

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

VARIABILIDAD GENÉTICA DEL CARACOL DE MANANTIAL DE SAN
BERNARDINO, *Pyrgulopsis bernardina* (GASTROPODA: HYDROBIIDAE)
EN LA CUENCA ALTA DEL RÍO SAN BERNARDINO EN EL
NORESTE DE SONORA, MÉXICO



MARIO ERANDI BONILLAS MONGE

Hermosillo, Sonora

Febrero del 2013

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Mario Erandi Bonillas Monge la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Manejo de Recursos Naturales Terrestres.

Dr. Alejandro Varela Romero
Director de Tesis

Dr. José Manuel Grijalva Chon
Sinodal Secretario

Dr. Terry L. Myers
Sinodal

Dra. Reyna Amanda Castillo Gámez
Suplente

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, la base de lo que soy hoy en día.

A “Mamá Eva”, sabiduría que siempre me recuerda de donde vengo.

A mis amigos, ventanas hacia las distintas formas en las que se puede ver el mundo.

A mis maestros, luces que alumbran el camino hacia donde me quiero dirigir.

A Mónica, mi amor y compañía en cada momento de este viaje.

A la naturaleza, marco de nuestra existencia y fuente de inspiración para personas como yo.

“Quisiera vivir para estudiar, no estudiar para vivir”

- Sir Francis Bacon

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, al DICTUS y al personal de la Licenciatura en Biología, por ser mi segunda casa durante todos estos años y brindarme las herramientas necesarias para superarme.

Al Departamento de Caza y Pesca de Arizona por financiar este proyecto y a la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales por los permisos de colecta de ejemplares.

A la señora Valer Austin y al personal de los ranchos de Fundación Cuenca los Ojos, por permitirnos el acceso a los sitios de colecta y brindarnos apoyo logístico durante las visitas.

A mi comité de tesis conformado por Dr. Alejandro Varela Romero, Dra. Reyna Amanda Castillo Gámez, Dr. Manuel Grijalva Chon, Ph. D. Terry L. Myers, por su tiempo, consejos y dedicación en la elaboración de este trabajo.

A mi director de tesis, Dr. Alejandro Varela Romero por sus enseñanzas, paciencia, confianza y apoyo en la realización de esta investigación.

A la Dra. Reyna Amanda Castillo Gámez, por sus lecciones, su apoyo y su amistad a lo largo de mi carrera.

A mis compañeros del grupo Z13, con los cuales pasamos tantos momentos memorables en estos años de preparación profesional.

A mis compañeros de laboratorio Carlos y Melissa por sus consejos, ayuda y buenos deseos en la realización de mi trabajo de tesis.

A mis amigos que conocí en la carrera David (sarra), Adrian (chino), Isaí (loquito), Jesús (Jr), Carlos (güero), Ramón (Pacheco), César (Hinojo), Emmanuel (Emi), Daniel (hapo), Lucinda (Lucy), Atenas, Lourdes (lulú), Melinda, por haber aprendido tantas cosas unos de otros y porque nuestra amistad dure mucho más que estos años de escuela.

A mis amigos de siempre Enrique (Henry), Santos, Gerardo (cachorro), Miguel (pepo), José Luis (Ileto), Adrian (Nava), Judas, Norma, por estar siempre pendiente unos de otros a

pesar de que ya no nos vemos como solíamos hacerlo, espero que el tiempo y la distancia sigan sin afectar nuestra amistad en el futuro.

A la familia Olguín Villa por tratarme como un verdadero miembro más de su familia.

A mis tíos y primos, por ser parte de mi familia y de mis recuerdos más gratos.

A mis padrinos Georgina y José, porque siempre me brindan su ayuda, consejo y cariño como si fuera su verdadero hijo.

A mi madre Jovita, por todas las decisiones difíciles que has tomado en tu vida y seguir adelante aún cuando todo parecía estar en tu contra, cualquier cosa que pueda decir para agradecerte es poco comparado con lo que siento en realidad, espero que este sea uno de muchos frutos de tu esfuerzo y amor, mis logros son tuyos.

A mi padre Mario César, por quererme, aceptar quien soy y preocuparse por mí siempre, aún cuando no nos veamos a diario sé que puedo contar contigo en cualquier momento, espero hacerte sentir orgulloso.

A mis hermanos Pablo y Marem, por soportarme y respetarme, he tratado de ser un buen ejemplo para ustedes, se que cualquier cosa que yo pueda hacer ustedes la harán mejor.

A mi abuela “mamá Eva”, por ser un testimonio viviente de lucha, por su sabiduría y por permitirme hacerle compañía todos estos años, espero en mi vida tener al menos la mitad de su fortaleza para llevar a cabo todas mis metas.

A mi novia y amiga Mónica, por permitirme compartir contigo este pequeño tiempo de juventud en el que nos encontramos y en el cual hemos aprendido tantas cosas, sin importar que nos tenga el futuro preparado, no cambiaría estos momentos de mi vida por nada π.

A todas esas personas que no alcancé a mencionar y han sido parte importante en algún momento de mi vida, gracias.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
V.1. Objetivo General	21
V.2. Objetivos Específicos	21
VI. METODOLOGÍA	22
VI.1.-Área de Estudio	22
VI.1.1. El Chorro	24
VI.1.2. Agua Fría	25
VI.1.3. Ojo Caliente	25
VI.2. Recolecta de Ejemplares.	26
VI.3. Extracción de ADN	26
VI.3.1. Amplificación del gen mitocondrial COI	26
VI.3.2. Condiciones de la PCR	27

VI.3.3. Electroforesis de los productos de PCR	27
VI.3.4. Secuenciación y análisis de los productos de PCR	28
VI.3.5. Análisis de secuencias	28
VII. RESULTADOS	29
VIII. DISCUSIÓN	35
IX.- CONCLUSIONES	44
X.- RECOMENDACIONES	45
XI.- LITERATURA CITADA	46

LISTA DE TABLAS

		Página
TABLA I	Relación de localidades de recolecta de <i>Pyrgulopsis bernardina</i> en la cuenca alta del Río San Bernardino, Sonora y número total de secuencias de ADN mitocondrial obtenidas.	30
TABLA II	Frecuencia absoluta de los haplotipos del gen COI obtenidos mediante secuenciación en individuos de <i>Pyrgulopsis bernardina</i> en la cuenca alta del Río San Bernardino.	31
TABLA III	Índices de diversidad molecular de las tres localidades de estudio de <i>Pyrgulopsis bernardina</i> en la cuenca alta del Río San Bernardino.	33
TABLA IV	Análisis Molecular de varianza (AMOVA) de las tres localidades de muestreo. g.l. = grados de libertad. <i>Fst</i> = índice de fijación.	34
TABLA V	Valores de <i>Fst</i> (Índice de Fijación) entre las distintas localidades de muestreo.	34

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Concha y opérculo de <i>Pyrgulopsis bernardina</i> .	5
FIGURA 2	Rádula de <i>Pyrgulopsis bernardina</i>	5
FIGURA 3	Localización general de la subcuenca del Río San Bernardino en el Noreste de Sonora y Sureste de Arizona.	23
FIGURA 4	Subcuenca del Río San Bernardino en Sonora y Arizona. Los cuadros blancos indican las localidades muestreadas en este estudio. Los cuadros negros indican las otras dos localidades conocidas.	24
FIGURA 5	Comparación de la diversidad genética y la diversidad nucleotídica (\pm desviación estándar) en <i>Pyrgulopsis bernardina</i> de tres localidades de la cuenca alta del Río San Bernardino.	32

