S las poblaciones altiplánicas de *Biomphalaria* divergieron de su grupo hermano hace 0.93 Ma mientras que con el gen COI la divergencia ocurrió entre 1.07 y 0.47 Ma. Esta fecha es posterior al gran alzamiento de los Andes Centrales y sería coincidente con el desarrollo del paleolago Cabana, cuyas dataciones tentativas lo sitúan en el Pleistoceno Medio (Lavenu et al., 1984). Estas estimaciones son congruentes con tiempos de divergencia estimados entre taxa del género *Orestias* distribuidos en la región altiplánica. Por ejemplo, *O. agassizii* del río Isluga habría divergido de *O. ascotanensis*, *O. sp* de Carcote y *O. agassizii* del río Collacahua y Salar de Huasco hace 1.263 Ma (Scott, 2010). Probablemente después de que el Altiplano Sur alcanzó alturas similares a las actuales, el vulcanismo y la sedimentación (aún en ocurrencia), asociados a efectos climáticos que afectaron los sistemas hidrológicos de la región y configuraron la actual fisonomía del paisaje, la división geomorfológica del Altiplano Sur promovió la divergencia de las poblaciones a partir de una población ancestral similar a *B. peregrina*, dando origen al complejo de especies de *Biomphalaria* del Altiplano Sur. El análisis molecular 16S indica que los tiempos de divergencia entre linajes al interior del complejo altiplánico ocurrieron entre 0.46 y 0.04 Ma mientras que

con el gen COI indica un tiempo de divergencia entre 0.95 y 0.26 Ma. Considerando este último gen, *B. thermalis* del Salar de Ascotán habría divergido primero del resto de los linajes entre 0.95 y 0.35 Ma. Esta especie habría extendido posteriormente su distribución al Salar de Carcote. Posterior a este evento se habría separado la región norte del Altiplano Sur correspondiente a la cuenca Caquena, originándose una nueva especie de *Biomphalaria* en este sistema entre 0.83 y 0.31 Ma. Subsecuentemente divergieron los linajes correspondientes a las cuencas de Carcote (vertiente 1) y Lauca, entre 0.69 y 0.26 Ma. Estas estimaciones también son congruentes con tiempos de divergencia inferidos entre linajes altiplánicos de *Orestias* (Lüssen et al., 2003; Scott, 2010) y serían coincidentes con el desarrollo del paleolago Ballivian durante el Pleistoceno Medio (0.7 Ma; Clapperton, 1993; Fornary et al., 2001; Placzek et al., 2006). El análisis molecular 16S indica que *B. aymara*, que con el gen COI se agrupa junto a ejemplares de la vertiente I del Salar de Carcote, divergió de otros linajes altiplánicos 0.04 Ma. Este periodo es coincidente con el desarrollado del paleolago Inca Huasi en el Pleistoceno inferior (Placzek et al., 2006).

5.4. Implicancias taxonómicas

El hallazgo de que el género *Biomphalaria* es parafilético indica que la sistemática del grupo necesita ser revisada para construir una clasificación basada en el contexto filogenético. Revisión sistemática también necesita ser desarrollada en otra parte del árbol, la relacionada con la especie neotropical *B. schrammi*, que probablemente deba ser asignada a un nuevo género u otro previamente establecido. En el presente estudio evaluamos dos hipótesis de sinonimia relacionadas con especies del Altiplano Sur postuladas utilizando caracteres morfológicos, una fuertemente posicionada en la literatura por más de 40 años (Paraense, 1966), y otra por 25 años

