

ISSN 2314-2219



# Boletín de la Asociación Argentina de Malacología



31 de diciembre de 2019 (Volumen 9, Número 2)

# ANÁLISIS CONQUIOLÓGICO, ANATÓMICO Y MOLECULAR DE DOS ESPECIES DEL GÉNERO *POTAMOLITHUS*, EN LA ISLA MARTÍN GARCÍA (ARGENTINA).

de Lucía, M.<sup>1,2</sup> & Gutiérrez Gregoric, D.E.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> División Zoología Invertebrados, Museo de La Plata, FCNyM-UNLP

<sup>2</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

<sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. La Plata, Buenos Aires, Argentina.

## INTRODUCCIÓN

El género *Potamolithus* (Tateidae) presenta la mayor riqueza específica dentro de los gasterópodos dulceacuícolas de la Argentina (Rumi et al., 2008). Sin embargo, el conocimiento de sus especies se basa principalmente en caracteres de la concha, la cual presenta gran variabilidad dentro de una misma especie. La distribución más austral de este género dentro de la Cuenca del Plata, se da en las costas bonaerenses del Río de la Plata. En estas costas sólo dos especies presentan descripciones anatómicas (filamentos branquiales, coloración de cabeza y manto, pene, rádula) realizadas por López Armengol (1996): *Potamolithus agapetus* Pilsbry, 1911 y *P. buschii* (Frauenfeld, 1865) sobre material de la costa argentina (Anchorena y Olivos) y uruguayaya (Isla San Gabriel y río San Juan). Koch et al. (2015) aportan una secuencia del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) para estas dos especies, con material procedente de la Isla Martín García (IMG).

El objetivo de este trabajo es completar y actualizar la descripción conquiológica, anatómica y genética de *Potamolithus agapetus* y *P. buschii*, presentes en la IMG. Este trabajo se enmarca en el desarrollo de la tesis doctoral (FCNyM-UNLP) de la primera autora, cuyo tema principal es analizar el estado de conservación de dicho género en la Provincia de Buenos Aires.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ejemplares fueron recolectados (año 2018) y preparados siguiendo a Gutiérrez Gregoric & Núñez (2010) en dos sitios: Casa de Bombas (34°11'23"S, 58°14'58"O) y Punta Cañón (34°10'32"S, 58°14'37"O) (Fig. 1). Las conchas fueron fotografiadas y dibujadas bajo microscopio estereoscópico. Para los análisis conquiológicos y anatómicos se siguió a Parodiz (1951), López Armengol (1996) y Hershler & Ponder (1998). Las rádulas se prepararon según el protocolo de Holznagel (1998), y se revisaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL/JSMT 6360 LV) del Museo de La Plata. Se analizaron lotes de la Colección Malacológica del Museo de La Plata (MLP-Ma); fototipos de "The Academy of Natural Sciences of Philadelphia", USA (ANSP) y de Naturhistorisches Museum, Wien, Austria (NHMW).

Se analizaron 12 ejemplares adultos a nivel molecular. La extracción de ADN se realizó por tres métodos: CTAB (9 ejemplares), Kit Qiagen (2 ejemplares) y Chelex 100 (1 ejemplar). La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa del gen COI se realizó siguiendo el protocolo de Gutiérrez Gregoric et al. (2014). La secuenciación se realizó en Macrogen Inc., Korea. Se analizó la distancia genética mediante el algoritmo de Neighbor-Joining y análisis filogenéticos con los modelos de Máxima Verosimilitud (programa MEGA X, Kumar et al., 2018) e Inferencia Bayesiana (programa MrBayes 3.2, Ronquist et al., 2012).