RESUMEN

Los caracoles de manantial del género *Pyrgulopsis* son uno de los grupos más diversos de moluscos dulceacuícolas en Norte América y del cual muchas de sus especies se encuentran en peligro de desaparecer. Entre los factores que contribuyen a su vulnerabilidad pero al mismo tiempo provocan su gran diversidad, destacan su pobre capacidad de dispersión activa y la alta especificidad de las condiciones de su hábitat que requieren para establecerse. El caracol de manantial de San Bernardino (*Pyrgulopsis bernardina*) habita en la cuenca del Río San Bernardino en Sonora, México y Arizona, Estados Unidos de América (EUA); actualmente se encuentra restringido a un sólo ojo de agua en Arizona, mientras que en Sonora se han registrado varios sitios con esta especie. Este caracol ha sido estudiado en EUA y hasta hace poco tiempo aún se creía que sólo habitaba en el Refugio Nacional de Vida Silvestre de San Bernardino, en Arizona, por lo que aún se sabe muy poco sobre las poblaciones que habitan en territorio mexicano. El objetivo de este trabajo fue el conocer la estructura genética poblacional de tres poblaciones en territorio mexicano. En este estudio se muestrearon tres localidades (El Chorro, Agua Fría y Ojo Caliente) donde habita *P. bernardina* dentro de la cuenca alta del Río San Bernardino en Sonora. Se obtuvieron un total de 90 secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I para el análisis de variabilidad genética. Al analizar las secuencias se detectaron 21 haplotipos de los cuales sólo uno se compartió entre las localidades de El Chorro y de Agua Fría. Se realizó un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) con el cual obtuvimos un alto índice de diferenciación genética poblacional ($F_{st} = 0.37968$) y un bajo número de migrantes por generación ($N_e m = 0.8$), lo cual nos confirma que hay un alto grado de estructura poblacional, sugiriendo así la existencia de tres poblaciones diferentes que habitan tres diferentes afluentes de la cuenca. Por lo tanto, se concluye que las poblaciones que habitan la cuenca alta del Río San Bernardino en Sonora, presentan información genética única y conforman una parte muy importante del acervo genético de la especie por lo que es crítica la implementación de programas de acción inmediatos para su correcta conservación.

I. INTRODUCCIÓN

Entre los caracoles dulceacuícolas se encuentran los de la familia Hydrobiidae, que es un grupo cosmopolita que habita permanentemente ambientes dulceacuícolas, a excepción de muy pocos que habitan en las costas. Esta familia constituye un importante componente biótico de las aguas continentales debido a su ubicuidad y diversidad. El diminuto tamaño de los Hidróbidos (< 8 mm) hace muy difícil el estudio anatómico de estos animales por lo cual no se pueden basar en la morfología de la concha para su clasificación sino en características internas como el pene, la rádula o el opérculo (Kabat y Hershler, 1993). Algunas de las especies de Norte América de esta familia han sido colocadas bajo alguna categoría de protección pero aún faltan muchas por determinar su estado de conservación. En México sólo se han determinado siete especies de esta familia en peligro de extinción según la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) las cuales son endémicas de Cuatro Ciénegas, Coahuila (Naranjo-García, 2003).

Algunos miembros de esta familia ya han desaparecido; sólo del género *Pyrgulopsis* ya se han extinto tres especies a principios de siglo (Hershler, 1994; Malcom et al., 2005). Este género es el grupo más diverso de caracoles dulceacuícolas en el Oeste de Norte América y estimaciones recientes muestran que contiene alrededor de 130 especies diferentes, muchas de las cuales se encuentran en peligro de extinción (Kabat y Hershler, 1993; Liu et al., 2003; Hurt, 2004). Ocho de estas especies de caracoles se encuentran distribuidas en el Norte de México (Hershler, 1994) pero ninguna se encuentra bajo protección especial (SEMARNAT, 2010).

Pyrgulopsis bernardina se encuentra en ojos de agua (manantiales) y ambientes asociados a estos en la cuenca alta del Río San Bernardino en el Sureste de Arizona y Noreste de Sonora. Actualmente, la especie está restringida a un sólo ojo de agua en Arizona y algunos sitios poco estudiados del Noreste de Sonora (Malcom et al., 2005). En Estados Unidos se

iniciaron los esfuerzos por proteger esta especie ya que el lugar donde se encuentra presenta perturbaciones que amenazan a la especie (USFWS, 2011).

La desaparición de los caracoles de agua dulce ha causado una creciente preocupación por su conservación debido a su gran diversidad y sensibilidad a los cambios ambientales, lo que los hace un buen bioindicador pero a la vez son muy propensos a extinción (Hershler, 1994; Hurt, 2004). Desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la salud del ecosistema y su nicho como mayor consumidor de plantas acuáticas y como recurso alimentario para anfibios, reptiles, peces y aves es clave en la cadena trófica basal, (Hurt, 2004; USFWS, 2011).

En biología molecular se emplea la información que se encuentra en las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) para determinar la variación genética de individuos y poblaciones. Lo anterior se basa en el principio de que la información genética de un organismo es transmitida a sus descendientes por lo que es posible estimar el parentesco entre individuos y entre grupos de individuos (Avice, 1994). Normalmente las poblaciones suelen dividirse en subpoblaciones debido a factores geográficos o ecológicos y al suceder esto, el flujo genético entre las subpoblaciones puede variar. Cuando el flujo de genes es alto, la variación genética se homogeniza, pero cuando el flujo de genes es bajo, la deriva génica, la selección natural y las mutaciones puede conducir a la diferenciación genética (Hedrick, 2005). En algunos casos este tipo de información tienen relevancia inmediata en cuanto a las estrategias de conservación (Avice, 1994).

Generalmente el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) es utilizado en estudios interespecíficos para inferir filogenias y para identificar especies crípticas bajo el principio del Código de Barras de la Vida (Hebert y Gregory 2005). Para estudios intraespecíficos es muy común utilizar la región control del ADN mitocondrial dada la elevada tasa mutacional. Esto hace que la distribución de haplotipos tenga una estructura evidente mostrando así las diferencias poblacionales en el rango de distribución geográfica de la especie (Ferris y Berg, 1987; Birky et al., 1989). Sin embargo, en el caso de caracoles dulceacuícolas el gen COI es frecuentemente utilizado en estudios intraespecíficos para medir diversidad y estructura genética debido a que se ha reportado una gran variación en este gen la cual está asociada al

elevado grado de estructuración poblacional que presenta este grupo de especies (Davison y Scothem, 2009).

A pesar de que el Departamento de Caza y Pesca de Arizona (AGFD por sus siglas en inglés) y el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos (USFWS por sus siglas en inglés) reconocen la crítica situación de la especie al incluirla en la ley de especies en peligro de EUA (Endanger Species Act, USFWS, 2012), en México no se está llevando a cabo ninguna actividad para conocer y proteger esta especie.

II. ANTECEDENTES

Desde hace más de 100 años, los miembros de los Hidróbidos han llamado la atención de los taxónomos por su gran diversidad y distribución, además de lo confuso de su sistemática. Troschel (1856) fue el primero en tratar de introducir la familia Hydrobiidae (Hydrobiae) como un grupo con un rango incierto entre Lithoglyphi y Ancyloiti. Con el paso del tiempo varios trabajos trataban de contribuir a la formación de esta nueva familia hasta que Stimpson (1865) colocó a los hidróbidos en un grupo muy cercano a la familia Rissoidae. Años más tarde, Call y Pilsbry (1886) describen al género *Pyrgulopsis* (Kabat y Hershler, 1993).