(Malek, 1985). En el primer caso, Paraense (1966) sinonimizó la especie de amplia distribución en la región neotropical, *B. peregrina*, con *B. costata* del Salar de Carcote. En ninguno de los análisis realizados, que incluyen secuencias ITS1, ITS2, 16S y COI, las secuencias de los caracoles obtenidos de la localidad tipo de *B. costata* se agruparon con *B. peregrina*, indicando que *B. costata* es una especie válida del género, resucitada en el presente estudio, no soportando la hipótesis de Paraense (1966). En el segundo caso, Malek (1985) sinonimizó *B. thermali* del Salar de Ascotán con *B. andecola* del Titicaca. El único locus posible de ser usado para comparación de los cuatro loci utilizados en el presente estudio fue el locus ITS2, región secuenciada en ambas taxa (DeJong et al., 2001; Collado y Méndez, 2010). Estas secuencias revelan que *B. thermali* es una especie diferente de *B. andecola* debido a que pertenecen a clados distantemente relacionados, no soportando la hipótesis de Malek (1985). El análisis filogenético COI infirió a la especie nominal *B. aymara* de los bofedales de Isluga al interior de *B. costata*, lo que estuvo en conflicto con los análisis realizados con las secuencias 16S e ITS2, que muestran a *B. aymara* no resuelta o formando parte de otra agrupación. Considerando esta información molecular, favorecemos la hipótesis de dos diferentes taxa. Sin embargo, es importante notar que el presente estudio no demuestra ni niega que sean grupos hermanos, sino que establece que ambos taxa forman parte del complejo altiplánico.

Los análisis filogenéticos realizados en el presente estudio permiten postular la existencia de dos especies nuevas, una diseminada en diferentes sistemas hidrológicos de la cuenca Caquena, zona norte del área de estudio, y otra restringida a sistemas de la cuenca Lauca y Huasco. Ambos taxa serán descritos en un próximo trabajo.

Tabla 5.1. Resumen de las principales preguntas y resultados obtenidos en esta tesis.

Preguntas	Capítulos	Resultados
<p>¿Las poblaciones altiplánicas de <i>Biomphalaria</i> constituyen un grupo monofilético?</p> <p>¿Cuál es su posición sistemática al interior del género?</p> <p>¿Cuándo se originaron los diferentes linajes altiplánicos?</p>	<p>2 y 3</p> <p>2 y 3</p>	<p>Todos los análisis realizados con las secuencias ITS1, ITS2 y 16S recuperaron las poblaciones altiplánicas formando un grupo monofilético junto a <i>B. peregrina</i> y <i>B. oligoza</i>. Este clado es el grupo hermano del resto de las especies de <i>Biomphalaria</i>. Con las secuencias COI, las poblaciones altiplánicas conformaron un grupo monofilético cuyo grupo hermano es <i>B. peregrina</i>.</p> <p>Las secuencias mitocondriales sugieren que las poblaciones altiplánicas de <i>Biomphalaria</i> divergieron durante el Pleistoceno medio y tardío.</p>
<p>¿Qué hipótesis biogeográfica explica de mejor manera los patrones de distribución de estas poblaciones en la región altiplánica?</p>	<p>3 y 4</p>	<p>Con las secuencias COI se recuperó una filogenia resuelta y estructurada cuyos linajes, en general, mostraron congruencia con la división fisiográfica del área estudiada, soportando la hipótesis de vicarianza como mecanismo que promueve la divergencia. Sin embargo, fenómenos de dispersión también fueron inferidos.</p>
<p>Entre los linajes recuperados, ¿pudieron detectarse especies nuevas?</p>	<p>3 y 4</p>	<p>Sí. Se hipotetiza la existencia de dos especies nuevas en la región, una distribuida en sistemas de la cuenca Caquena y otra en la cuenca Lauca. Ambas taxa fueron reconocidos mediante caracteres moleculares.</p>
<p>¿Cuántas especies de <i>Biomphalaria</i> existen en el Altiplano Sur?</p>	<p>2</p>	<p>Las filogenias COI infieren cuatro especies, las dos nuevas más <i>B. thermalis</i> y <i>B. costata</i>. Conflicto de caracteres ocurre entre la especie nominal <i>B. aymara</i>, que aparece al interior del clado <i>B. costata</i>. Las secuencias ITS2 y 16S, sin embargo, revelaron que ambos taxa no forman un grupo monofilético por lo que favorecemos la hipótesis que pertenecen a dos diferentes taxa. De esta manera, habría cinco especies en el Altiplano Sur.</p>