## RESULTADOS

### Análisis Morfoanatómico

*Potamolithus agapetus* (Pilsbry, 1911)

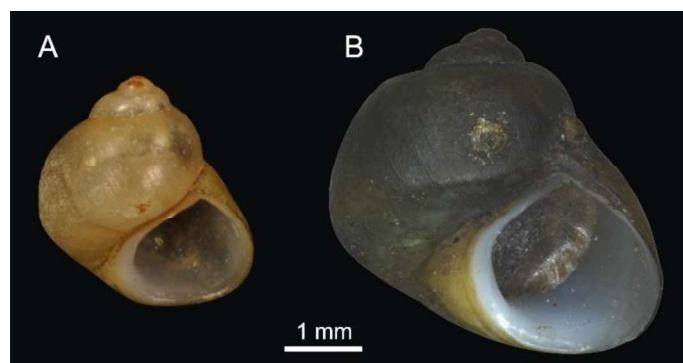
**Descripción original:** Pilsbry, 1911. Non-marine Mollusca of Patagonia. Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia, 1896-1899, Vol 3, Zoology, Part V. Princeton University.

**Holotipo y localidad tipo:** Academy of Natural Sciences of Philadelphia ANSP 69683. Río de la Plata, Isla San Gabriel, Uruguay (Fig. 2).

**Material examinado:** IMG (en los dos sitios); MLP-Ma 13806, IMG (Casa de Bombas); ANSP 69683, Isla San Gabriel, Uruguay (Holotipo).



**Figura 1.** Mapa Reserva Isla Martín García. Copyright Cuerpo de guardaparques IMG 2019. ★: Casa de Bombas; ★: Punta Cañón.

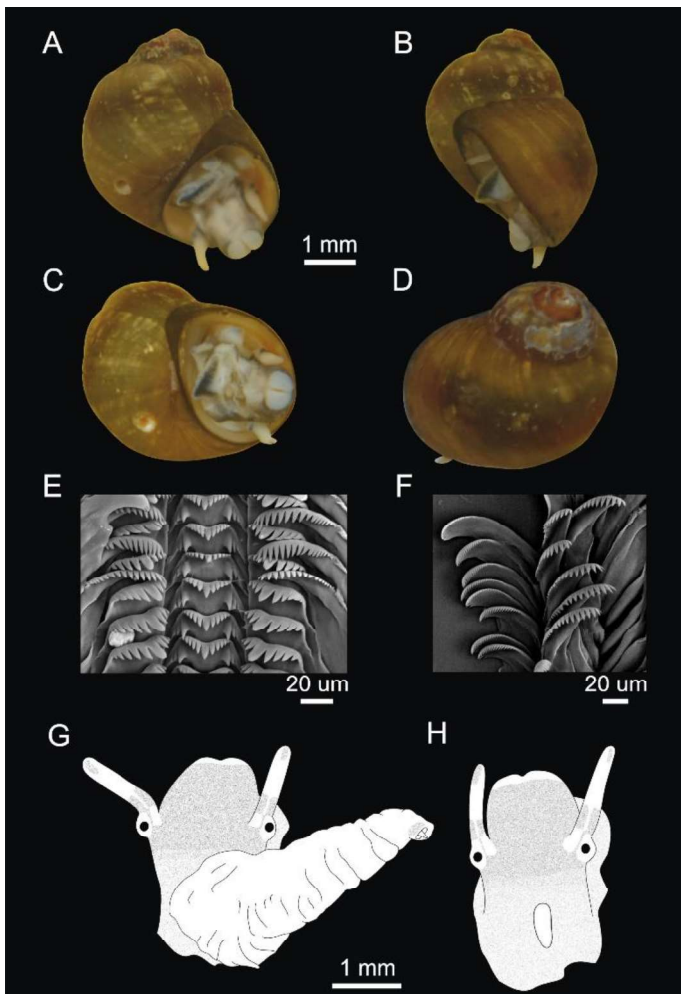


**Figura 2.** Holotipos: A: *Potamolithus agapetus* ANSP 69683. B: *Potamolithus buschii* NHMW MO13196.



*Descripción ampliada:* (Fig. 3).

*Concha:* Globosa, marrón claro. En los ejemplares, se dan las combinaciones: con banda y sin surco; sin surco ni banda; con surco y sin banda. Largo total (LT): 4,08 a 5,05 mm; ancho total 4,16 a 4,37mm; 4,48 vueltas. Espira corta (14% del LT). Abertura oval (60% del LT).



**Figura 3.** *Potamolithus agapetus*. A-D: Concha; E-F: Rádula (BEI: backscattered electron image); G-H: Cabeza macho y hembra. (A-F: ejemplar 301).