Taylor (1987) fue el primero en describir el caracol de manantial de San Bernardino durante un esfuerzo por describir anatómicamente a los caracoles de agua dulce de Nuevo México. En un inicio fue descrita como *Yaquicoccus bernardinus* y lo publicó como una especie nueva que sólo habitaba en unos ojos de agua del Río San Bernardino. Un año después Hershler y Landye (1988) estudian los caracoles de la familia Hydrobiidae que habitan en el estado de Arizona en el cual se hicieron colectas de estos caracoles en todo el estado y pudieron identificar 14 especies pertenecientes a los géneros *Pyrgulopsis* y *Tryonia*. De estas especies, 13 fueron descritas como nuevas especies y las 14 fueron nuevos registros para el estado. Además de describir de manera morfológica los caracteres y clasificar estos caracoles, proponen claves de identificación dicotómica para los caracoles de la familia Hydrobiidae del estado de Arizona. De las especies que estudiaron, todas tienen un rango estricto de distribución y dos de estas especies son microendémicas a un sólo ojo de agua (una de estas *Pyrgulopsis bernardina*). En este trabajo describen al caracol de manantial de San Bernardino y lo nombran *Pyrgulopsis cochisi* y lo presentan como una nueva especie aun cuando un año anterior Taylor (1987) ya lo había descrito como *Y. bernardinus* y posteriormente como *P. bernardina* (Hershler, 1994).

Este es un caracol dioico, posee un caparazón cónico estrecho con un ápice obtuso de 1.3 a 1.7 mm de largo y tiene de 3.5 a cuatro espirales. Protoconcha débilmente punteada con

varias líneas espirales en los laterales. Tienen un opérculo ovalado que varía del ámbar claro al oscuro (Figura 1), tienen un diente rádula central con el borde dorsal muy dentado (Figura 2). Presentan tentáculos cefálicos pálidos y un hocico que varía de gris a negro. El pie es normalmente pálido y a veces ligeramente pigmentado (Hershler, 1994).



Figura 1. Concha y opérculo de *Pyrgulopsis bernardina*. Fuente: Hershler (1994).

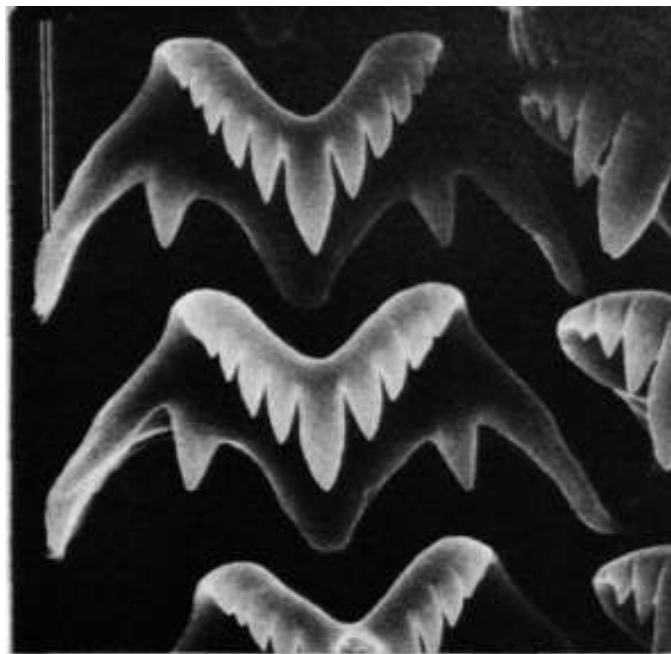


Figura 2. Rádula de *Pyrgulopsis bernardina* (barra = 6.7 μ m). Fuente: Hershler (1994).

Hasta donde se sabe actualmente, *P. bernardina* se encuentran en ojos de agua y ambientes asociados a estos en la cuenca alta del Río San Bernardino el cual es tributario al Río Yaqui en el Sureste de Arizona y Noreste de Sonora (Hershler, 1994; Liu y Hershler 2005; Malcom et al., 2005). En los ojos de agua se pueden encontrar macrofitas como espiga de agua (*Potamogeton* sp), berro de agua (*Rorippa nasturtium-aquaticum*) y yerba mansa (*Anemopsis californica*), así como una escasa comunidad de plantas ribereña compuesta por álamos (*Populus fremonti*), sauces (*Salix goodingii*) y garambullos (*Celtis reticulata*) (Malcom et al., 2005).

Existen varios ojos de agua donde se ha encontrado *P. bernardina* en el Valle de San Bernardino, Snail Spring (Manantial Caracol) que es la localidad tipo, Horse Spring (Manantial Caballo), House Spring (Manantial de la Casa) y Goat Spring (Manantial Cabra) (Varela-Romero y Myers, 2010). En House Spring no se ha observado desde hace diez años y se presume que se extirpó del sitio debido a la contaminación del agua (Varela-Romero y Myers, 2010). Entre 2003 y 2005, las condiciones de sequía aunado a la extracción de agua subterránea, provocaron la extirpación del caracol de la localidad tipo, a pesar de esto, los caracoles de manantial han sido detectados en Horse Spring recientemente en 2009 (Varela-Romero y Myers, 2010) y durante una inspección de esos sitios en Mayo de 2010 por el Departamento de Caza y Pesca de Arizona y el Servicio de Pesca y Vida Silvestre de los Estados Unidos, los caracoles de manantial fueron observados en Goat Springs (Varela-Romero y Myers, 2010)

Los caracoles de manantial de San Bernardino han sido registrados en El Chorro y Los Ojitos río abajo de la localidad tipo en territorio mexicano. Los especímenes colectados en estos sitios se encuentran depositados en la colección del Museo Nacional de Historia Natural (NMNH por sus siglas en inglés) donde fueron identificados por Robert Hershler basándose en las características morfométricas y anatómicas presentadas por Taylor (1987), Hershler y Landye (1988), Hershler (1994) y Varela-Romero y Myers, (2010). Estos caracoles también se encuentran en el Arroyo Cajón Bonito, una subcuenca del Río San Bernardino en Sonora, donde 2003, Michael Bogan de la Universidad Estatal de Oregon, colectó caracoles de manantial de un ojo de agua en Arroyo Agua Fría en Sonora que después fueron identificados

por Hershler como *Pyrgulopsis* sp. En otro arroyo tributario a este llamado Ojo Caliente, los miembros del SBNWR Bill Radke y Jacob Malcom, observaron caracoles que identificaron como *Pyrgulopsis* (Varela-Romero y Myers, 2010).

Por su historia natural, estos caracoles poseen algunos rasgos que los hacen muy vulnerables a la extinción (Dillon, 1988). Tienen requerimientos del hábitat que los restringen, como vivir en ojos de agua con un rango estricto de temperatura, estar donde el carbono disuelto y el calcio tienen concentraciones más altas (O'Brien y Blinn, 1999., Mladenka y Minshall, 2001). Cambios sutiles en la química del agua o temperatura, contaminación, y la destrucción de la vegetación, resulta en la rápida eliminación de la población. Otro factor es la pobre capacidad de dispersarse, extrañamente se mueven más de unos cuantos metros por generación, mientras que los hábitats adecuados están generalmente aislados entre sí por kilómetros de terreno seco (Ponder y Colgan, 2002). Esto último provoca un fuerte aislamiento reproductivo induciendo la diferenciación entre grupos de individuos, resultando en una estructura genética poblacional (Wright, 1973).