Literatura citada

- Argollo, J., y Mourguiart, P., 2000, Late Quaternary climate history of the Bolivian Altiplano: Quaternary International, v. 72, p. 37-51.
- Bandoni, S.M., M. Mulvey y E.S. Loker. 1995. Phylogenetic analysis of eleven species of *Biomphalaria* Preston, 1910 (Gastropoda: Planorbidae) based on comparisons of allozymes. Biol. J. Linn. Soc. 54:1-27.
- Brown, D. S. 1994. Freshwater snails of Africa and their medical importance. 2nd edition. Taylor and Francis, London.
- Caldeira, R.L., Vidigal, T.H.D.A., Paulinelli, S.T., Simpson, A.J.G. y O.S. Carvalho. 1998. Molecular Identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a PCR-RFLP. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 93: 219-225.
- Caldeira, R.L., Vidigal, T.H.D.A., Matinela, L., Simpson, A.J.G. y O.S. Carvalho. 2000. Identification of planorbids from Venezuela by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism of ITS of the RNA ribosomal gene. Mem. Inst. Inst. Oswaldo Cruz 95: 171-177.
- Campbell, G., C.S. Jones, A.E. Lockyer, S. Hughes, D.L. Brown, R. Nobley y D. Rollinson. 2000. Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 267: 2351-2358.
- Charbonnel, N., Angers, B. y Rasatavonjizay, R. 2002. The influence of mating system, demography, parasites and colonization on the population dynamics of *Biomphalaria pfeifferi*, Madagascar. Molecular Ecology 11: 2213-2228.

- Chong, G.D. 1988. The cenozoic saline deposits of the Chilean Andes between 18°00' and 27°00' south latitude. En Bahlburg, H., Ch. Breitzkreuz & P. Geise (Eds). The Southern Andes. Lecture Notes in Earth Sciences 17: 137-151.
- Clapperton, C. 1993. Quaternary paleolakes of the arid regions of South America. In: Quaternary geology and geomorphology of South America. Elsevier, pp 489.
- Davis, G.M. 1980. Snail hosts of Asian *Schistosoma* infecting man: evolution and coevolution. Malacol. Rev. (Suppl. 2): 195-238.
- DeJong, R.J., Morgan, J.A.T., Paraense, L., Pointier, J.-P., Amarista, M., Ayeh-Kumi, P.F.K., Babiker, A., Barbosa, C.S., Br_emon, P., Canesè, A.P., de Souza, C.P., Dominguez, C., File, S., Gutierrez, A., Incani, R.N., Kawano, T., Kazibwe, F., Kpikpi, J., Lwambo, N.J.S., Mimpfoundi, R., Njiokou, F., Poda, J.N., Sene, M., Vel_asquez, L.E., Yong, M., Adema, C.M., Hofkin, B.V., Mkoji, G.M. y Loker, E.S. (2001). Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke *Schistosoma mansoni*. Molecular Biology and Evolution 18: 2225-2239.
- Dejong, R.J., Morgan, J.A.T., Wilson, W.D., Al-Jaser, M.H., Coulibaly, G. y col. 2003. Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics. Molecular Ecology 12: 3041-3056.
- Estrada, V.E., Velásquez, L.E., Caldeira, R.L., Bejarano, E.E., Rojas, W. y O.S. Carvalho. 2006. Phylogenetics of South American *Biomphalaria* and description of a new species (Gastropoda: Planorbidae). Journal of Molluscan Studies 72: 221-228.