*Rádula:* Tamaño medio (30% del LT), largo 1,45 mm y ancho 0,22 mm. Total de hileras 80 (13 en formación). Diente central trapezoidal (ancho superficie anterior 28 µm; ancho superficie basal 50 µm), superficie dorsal cóncava, con excavación profunda en la base (63% de la altura del diente). Mesocono del diente lateral con forma de daga (Tabla 1).

**Tabla 1.** Fórmula radular. (N) número de dientes analizados.

<i>Potamolithus agapetus</i> Ejemplar 301		
	N	Fórmula (%)
Central	12	$\frac{5-1-5}{2-3}$ (50); $\frac{5-1-5}{2-2}$ (33); $\frac{5-1-6}{3-3}$ (17)
Lateral	30	4-1-4 (77); 5-1-4 (23)
Marginal interno	14	16 (78); 18 (22)
Marginal externo	4	20 (50); 23 (50)
<i>Potamolithus buschii</i> Ejemplar 296		
Central	18	$\frac{4-1-5}{2-2}$ (11); $\frac{5-1-5}{2-2}$ (89)
Lateral	40	4-1-4 (65); 4-1-3 (35)
Marginal interno	1	18 (100)
Marginal externo	2	31 (100)

*Anatomía:* Cabeza gris claro. Tentáculos con banda perpendicular gris cerca de los ojos, luego blanco y en el extremo distal una mancha gris. Ctenidio con 34 a 36 filamentos branquiales. Pene blanco con pigmentación negra interna en el collar prepucial. Hembra con nodo nucal.

*Información genética:* Se obtuvieron 4 secuencias del gen COI de 658pb que corresponden a un solo haplotipo.

*Comentarios:* Según López Armengol (1996) esta especie posee dimorfismo sexual en cuanto al tamaño y la forma de la concha (siendo las hembras más grandes), lo cual no fue observado en nuestro material. Ampliamos la descripción realizada por López Armengol (1996) a: a) filamentos branquiales: de 19-28 a 19-36; b) rádula: diente central con 3 o 4 pares de cúspides basales a tener de 2 a 4 pares de cúspides basales. La morfología de los dientes radulares (central y lateral) es igual a la descrita por López Armengol (1996). Las cuatro secuencias del gen COI obtenidas se corresponden con la secuencia KM220909 de GenBank identificada como *P. buschii* (MLP-Ma 13811) en un 100% (Tabla 2). En MLP-Ma 13811 no se encuentra el ejemplar al cual se le extrajo ADN y se obtuvo dicha secuencia (el mismo fue destruido sin fotografiar, Koch com. pers). Dentro del lote MLP-Ma 13811 identificamos anatómicamente ejemplares pertenecientes a *P. agapetus* y no de *P. buschii*. Además, analizamos algunos ejemplares del lote MLP-Ma 13806 (identificado como *P. agapetus*) y registramos dos especies, *P. agapetus* y *P. buschii*. Por lo tanto, la secuencia KM220909 depositada en GenBank (erróneamente identificada como *P. buschii*) es considerada aquí como *P. agapetus*.

**Tabla 2.** Distancia genética (Kimura 3 parámetros, %) de las dos especies tratadas en este trabajo con las otras depositadas en GenBank. En color las secuencias generadas en este trabajo.

Especies/GenBank	1	2	3	4
1 <i>P. buschii</i> ej. 296, 299, 300, 302, 323-24, 327, 329				
2 <i>P. buschii</i> KM220910	0,2			
3 <i>P. agapetus</i> ej. 301, 319, 321, 328	8,0	8,3		
4 <i>P. agapetus</i> KM220909	8,0	8,3	0,0	
<i>P. supersulcatus</i> KX158843	8,5	8,7	7,1	7,1
<i>P. elenae</i> KX397599-600	9,4	9,6	7,3	7,3
<i>P. santiagensis</i> MH536524-26, 29, MH729626	11,1	11,3	11,6	11,6
<i>P. santiagensis</i> MH729622-23	10,8	11,1	11,8	11,8
<i>P. santiagensis</i> MH536528	10,8	11,1	11,6	11,6
<i>P. santiagensis</i> MH729624-25, MH536527	10,6	10,9	11,6	11,6
<i>Potamolithus</i> sp. MH729621, 27-28	10,9	11,1	10,1	10,1
<i>Potamolithus</i> sp. MH536530	9,6	9,8	9,8	9,8
<i>P. australis</i> MH536531	10,0	10,2	9,0	9,0
<i>P. australis</i> MH536532	9,7	10,0	8,7	8,7
<i>P. ribeirensis</i> JX970618	11,9	12,2	11,2	11,2