Otro problema desgastante y continuo es la definición de taxones dentro de los grupos de moluscos dulceacuícolas; con el propósito de resolver incógnitas concernientes a su evolución, biogeografía y ecología, se han realizado extensos trabajos para clasificar la familia Hydrobiidae basándose en comparaciones anatómicas (Kabat y Hershler, 1993) y moleculares (Wilke et al., 2001). Kabat y Hershler (1993) preocupados por la fidelidad de los criterios tomados hasta el momento para clasificar los caracoles de la familia Hydrobiidae, deciden hacer una revisión de los géneros y especies de esta familia argumentando que la clasificación actual es muy confusa y provocan dudas en cuanto a su validez. Toman como base el trabajo de Ponder y Warén (1988) ya que considera este trabajo la principal fuente de información de la subclase Prosobranchia comparándolo con otros trabajos importantes para esta familia y proponen el cambio de algunos taxones.

Hershler (1994) hace una revisión del género *Pyrgulopsis* del trabajo de Call y Pilsbry (1886) y toma 60 especies y las describe nuevamente con más detalle y agrega observaciones adicionales y también propone reordenar especies para ponerlas fuera o dentro de este género basándose en caracteres morfológicos. Realizó un análisis cladístico para relacionar las especies de este género basándose en caracteres morfológicos. Cuatro grandes clados se

podieron reconocer en ese trabajo: un grupo de nueve especies en el Río Mississippi y tributarios del Este, un grupo de seis especies en el Sur de Nevada y Sureste de Arizona, un grupo de diez especies en el Este de California, Norte de Arizona y por ultimo un grupo de 18 especies dispersas por el lado Oeste. Los 17 restantes incluyen a cuatro especies ocupando una posición basal en el cladograma, un grupo de ocho especies que se sabe muy poco de ellas, dos especies del Norte de Arizona y un grupo de tres especies que sólo se distribuyen en el Norte de México. Este trabajo muestra que seis de todas las especies estudiadas habitan en México y tres más de posible ocurrencia en el país ya que estas habitan justo en la frontera internacional en territorio estadounidense.

Los estudios genéticos son necesarios para documentar de forma fiable el grado y los patrones de divergencia acerca de las características morfológicas en las que se basaron para definir la especie de caracoles de manantial, identificar genéticamente las poblaciones únicas que calificarían para protección especial y para futuras investigaciones acerca del endemismo de este género en la región. También provee vital información para la conservación de invertebrados, información con respecto a la distribución geográfica de la variación genética en estos caracoles la cual podría ayudarnos a entender mejor los procesos de especiación (Hurt, 2004).

La sistemática molecular es una gran herramienta para determinar la relación filogenética entre las especies empleando el método comparativo a partir de la información de las secuencias de ADN. El uso de estos métodos moleculares para la determinación de poblaciones está basado en el principio de que la información genética de un organismo es transmitida a sus descendientes por lo cual es posible estimar el parentesco entre individuos y entre grupos de individuos (Avise, 1994). En la mayoría de las especies las poblaciones suelen subdividirse en unidades más pequeñas debido a factores geográficos, ecológicos o de comportamiento. Cuando esto sucede, la cantidad de conexiones genéticas entre las partes de la población puede variar ya que estas dependen principalmente del flujo de genes que hay entre los grupos. Cuando la cantidad de flujo de genes es alta, se tiene un efecto homogeneizador de la variación genética de los grupos. De forma contraria, cuando el flujo de genes es bajo, la deriva génica, la selección natural y las mutaciones puede conducir a la diferenciación genética en los grupos separados. (Hedrick, 2005). En algunos casos los

hallazgos moleculares en cuanto al parentesco de algunas especies o su diversidad genética tienen relevancia inmediata en cuanto a las estrategias de conservación (Avice, 1994).

Debido a la complicada tarea de clasificar a las especies de esta familia por sus características anatómicas, el alto grado de variación intraespecífico, la desconocida significancia filogenética en cuanto a las características anatómicas y el alto grado en la homoplasia de los caracteres anatómicos, la sistemática es confusa y sus relaciones filogenéticas dentro de este grupo esta pobremente entendido. Por lo anterior, recientemente con la implementación de las herramientas moleculares en la taxonomía, se han logrado esclarecer muchas incógnitas acerca de la sistemática de moluscos dulceacuícolas. En especies animales el ADN mitocondrial se ha convertido en un instrumento fundamental del análisis filogenético, pues además de no recombinar, presenta una tasa de mutación elevada (de cinco a diez veces más que el ADN nuclear) y herencia casi exclusivamente materna, además que presenta regiones hipervariables y superconservadas (Gillespie, 1986; Ferris y Berg, 1987; Birky et al., 1989; Harrison, 1989). Esto puede producir polimorfismo intraespecífico y una fuerte divergencia interespecífica en una relativamente corta escala de tiempo evolutivo (Avice, 1987). Los trabajos moleculares sobre los caracoles de la familia Hydrobiidae incluyen la secuenciación de genes mitocondriales como NDI, 16S y COI para conocer las relaciones filogenéticas y su estructura genética (Wilke et al., 2001; Hurt, 2004; Liu y Hershler, 2007).

Dentro del genoma mitocondrial el gen COI, el cual codifica para una proteína involucrada en la respiración celular, es utilizado para estudios intraespecíficos de moluscos y otros grupos animales ya que es una región del genoma mitocondrial muy conservada (Wilke et al., 2001, Romero y Ramírez, 2011). A pesar que el gen COI es considerado el código de barras genético para identificar a las especies, es frecuentemente usado para medir diversidad y estructura genética en moluscos ya que es un grupo con una gran diversidad genética y en moluscos de agua dulce se ha reportado una gran variación en el gen COI (Davison y Scothem, 2009). La gran diversidad intraespecífica de estos moluscos en este gen puede estar relacionada a una rápida variación en el genoma mitocondrial, la distribución poblacional que permite el aislamiento y diferenciación genética y la presencia de polimorfismos ancestrales (Romero y Ramírez, 2011).

Uno de los primeros trabajos moleculares para este tipo de organismos fue el realizado por Hershler et al. (1999) quienes examinaron las relaciones filogenéticas de 23 especies del género *Tryonia* (Hydrobiidae), diez miembros representativos de la subfamilia Cochliopidae y dos grupos externos. El análisis de secuencias del COI demostró una fuerte relación entre 16 especies de este género los cuales concuerdan con un evento de vicarianza asociado con el Neógeno tardío (3.6 Millones de años) en la cuenca baja del Río Colorado. Este tipo de trabajos ha sido reportado frecuentemente en moluscos dulceacuícolas para tratar de resolver incógnitas sobre su sistemática. Aunque ese trabajo sólo trató de resolver sus relaciones filogenéticas, se recomienda hacer trabajos de estructura genética poblacional.

Con el objetivo de conocer si la familia Hydrobiidae es monofilética (como definieron Kabat y Hershler, 1993), Wilke et al. (2001) estudiaron fragmentos de los genes COI y 18S de 40 géneros representativos de la familia Hydrobiidae. Se analizaron las posibles relaciones filogenéticas y se propusieron ciertos reacomodamientos de las especies dentro y fuera de esta familia. El análisis sugiere que Cochliopidae es una familia distinta de Hydrobiidae y se proponen las subfamilias Hydrobiinae, Pseudamnicolinae, Nymphophilinae, Islamiinae y Horatiinae. Este se considera uno de los trabajos más importantes que se han hecho para la clasificación actual de esta familia en los últimos tiempos.