- Ghosh, P., Garzzone, C.N. y J.M. Eiler. 2006. Rapid Uplift of the Altiplano Revealed Through ^{13}C - ^{18}O Bonds in Paleosol Carbonates. *Science* 311 (5760): 511-515.
- Gregory-Wodzicki, K.M. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin* 112: 1091-1105.
- Hartley, A.J. 2003. Andean uplift and climate change. *Journal of the Geological Society, London*, 160: 7-10.
- Hurlbert, S. y C. Chang. 1984. Ancient ice islands in salt lakes of the central Andes. *Science* 224.
- Jarne, P. 1995. Mating system, bottlenecks and genetic polymorphism in hermaphroditic animals. *Genetic Research* 65: 193-207.
- Jarne, P. y B. Delay. 1991. Population genetics of freshwater snails. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 383-386.
- Johnson, S.G. 2005. Age, phylogeography and population structure of the microendemic banded spring snail, *Mexipyrgus churinceanus*. *Mol Ecol.* 2005 14(8): 2299-311.
- Jørgensen A., Kristensen, T.K. y J.R. Stothard. 2007. Phylogeny and biogeography of African *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae), with emphasis on endemic species of the great East African lakes. *Zoological Journal of the Linnean Society* 151: 337-349.
- Keller, B. y D. Soto. 1998. Hydrogeologic influences on the preservation of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), in Salar de Ascotán, northern Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71: 147-156.

- Lavenu, A., Fornari, M. y M. Sebrier. 1984. Existence de deux nouveaux izpisodes lacustres Quaternaires dans l'altiplano pbruvo-bolivien. Cah. O.R.S.T.O.M., ser. Geol., 15(1): 103-114.
- Liu, H-P., Hershler, R. y K. Clift. 2003. Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cr̄yptic diversity within a western American springsnail. *Molecular Ecology* 12: 2771-2782.
- Lüssen, A. Falk, T.M. y W. Villwock. 2003. Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 151-160.
- Malek, E.A. 1985. Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual. Pan American Health Organization Scientific Publication No. 478. PAHO, Washington.
- Marshall, L.G. y T. Sempere. 1993. Evolution of the Neotropical Cenozoic land mammal fauna in its geochronologic, stratigraphic and tectonic context. In: Goldblatt, P. (Eds.), *Biological relationships between Africa and South America*. Yale University Press, New Haven, CT, pp. 329-392.
- Martínez, G., Bugueño, N. y I. Vila, 1999. *Orestias ascotanensis* Parenti, 1984 en el Salar de Ascotán. *Noticiero Mensual del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)* 339: 7-12.
- Mavárez, J., David, P., Pointier, J-P. y P. Jarne. 2002a. Genetic differentiation, dispersal and mating system in the Schistosome-ransmitting freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Heredity* 89: 258-265.

- Mavárez, J., Steiner, C., Pointier, J-P. y P. Jarne. 2002b. Evolutionary history and phylogeography of the schistosome-vector freshwater snail *Biomphalaria glabrata* based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Heredity* 89: 266–272.
- McCauley, D.E. 1991. Genetic consequences of local population extinction and recolonization. *Trends Ecol Evo* 16: 5–8.
- Morales, P.M. 2009. Diferenciación genética y conectividad en ambientes fragmentados: el caso de *Orestias* (Teleostei; Cyprinodontidae) de los salares de Ascotan y Carcote en el Altiplano chileno. Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Universidad de Chile. 75 pp.
- Morgan, J.A.T., R.J. Dejong, S.D. Younghun Jung, K. Khallaayoune, S. Kock, G.M. Mkoji y E.S. Loker. 2002. A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of *Schistosoma* parasites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 25: 477–488.
- Montti, S., y H. Henríquez. 1972. Interpretación hidrogeológica de la génesis de salares y lagunas del Altiplano chileno. *Actas II Congreso Geol. Chile*. 3: 69-81.
- Nicosia, W. y M. Gaete. 2003. Clase Mollusca. Lista preliminar de los moluscos de la Primera Región de Chile. *Apuntes de Zoología, Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile*. 15 pp.
- Northcote, G.G. 2000. Ecological interactions among an Orestiid (Pisces: Cyprinodontidae) species flock in the littoral zone of Lake Titicaca, p. 399–420. In: *Advances in Ecological Research: Ancient Lakes Biodiversity, Ecology and Evolution*. A. Rossiter, A. and H. Kawanabe (eds.). Academic Press, New York.