*Potamolithus buschii* (Frauenfeld, 1865)

*Descripción original:* Frauenfeld GR Von.1865. Zoologische Miscellen, V, in Verhandlungen der K. K. Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien, 15: 525-536.

*Holotipo y localidad tipo:* Naturhistorisches Museum, Wien, Austria MO13196. Desembocadura del río San Juan en el Río de la Plata, R.O. Uruguay. (Fig. 2).

*Material examinado:* IMG (los dos sitios); MLP-Ma 13811, IMG (Casa de Bombas); NHMW MO13196, río San Juan, Uruguay (Holotipo).

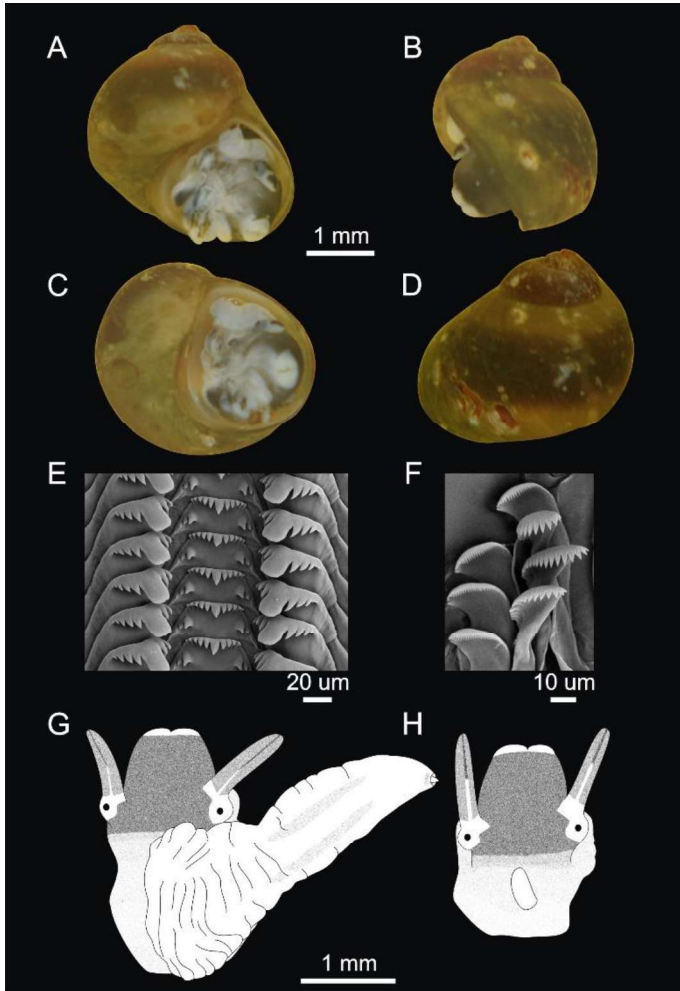
*Descripción ampliada:* (Fig. 4).

*Concha:* Globosa, marrón claro. Se dan las combinaciones: con banda y sin surco; sin surco ni banda; con surco y sin banda. Largo total 3,63 a 4,26 mm; ancho total 3,53 a 4,16 mm; 4,23 vueltas. Espira corta (12% del LT). Abertura oval (70% del LT).

**Rádula:** Tamaño grande (50% del LT), largo 1,85 mm y ancho 0,19 mm. Total de hileras 80 (13 en formación). Diente central trapezoidal (ancho superficie anterior 38 µm; ancho superficie basal 63 µm), superficie dorsal recta, sin excavación en la base (22% de la altura del diente). Mesocono del diente lateral con forma cuadrada (Tabla 1).