La subfamilia Nymphophilinae se encuentra dentro de la familia Hydrobiidae y Hershler et al. (2003) estudiaron la relación filogenética de 36 especies dentro de diez géneros mediante la secuenciación del gen COI e hicieron una comparación con una reciente clasificación basada en características morfológicas para una mayor certeza. Mediante métodos de máxima parsimonia lograron resolver la monofilia del subclado compuesto por *Floridobia*, *Nymphophilus* y *Pyrgulopsis* y muestran al resto de los géneros como parafiléticos o monofiléticos.

Liu y Hershler (2005) evaluaron la secuencia del ADN mitocondrial de los genes COI, ND1, y 16S para 62 de 124 especies reconocidas del género *Pyrgulopsis* para aclarar su estructura filogenética en el Oeste de Estados Unidos. También se incluyeron los géneros *Floridobia* y *Nymphophilus* los cuales están muy relacionados con *Pyrgulopsis*. Al comparar los árboles filogenéticos no se encontraron bases obvias para separar este numeroso género en varios más pequeños y se recomendó que *Nymphophilus* y *Pyrgulopsis* se unieran, mientras

que *Floridobia* habría que considerarlo un género aparte. En ese estudio se incluyeron especímenes de *P. bernardina* obtenidos en el Noreste de Sonora del sitio El Chorro que se encuentra en el Río San Bernardino, los cuales fueron colectados por Jacob Malcom (SBNWR) en el año 2002. Estas secuencias se depositaron en GenBank y el haplotipo obtenido de *P. bernardina* (AY627951) ya se había documentado anteriormente por Hurt (2004).

A una escala más local y específica, los estudios filogenéticos en moluscos dulceacuícolas también nos sirven para conocer más del origen de las especies en relación a su distribución y su posterior diversificación. La Gran Cuenca Artesiana (GAB por sus siglas en inglés) de Australia está en una de las partes más secas del Sur de Australia y es aquí donde existen numerosos ojos de agua dulce. Uno de los componentes que están en peligro son los caracoles de manantial de la familia Hydrobiidae. En ese lugar se examinó las relaciones evolutivas de toda la fauna compuesta por la familia Hydrobiidae asociada con la Gran Cuenca Artesiana e incluyó también especies que no se encuentran en esta cuenca para poner el trabajo en un contexto filogenético más amplio (Pérez et al., 2005). El género *Jardinella* fue un objetivo de ese trabajo dando un buen ejemplo a escala de las relaciones entre los supergrupos que habitan los manantiales de la región Noreste de la GAB. Análisis Bayesianos y de Máxima Parsimonia fueron usados en 16S y COI junto con datos de secuencias para 40 taxas de la familia Hydrobiidae dentro de los cuales encontraron cuatro clados principales de Australia. Se pudieron detectar tres eventos de colonización de donde se derivaron sus especies actuales.

Otro trabajo filogenético de caracoles dulceacuícolas es el de Hershler et al. (2005), donde secuenciaron el gen COI para determinar si la especie *Tryonia porrecta* la cual habita en el Oeste de Norte América (Utah, California y Nevada) está fuertemente diferenciada debido a su fragmentación y aislamiento. Estos datos fueron usados también para evaluar si esta especie es un raro ejemplo de un molusco que se reproduce por partenogénesis ya que no se han encontrado ejemplares de caracoles machos. Siete de los diez estudiados presentaron sólo un haplotipo mientras que los sitios restantes (Utah) presentaron nueve haplotipos diferentes por lo que se piensa que en esta región hay reproducción sexual ocasional. También sugieren que la distribución actual de la especie no se debe a un evento de vicarianza si no a

una colonización más reciente posiblemente debido a las condiciones climáticas del Cuaternario tardío.

En el sistema hidrológico del Valle de la Muerte en California y Nevada se encuentra una biota acuática endémica, la cual se ha sido objeto de especulaciones biogeográficas. En estos sitios uno de los elementos más diversos de la fauna son los caracoles de manantial (*Pyrgulopsis*) los cuales se piensa que han evolucionado en conjunto con la geología del lugar. En esa localidad Hershler y Liu (2008) muestrearon 80 poblaciones en las cuales habitan 13 especies del género *Pyrgulopsis*. A través de los métodos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud sugieren que, contrario a lo que se pensaba, la biogeografía regional de los caracoles de manantial es debido a dispersión geológica reciente (periodo del Pleistoceno).

Romero y Ramírez (2011) realizaron un trabajo para estimar la divergencia intraespecífica en el molusco terrestre amazónico *Systrophia helicycloides* y evaluar la utilización de los códigos de barras de ADN en la identificación molecular de esta especie. Por medio del análisis de distancias genéticas se encontró que la especie presenta dos grupos de haplotipos con distancias intraespecíficas mayores a 4% el cual es un valor alto de variación para el gen COI. Estos valores corroboran que en los moluscos terrestres la variación en este gen es tan grande que para la definición de taxones es necesario además de herramientas moleculares, implementar estudios de taxonomía convencional.

En los caracoles del género *Pyrgulopsis* es muy común encontrar altos grados de endemismo por lo cual es importante tratar de definir las especies que califican para protección especial. Hershler y Liu (2010) basándose en la secuencia del gen COI y en características anatómicas proponen dos nuevas especies que pueden estar en peligro de extinción (*Pyrgulopsis castaicensis* y *Pyrgulopsis milleri*) en el Suroeste de California. Las especies nuevas que se describen están restringidas a un sólo sitio, por lo tanto se debería considerar bajo protección especial en caso de que aceptaran como nuevas especies.

En el mismo año Hershler et al. (2010) realizaron un trabajo con *Cochiliopa texana* con el propósito de incluirlo dentro del género *Pyrgulopsis* usando la variación de los genes COI y NDI, dentro y entre las poblaciones de la cuenca baja del Río Pecos en Texas, EUA. Este estudio también sirvió para diferenciar y definir la relación de esta especie con *Pyrgulopsis ignota* que habita cerca de la zona de estudio, la cual no está cercanamente relacionada con *C.*

texana. Esta especie es actualmente conocida también como *Pyrgulopsis texana* y está bajo protección especial por el gobierno federal.

Cuando un caracol de este tipo tiene una distribución amplia y se encuentra aislada reproductivamente entre algunos sitios, puede darse el caso de que se generen especies gemelas. Un ejemplo de esto es el trabajo de Liu et al. (2003) quienes al estimar la diversidad genética de *Pyrgulopsis micrococcus* encontraron que pudiera haber más de una especie de este caracol. Ellos analizaron las secuencias del gen COI de 65 especímenes para 29 poblaciones en el Desierto de la Gran Cuenca y al alinear las secuencias detectaron 31 haplotipos y por medio de análisis filogenéticos proponen que puede haber siete u ocho especies que aún no se han documentado, ya que las poblaciones están restringidas geográficamente lo cual representa una gran barrera para el flujo de genes. Sin embargo, otras poblaciones se encontraban separadas por barreras geográficas y aun así compartían haplotipos lo cual se lo han atribuido a un transporte pasivo a través de las aves acuáticas. Los autores recomendaron los análisis de estructura genética para comprender mejor la situación de la especie.