- O'Brien, C. y D.W. Blinn. 1999. The endemic spring snail *Pyrgulopsis montezumensis* in a high CO₂ environment: importance of extreme chemical habitats as refugia. *Freshwater Biology* 42: 225–234.
- Paraense, W.L., Fauran, P., y E. Courmes. 1964. Observations sur la morphologie la taxonomie la répartition géographique et les gites D' *Australorbis schrammi*. *Bull. Soc. Pathol. Exotique* 57: 1236-1254.
- Paraense, W.L. 1966. The synonymy and distribution of "*Biomphalaria peregrina*" in the Neotropical region. *Revista Brasileira de Biologia*, 26, 269–296.
- Paraense, W.L. 1975. *Biomphalaria orbigny* sp.n. from Argentina (Gastropoda: Basommatophora: Planorbidae). *Rev. Brasil. Biol.* 35: 211-222.
- Paraense, W.L. 1981. *Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca Basommatophora Pulmonata). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 76: 199-211.
- Paraense, W.L. 1984. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* sp.n. from Southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 465-469.
- Paraense, W.L. 1988. *Biomphalaria kuhni*ana (Clessin, 1883), planorbid mollusc from South America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 83: 1-12.
- Paraense, W.L. 2003. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Peru (Mollusca: Basommatophora). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98(6): 767-771.
- Parker, A. y I. Kornfield. 1995. Molecular perspective on evolution ad zoogeography of Cyprinodontid Killifishes (Teleostei; Atherinomorpha). *Copeia* 1995 (1): 8-21.
- Placzek, C., Quade, J. y P.J. Patchett. 2006. Geochronology and stratigraphy of late Pleistocene lake cycles on the southern Bolivian Altiplano: Implications for

- causes of tropical climate change. Geological Society of America Bulletin 118 (5/6): 515–532.
- Pilsbry, H.A. 1911. Non-marine mollusca of Patagonia. Report of the Princeton University Expedition to Patagonia, Pp. 1896–1899.
- Risacher, F. 1992. Les salars de l'Altiplano de Bolivie. La Vie des Sciences, Comptes rendus 9(1): 39-62.
- Risacher, F y B. Fritz. 1991. Quaternary geochemical evolution of the salars of Uyuni and Coipasa, Central Altiplano, Bolivia. Chemical Geology 90: 211-231.
- Scott, S.A. 2010. Sistemática y filogenia de *Orestias* del complejo *agassizii* (Teleosteis: Cyprinodontidae) de la Puna. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Universidad de Chile. 82 pp.
- Servant, M. y J.Ch. Fontes. 1978. Les lacs quaternaires des hauts plateaux des Andes boliviennes. Premières interprétations paléoclimatiques. Cah. ORSTOM, Sér. Géol., 10(1): 9-23.
- Sielfeld, W. 2001. Phylum Mollusca. Guías de Identificación y Biodiversidad Fauna Chilena. Apuntes de Zoología (pp. 1-15). Universidad Arturo Prat, Iquique. Chile.
- Spatz L, T.H.D.A. Vidigal, R.L. Caldeira, E. Dias Neto, S.M. González Cappa y O.S. Carvalho. 1999. Study of *Biomphalaria tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *B. occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. J. Moll. Stud. 65: 143-149.
- Spatz, L., T.H.D.A., Vidigal, M.C.A. Silva, S.M. González Cappa y O.S. Carvalho. 2000. Characterization of *Biomphalaria orbigny*, *B. peregrina* and *B. oligoza* by polymerase chain reaction and restriction enzyme digestion of the internal