**Anatomía:** Cabeza gris oscura a negra. Tentáculos grises, en la base una línea media blanca, que conforme se acerca a la punta se hace negra. Ctenidio con 29 a 31 filamentos branquiales. Pene blanco con pigmentación negra interna en la zona media. Hembra con nodo nupal.

**Información genética:** Se obtuvieron 8 secuencias del gen COI de 658pb que corresponden a un solo haplotipo.

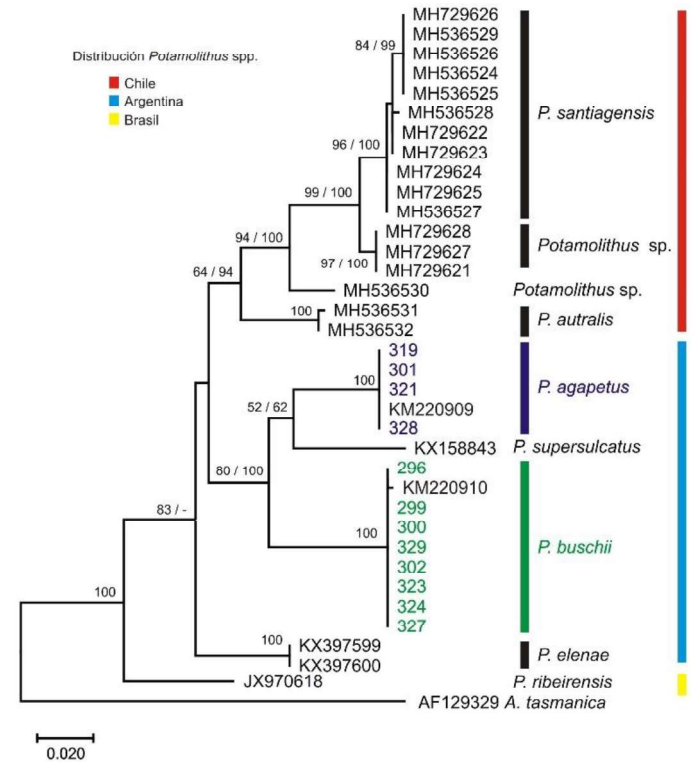


**Figura 4.** *Potamolithus buschii*. A-D: Concha; E-F: Rádula (BEI); G-H: Cabeza macho y hembra. (A-F: ejemplar 296).

**Comentarios:** Ampliamos la descripción realizada por López Armengol (1996) a: a) rádula: central de 9 a 10 cúspides anteriores a tener de 9 a 11; b) lateral de 5 a 8 cúspides a tener de 5 a 9; c) marginal interno de 9 a 11 cúspides a tener 9 a 18; d) marginal externo de 12 a 15 cúspides a tener de 12 a 31. La morfología de los dientes radulares (central y lateral) es igual a la descrita por López Armengol (1996). Las ocho secuencias del gen COI obtenidas se corresponden con la secuencia KM220910 de GenBank determinada como *P. agapetus* (MLP-Ma 13806) en un 99,8% (Tabla 2). Al igual que el lote MLP-Ma 13811, el ejemplar al cual se le extrajo ADN fue destruido sin fotografiar (Koch com. pers). En el lote MLP-Ma 13806 hemos registrado a las dos especies. Por lo tanto, la secuencia KM220910 depositada en GenBank (erróneamente identificada como *P. agapetus*) es considerada aquí como *P. buschii*.

**Análisis Genético (gen COI)**

Las distancias genéticas obtenidas entre *P. agapetus* y *P. buschii* es de un 8% (Tabla 2). Tanto el análisis de Máxima Verosimilitud (MV) como Inferencia Bayesiana (IB) apoyaron el clado de las especies presentes en la Cuenca del Plata Argentina, segregando las tres especies que presentan secuencias. Ambos análisis posicionan a *P. ribeirensis* Pilsbry, 1911 (Río Feitoria, Brasil) en la base del clado *Potamolithus*. El análisis de MV muestra a *P. elenae* de Lucía & Gutiérrez Gregoric, 2017 (Meseta Somuncurá, RN, Argentina) englobando a los clados de especies presentes en Chile y en la Cuenca del Plata Argentina. Sin embargo, el análisis de IB muestra dos grandes clados por un lado las especies presentes en Chile y por otro las presentes en la Argentina (incluyendo a *P. elenae*) (Fig. 5).