Para los moluscos dulceacuícolas del Oeste de EUA se ha considerado que respondieron a eventos de vicarianza relacionados con el Terciario tardío (1.6 millones de años) basándose en la evidencia de su distribución y su poca capacidad de dispersión. Liu y Hershler (2007) examinaron la filogeografía de una especie de caracol ampliamente distribuida en el Oeste (*Pyrgulopsis wongi*) para evaluar la relativa importancia de la vicarianza y la estructura genética poblacional dispersa de esta especie. Se estudiaron los genes mitocondriales COI y NDI para 143 individuos de 28 poblaciones de *P. wongi* abarcando la mayoría del territorio de la cuenca (California y Nevada). La variación de los alelos fue estudiada usando AMOVA y resultando un valor de $F_{st} = 0.96$ para COI el cual sugiere una estructura poblacional muy alta. La migración entre las poblaciones se estimó por coalescencia (MDIV) el cual presentó valores muy bajos de migrantes por generación donde solamente una de las poblaciones superó los dos migrantes por generación (2.8-3.8) El tiempo de divergencia se estimó mediante un reloj molecular calibrado estimando un tiempo de divergencia de 0.274-0.069 Ma (Pleistoceno medio-tardío).

Liu y Hershler (2012) realizaron el primer estudio genético del caracol de manantial caliente (*Pyrgulopsis bruneauensis*), el cual se distribuye en el Río Bruneau en el Suroeste de Idaho. Para este estudio se obtuvieron las secuencias del gen COI de 51 especímenes distribuidos en seis sitios, obteniendo 11 haplotipos divididos en dos subgrupos. La diversidad haplotípica varió de 0.2857-0.9111 y la variabilidad nucleotídica fue menor de 0.01. El análisis AMOVA reveló un F_{st} de 0.2707 el cual sugiere un grado de estructura genética alto. Si se considera la traslocación de individuos de un área a otra como plan de recuperación de la especie, esta debe de estar muy bien estudiada para elegir el mejor recurso de variabilidad genética. Fuentealba et al. (2010) analizaron al bivalvo dulceacuícola *Diplodon chilensis* en tres sistemas lénticos de Chile, de los cuales se colectaron 60 especímenes por localidad. Mediante el análisis AMOVA se obtuvo un F_{st} de 0.027 el cual es muy bajo lo cual sugiere que no hay estructura genética entre las tres localidades. Se atribuye una posible dispersión pasiva por medio de peces, aves y humanos los cuales evitan su aislamiento.

Por otra parte, Wada et al. (2012) estimaron la tasa de supervivencia del caracol *Tornatellides boeningi* el cual es capaz de sobrevivir después de ser ingerido y pasar por el tracto digestivo de algunas aves de la isla Hahajima en Japón. Al realizar el experimento de supervivencia se obtuvo que el 15% de los caracoles que fueron depredados por las aves, sobrevivieron aún después de ser evacuados del organismo. Se analizaron las secuencias de ADN del gen 16S para 278 individuos distribuidos en 27 sitios en la isla. Se detectaron 72 haplotipos y a través del análisis AMOVA se obtuvo un F_{st} de 0.220, lo cual indica una significativa heterogeneidad y la prueba de Mantel ($r = 0.006$; $P = 0.46$) indicó que no hay evidencia de aislamiento por distancia geográfica. Los resultados sugieren que las aves representan una vía de dispersión la cual juega un rol importante en su estructura poblacional.

El único estudio de estructura genética en México similar a nuestro trabajo, es el realizado por Moline et al. (2004), en el cual se estudió la estructura genética de *Nymphophilus minckleyi*, especie endémica de ojos de agua dulce en Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Los autores analizaron las sub-poblaciones de 14 sitios de la cuenca para probar la hipótesis de que la distribución de la diversidad genética de los individuos estará determinada por la separación de los ojos de agua, que ocupan siete cauces hidrológicos distintos. Para evaluar la variación genética de las poblaciones se utilizó la técnica de

electroforesis de proteínas en gel de almidón y se calculó un Índice de Fijación (*Fst*) de 0.111 el cual determinó un número de 1.4 migrantes por generación entre las subpoblaciones. Lo anterior significa un grado moderado de estructura genética entre las subpoblaciones pero al determinar los migrantes por generación entre los diferentes afluentes (8.1) nos indica que la mayoría de la diversidad genética no se encuentra entre los afluentes, se encuentra entre las poblaciones. Este tipo de trabajo puede ser usado para revelar las conexiones hidrológicas y para identificar genéticamente las poblaciones únicas. Aunque este trabajo no utiliza COI es importante para el presente estudio debido a que son escasos los estudios de estructura poblacional de caracoles dulceacuícolas en México.

A pesar de que antes de la extirpación de los caracoles de manantial de la localidad tipo en Arizona (entre 2001 y 2002) fueron colectados suficientes ejemplares por Bill Radke (SBNWR) y entregados a Carla Hurt de la Universidad Estatal de Arizona (ASU) para desarrollar un análisis genético del género *Pyrgulopsis* de la cuenca baja del Río Colorado y que Hurt (2004) examinó la distribución geográfica de la variación genética de COI dentro y entre las poblaciones de caracoles de manantial del género *Pyrgulopsis* presentes en la cuenca baja del Río Colorado, los estudios genéticos del caracol de manantial de San Bernardino de sus poblaciones en México son muy limitados y para nuestro conocimiento, no se ha evaluado la relación genética entre ellas (Varela-Romero y Myers, 2010). Se colectaron 30 individuos de cada uno de los 37 sitios de muestreo presentes en Utah, Arizona y Nuevo México y se detectaron un total de 137 haplotipos y fueron 66 únicos. Mediante el análisis AMOVA obtuvieron un *Fst* entre las poblaciones y dentro de las especies de 0.963 y 0.875 respectivamente. El 80.57% de la variación genética se encontró entre las especies, el 15.73% se encontró entre las poblaciones dentro de las especies y el 3.70% restante se atribuye a la variación dentro de las poblaciones. Estos resultados son evidencia del alto grado de estructura genética presente y demuestran que los caracoles de manantial son un organismo modelo ideal para el estudio de estructura poblacional y especiación. Según este trabajo, los ejemplares de *P. bernardina* de la localidad de Snail Spring, presentó los valores más altos de diversidad nucleotídica (0.0187) de todas las especies de caracoles analizadas para la cuenca y se pudieron detectar tres haplotipos diferentes con una gran distancia genética aún cuando habitan en una sola población. Estos haplotipos resultaron ser parafiléticos según el análisis de

Máxima Parsimonia por lo cual una explicación alternativa a lo anterior es que ocurrió un evento de mezcla de poblaciones en este sitio. Estas secuencias obtenidas fueron depositadas dentro del GenBank.

Martínez (2009) hace un estudio para estimar el tamaño de la población del caracol *Pyrgulopsis trivialis* el cual también está propuesto como especie en peligro al igual que *P. bernardina*. Antes de este estudio no se encontraban trabajos sobre la densidad de la población de este organismo ya que estudios de este tipo en caracoles de manantial son muy escasos y aún más en una especie endémica y amenazada. Sus análisis estadísticos demostraron una densidad de 584 ± 185 individuos por m^2 para un área de $231 m^2$. Este tipo de aproximaciones puede proveer cálculos confiables y repetibles para estimar el tamaño de las poblaciones de *P. trivialis* y otros hidróbidos con condiciones similares.