- transcribed spacer region of the RNA ribosomal gene. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 807-814.
- Städler, T. y P. Jarne. 1997. Population biology, genetic structure, and mating system parameters in freshwater snails. In: Evolutionary Ecology of Freshwater Animals (eds Streit B, Städler T, Lively CM), pp. 231-262. Birkhäuser-Verlag, Basel.
- Sylvestre, F., Servant, M., Servant-Vildary, S., Causse, C., Fournier, M. y J.P. Ybert. 1999. Lake-level chronology on the southern Bolivian Altiplano (18-23°S) during late-Glacial time and the early Holocene. Quaternary Research 51: 54- 66.
- Valdovinos, C. y J. Stuardo. 1991. Planorbidos altoandinos del norte de Chile y *Biomphalaria aymara* spec. nov. (Mollusca: Basommatophora). Studies on Neotropical fauna and Environment 26: 213-224.
- Valdovinos, C. 1999. Biodiversidad de moluscos chilenos: Base de datos taxonómica y distribucional. Gayana Zoología 63: 111-164.
- Valdovinos, C. 2006. Estado de conocimiento de los gastrópodos dulceacuícolas de Chile. Gayana Zoología 70: 88-95.
- Velásquez, L.E., Caldeira, R.L., Estrada, V. y O.S. Carvalho. 2002. Morphological and Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Characterization of *Biomphalaria kuhniana* and *Biomphalaria amazonica* from Colombia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97(7): 997-1004.
- Vidigal, T.H.D.A., Spatz, L., Nunes, N.D., Simpson, A.J.G., Carvalho, O.S. y E. Dias Neto. 1998. *Biomphalaria* spp: Identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. Experimental Parasitology 89: 180-187.

- Vidigal, T.H.D.A., Caldeira, R.L., Simpson, A.J.G. y O.S. Carvalho. 2000a. Further studies on the molecular systematics of *Biomphalaria* snails from Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 95: 57-66.
- Vidigal, T.H.D.A., Kissinger, J.C., Caldeira, R.L., Pires, E.C.R., Monteiro, E., Simpson, A.J.G. y O.S. Carvalho. 2000b.-Phylogenetic relationships among Brazilian *Biomphalaria* species (Mollusca: Planorbidae) based upon analysis of ribosomal ITS2 sequences. Parasitology 121: 611-620.
- Vidigal, T.H.D.A., Spatz, L., Nunes D.N., Simpson, A.J.G., Carvalho, O.S., y E. Dias Neto. 1998. *Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. Exp. Parasitol. 89: 180-187.
- WHO-World Health Organization 1993. The control of schistosomiasis. Second report of the WHO expert committee. Technical Report Series 830, WHO, Geneva, 86 pp.
- Villwock, W. y U. Sienknecht. 1996. Contribución al conocimiento e historia de los peces chilenos. Los Cyprinodontidos del género *Orestias* Val. 1839 (Teleostei; Cyprinodontidae) del Altiplano Chileno. Medio Ambiente 13(1): 119-126.
- Vila, I. 2006. A New Species of Killifish in the Genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) from the Southern High Andes, Chile. Copeia 3, 472-477.
- Woodruff, D.S. y M. Mulvey. 1997. Neotropical schistosomiasis: African affinities of the host snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Planorbidae). Biol. J. Linn. Soc. 60: 505-516.

Yong, M., Perera, G. y J.R.F. Lopes. 1991. Caracterizacion de *Biomphalaria orbigny* Paraense, 1974, molusco de importância médico-epidemiológico recientemente reportado para Cuba. Rev. Cubana Med. Trop. 43: 21-25.

Yong, M., Perera, G. y A. Gutierrez. 1995. *Biomphalaria havanensis* y *Biomphalaria orbigny* (Mollusca: Planorbidae): Dos especies en sinonimia? Rev. Cubana Med. Trop. 47: 209-210.