**Figura 5.** Relaciones filogenéticas entre linajes de COI en *Potamolithus* spp. La topología y las longitudes de las ramas son del análisis de MV, con valores de soporte significativos dados como porcentaje de arranque o probabilidad posterior del análisis IB (valores posteriores a la barra). Un solo número indica mismo valor para los dos análisis. “-” agrupación no se corresponde con el análisis de IB.

**CONCLUSIÓN**

La identificación a nivel de concha para estas dos especies es limitada, se necesitan de caracteres anatómicos y moleculares. De este trabajo surge la importancia de conservar el material analizado (voucher), tanto a nivel molecular como anatómico. En casos de que el material deba ser destruido en su totalidad para ser analizado, deben guardarse fotos, dibujos, rádulas u otras estructuras que conserven información.

**AGRADECIMIENTOS**

A la ASAM por otorgar el Premio “Juan José Parodiz” 2018 a Micaela de Lucía, que cubrió parte de los gastos necesarios para el desarrollo de esta investigación. A C. Galeno, director Escuela N°7 Cacique Pincén de la IMG, a los guardaparques de la IMG (M.E. Cueto, G. Domínguez y N. Asin) y al personal del Hostal y Camping Escuela de Grumetes por la logística y apoyo durante los muestreos. A la Lic. A. Zivano por la colaboración en los muestreos. A A. Eschner y S. Schnedl del NHMW por las imágenes del holotipo de *P. buschii*.

REFERENCIAS

- FRAUENFELD GR VON. 1865. Zoologische Miscellen, V, in Verhandlungen der K. K. Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien, 15: 525-536.
- GUTIÉRREZ GREGORIC DE & NÚÑEZ V. 2010. Método de colección de moluscos: gasterópodos continentales. División Zoología Invertebrados, FCNyM-UNLP, Serie Didáctica N° 1.
- GUTIÉRREZ GREGORIC DE, CIOCCO NF & RUMI A. 2014. Two new species of *Chilina* Gray from Cuyo Malacological Province, Argentina. (Gastropoda: Hygrophila: Chiliniidae). Molluscan Research 34: 84-97.
- HERSHLER R & PONDER WF. 1998. A review of morphological characters of hydrobioid snails. Smithsonian contributions to zoology 600:1-55.
- HOLZNAGEL WE. 1998. A non destructive method for cleaning gastropod radulae from frozen, alcohol-fixed, or dried material. American Malacological Bulletin 14(2): 181-183.
- KOCH E, MARTIN, SM & CIOCCO NF. 2015. A molecular contribution to the controversial taxonomical status of some freshwater snails (Caenogastropoda: Risssooidea, Cochliopidae) from the Central Andes desert to Patagonia. Iheringia Serie Zoologia 105(1):69-75, 31.
- KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C & TAMURA K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
- LÓPEZ ARMENGOL MF. 1996. Taxonomic revision of *Potamolithus agapetus* Pilsbry, 1911, and *Potamolithus buschii* (Frauenfeld, 1865) (Gastropoda: Hydrobiidae). Malacologia 38(1-2), 1-17.
- PARODIZ JJ. 1951. Métodos de conchiliometría. Physis 20(38): 241-248.
- PILSBRY HA. 1911. Non-marine Mollusca of Patagonia. In: Scott, W.B. (Ed.), Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia, 1896-1899, Vol 3, Zoology, Part V. Princeton University, USA, Princeton, NJ, pp. 513-633.
- RONQUIST F, TESLENKO M, VAN DER MARK P, AYRES DL, DARLING A, HÖHNA S, LARGET B, LIU L, SUCHARD MA & HUELSENBECK JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic Biology 61(3):539-542.
- RUMI A, GUTIÉRREZ GREGORIC DE, NÚÑEZ V & DARRIGRAN G. 2008. Malacología latinoamericana. Moluscos de agua dulce de la República Argentina. Revista de Biología Tropical 56: 77-111.