En otro estudio similar, Martínez y Thome (2006) midieron las variables del hábitat, ocurrencia y densidad de caracoles de manantial *Pyrgulopsis morrisoni* en ojos de agua del centro de Arizona durante la primavera y el verano del 2001. Se realizaron análisis estadísticos los cuales dieron una densidad de 690 ± 137 individuos por m^2 . La alta densidad del caracol estuvo asociada con el sustrato de grava y gravilla, bajos niveles de oxígeno y baja conductividad. Su presencia estuvo además asociada con agua superficial poco profunda. Se cree que la velocidad del agua también está asociada a la deposición de materiales y otras variables físico-químicas. Este estudio significó el primer esfuerzo empírico para definir el hábitat de este caracol de manantial y sirvió para evaluar un hábitat relativamente adecuado para esta especie. Los autores mencionan que la mejor forma de manejar esta especie es dejando el hábitat en su estado natural.

El caracol de manantial de San Bernardino se encuentra catalogado como especie en amenaza de extinción por el gobierno federal de Estados Unidos, por lo tanto es necesario que se realicen estudios acerca de las condiciones que este necesita para su conservación. Malcom et al. (2005) analizaron el hábitat de *P. bernardina* en el rancho John Slaughter en el condado de Cochise, Arizona, en donde se estudiaron cinco ojos de agua naturales y artificiales. Ahí examinaron los requerimientos del hábitat de *P. bernardina* para determinar las relaciones entre su abundancia y las variables que presenta el ambiente, las preferencias de su microhábitat y otros aspectos de su historia natural en los ojos de agua, la cual fue la última

localidad conocida. Se definieron 14 modelos utilizando ocho variables para explicar la abundancia de *P. bernardina*. Las densidades resultaron positivas asociadas al sustrato arenoso, vegetación densa, flujo de agua y oxígeno disuelto, temperaturas del agua entre 14 y 22°C y a un pH entre 7.5 y 8. Las densidades fueron negativas asociadas con sustratos orgánicos, aguas profundas y alta conductancia.

En cuanto a la situación del caracol de manantial de San Bernardino en México, es muy escasa la información ya que sólo se tienen algunos registros de Sonora pero nunca se ha hecho un estudio formal. Naranjo-García (2003) realizó una revisión bibliográfica de 55 referencias citadas desde 1870 hasta 1999, en la cual trata de reunir las investigaciones acerca de los moluscos dulceacuícolas de México a lo largo de 129 años. Menciona estudios de ecología, biogeografía, comportamiento y biología, sin embargo no se mencionan trabajos sobre su diversidad genética, pero sí sobre su taxonomía a través de la morfología comparada. En México, el estudio de los moluscos dulceacuícolas ha sido muy reducido lo cual se le puede atribuir a que es considerado como un grupo difícil de estudiar, debido a que se han definido especies a partir de la descripción de la concha, la cual muestra una gran variabilidad dificultando su estudio. Concluyó que grandes áreas de México se mantienen sin explorar e ignoramos el estado de muchas especies sin describir, como es el caso del género *Pyrgulopsis* el cual no es mencionado dentro de este estudio.

En el capítulo de moluscos terrestres (Mead et al., 2010) del libro Diversidad Biológica de Sonora, se hace una revisión bibliográfica de los trabajos que más contribuyeron al conocimiento de la malacofauna sonorensis. En este trabajo se determinaron que se conocen 59 especies de moluscos que habitan el territorio Sonorense de las cuales algunas han sido bien estudiadas taxonómicamente mientras que otras, como el caso de los micromoluscos se necesita una extensa revisión ya que son pocos los registros que se tienen de ese grupo. Aún no se conoce que tan compleja y rica es la malacofauna de Sonora ya que son pocos los trabajos sobre este grupo en el estado. El único trabajo de micromoluscos que se ha realizado es el de Naranjo-García (1991) en el cual no hace mención sobre el género *Pyrgulopsis*.

Se han realizado esfuerzos por parte del AGFD y el USFWS para proteger esta especie y ya se han hecho varios reportes por estas dependencias de gobierno de EUA en las cuales explican la situación de esta especie y en 2011 es propuesta formalmente para colocarla en

alguna categoría de protección especial. Un año más tarde, en Abril de 2012 se logra incluir en la ley de especies en peligro (Endangered Species Act). Hasta el momento se sabe que este caracol habita en México también (USFWS, 2012) pero aún se requiere realizar estudios de estructura genética poblacional para corroborar que tan relacionadas están estas poblaciones y así poder tomar decisiones en cuanto al manejo de esta especie en ambos países.

Varela-Romero et al. (2013) desarrollan el único estudio filogenético a través de un fragmento del gen COI para los individuos de *P. bernardina* presente en Sonora utilizando los sitios con presencia del género *Pyrgulopsis* en la cuenca del Río San Bernardino (en dos vertientes, Arroyo Cajón Bonito y Arroyo San Bernardino). Encontraron que todas las poblaciones son monofiléticas y pertenecen a la especie *bernardina*. Adicionalmente encontraron diferencias entre los haplotipos del Arroyo Cajón Bonito y los del Arroyo San Bernardino y recomiendan al gobierno de los Estados Unidos realizar un estudio de la estructura genética de estos organismos que habitan Sonora.

III. JUSTIFICACIÓN

Debido a sus requerimientos biológicos y ecológicos, la especie *Pyrgulopsis bernardina* es muy sensible a ligeros cambios ambientales, lo cual la hace un buen indicador del estado de salud del ecosistema pero también muy susceptible a su extinción. En Arizona, gran parte de la población de estos caracoles se ha perdido debido a la degradación de su hábitat por lo cual ha surgido la preocupación por identificar las poblaciones de esta especie, determinar su estructura genética y si hay flujo de genes entre ellas. El conocimiento de la estructura poblacional por medio de estudios genéticos es una herramienta muy útil y necesaria para el manejo de poblaciones silvestres. Este conocimiento nos permitirá corroborar si las distintas poblaciones presentan un flujo de genes entre ellas, lo cual nos proporcionará una herramienta para el diseño de los planes de acción que tenemos que tomar para su conservación. Al saber que tan relacionadas están las diferentes poblaciones con respecto a la población original y así se podrán manejar los recursos de ambos países con mayor certeza.

Este trabajo aportará información acerca de la estructura genética de *P. bernardina*, la cual servirá para diferenciar las poblaciones del Noreste de Sonora. Al generar más datos sobre la diversidad genética de la especie nos facilita su interpretación ecológica y evolutiva.

Los resultados de este trabajo se podrán comparar con otros trabajos relacionados y servirá como referencia para la solución de problemáticas similares tanto de caracoles de manantial como de otros moluscos. También al describir bien la situación genética de la especie se puede tener mejores argumentos para recibir apoyo financiero para su conservación por parte de diferentes instancias gubernamentales, tanto nacionales como del extranjero.

IV. HIPÓTESIS

El caracol de manantial de San Bernardino en Sonora (*Pyrgulopsis bernardina*) se encuentra en diferentes sitios aislados entre sí por barreras geográficas, por lo cual está representado en la cuenca del Río San Bernardino por más de una población y se evidencian por medio de la variación en la secuencia del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI).

V.OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Determinar la estructura genética del caracol de manantial de San Bernardino *Pyrgulopsis bernardina* en la cuenca del Río San Bernardino, basados en la variación del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI).

V.2. Objetivos Específicos

Describir la diversidad genética de la especie *P. bernardina* en la cuenca del Río San Bernardino, Sonora.

Establecer el grado de estructura genética dentro y entre las poblaciones de *P. bernardina* en la cuenca del Río San Bernardino basados en la variación del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI).

Proponer medidas de conservación de las poblaciones de *P. bernardina* en la cuenca del Río San Bernardino, Sonora.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Área de Estudio

El Río Yaqui es el sexto de mayor tamaño en el Noroeste de México, esto es debido a que su cuenca drena un área de 73,000 km² entre los 34° N y 32° N de latitud en los estados de Sonora y Chihuahua, además del extremo Sureste de Arizona (Hudson et al., 2005). Los ríos principales de la cuenca son los Ríos Yaqui, Bavispe, Papigochic, Sirupa, Aros, Mulatos, Moctezuma y Nacozari. La mayor parte de los escurrimientos de la cuenca en la zona de mayor elevación provienen de su territorio en el estado de Chihuahua (Hudson et al., 2005). La cuenca del Río Yaqui está formada por cuatro subcuencas, la subcuenca del Río Bavispe, la subcuenca de los Ríos Papigochic, Sirupa y Aros, la subcuenca de los Ríos Nacozari y Moctezuma y la subcuenca del Bajo Río Yaqui. Las dos primeras son las subcuencas principales que cubren más de la mitad de su territorio. La subcuenca de los Ríos Papigochic, Sirupa y Aros nace en el estado de Chihuahua y se une al Río Bavispe en Sonora para formar el canal principal de la cuenca conocido como Río Yaqui. La segunda subcuenca principal es la subcuenca del Río Bavispe, la cual nace en el estado de Chihuahua y hace un giro amplio, justo en la frontera internacional con Arizona (Figura 3), añadiéndose al sistema de flujo del Río San Bernardino que deriva del sistema de Arizona (Hudson et al., 2005).

El Río San Bernardino comienza en el extremo Sureste de Arizona y cruza a Sonora y tiene dos arroyos tributarios importantes, el Río Agua Prieta y el Arroyo Cajón Bonito. El Río Agua Prieta está próximo al Río San Bernardino y se unen poco después de cruzar la frontera internacional. El Arroyo Cajón Bonito nace en la parte Noreste de Sonora y se une al Río San Bernardino en el Valle de San Bernardino después de drenar el agua de la Sierra San Luis. El Río San Bernardino se une al Río Bavispe en el poblado Morelos, Sonora y continúa hacia el Sur para unirse al Río Yaqui el cual eventualmente desemboca al Estero Los Algodones en el Golfo de California (DeBano et al., 1994). Las temperaturas medias mensuales oscilan entre

los 7° C en Enero a 26.6° C en Julio con un promedio anual de 17° C. La temporada de lluvias es en los meses de Julio y Agosto con una precipitación media mensual de 82.2 y 79.8 respectivamente. Su precipitación media anual es de 381.8 mm³ según el Servicio Meteorológico Nacional (SMN, 2012).

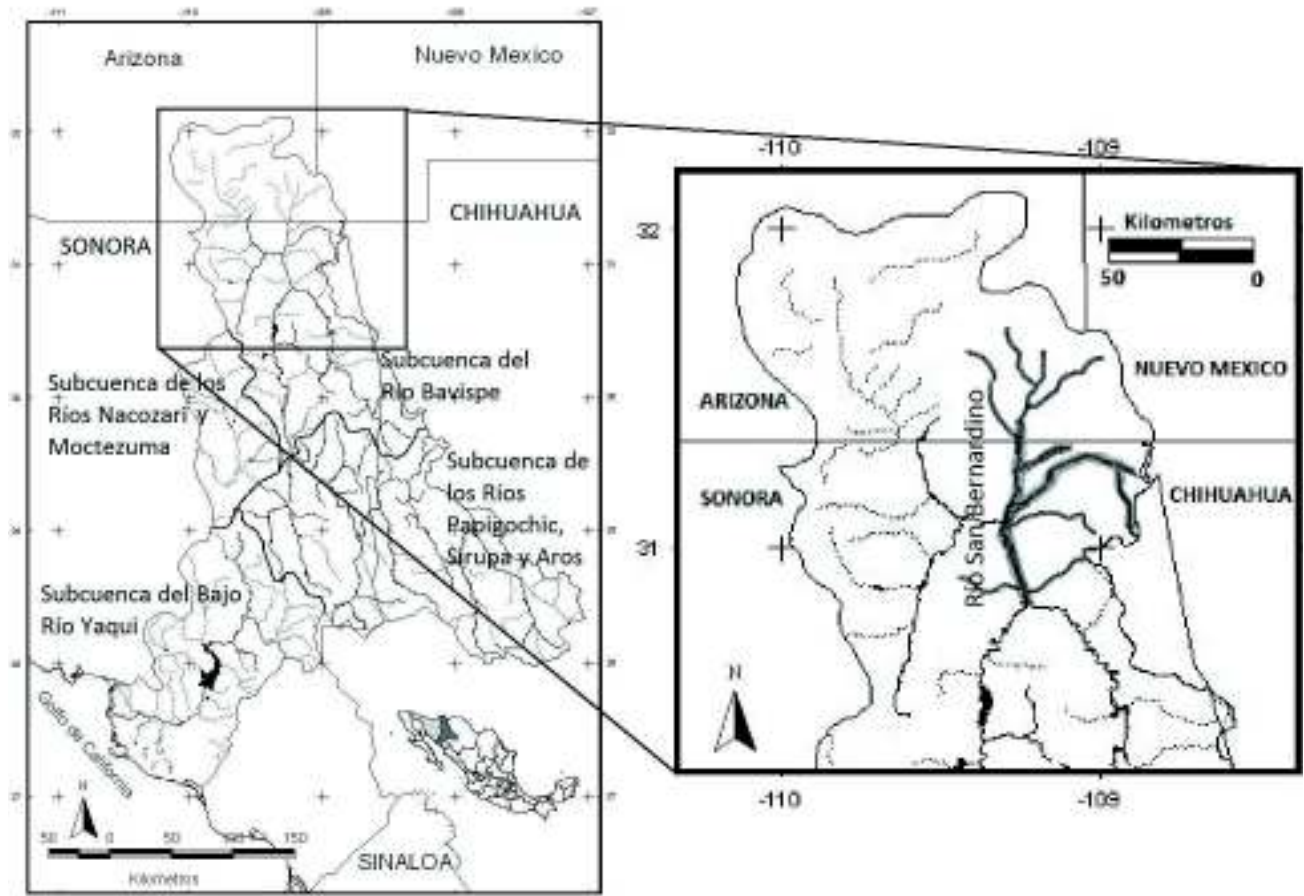


Figura 3: Localización general de la subcuenca del Río San Bernardino en el Noreste de Sonora y Sureste de Arizona.

Los sitios de muestreo consisten en una serie de ojos de agua presentes en el sistema hidrológico de la cuenca del Río San Bernardino los cuales presentan micro hábitats ideales para esta especie (Figura 4). Para fines del presente estudio se seleccionaron tres sitios donde se ha documentado este Caracol de Manantial los cuales para un manejo más fácil se

denominaron como El Chorro (EC), Agua Fría (AF) y Ojo Caliente (OC). El sitio de El Chorro se encuentra en la subcuenca del Arroyo San Bernardino y los sitios Ojo Caliente y Agua Fría se encuentran en la subcuenca del Arroyo Cajón Bonito.

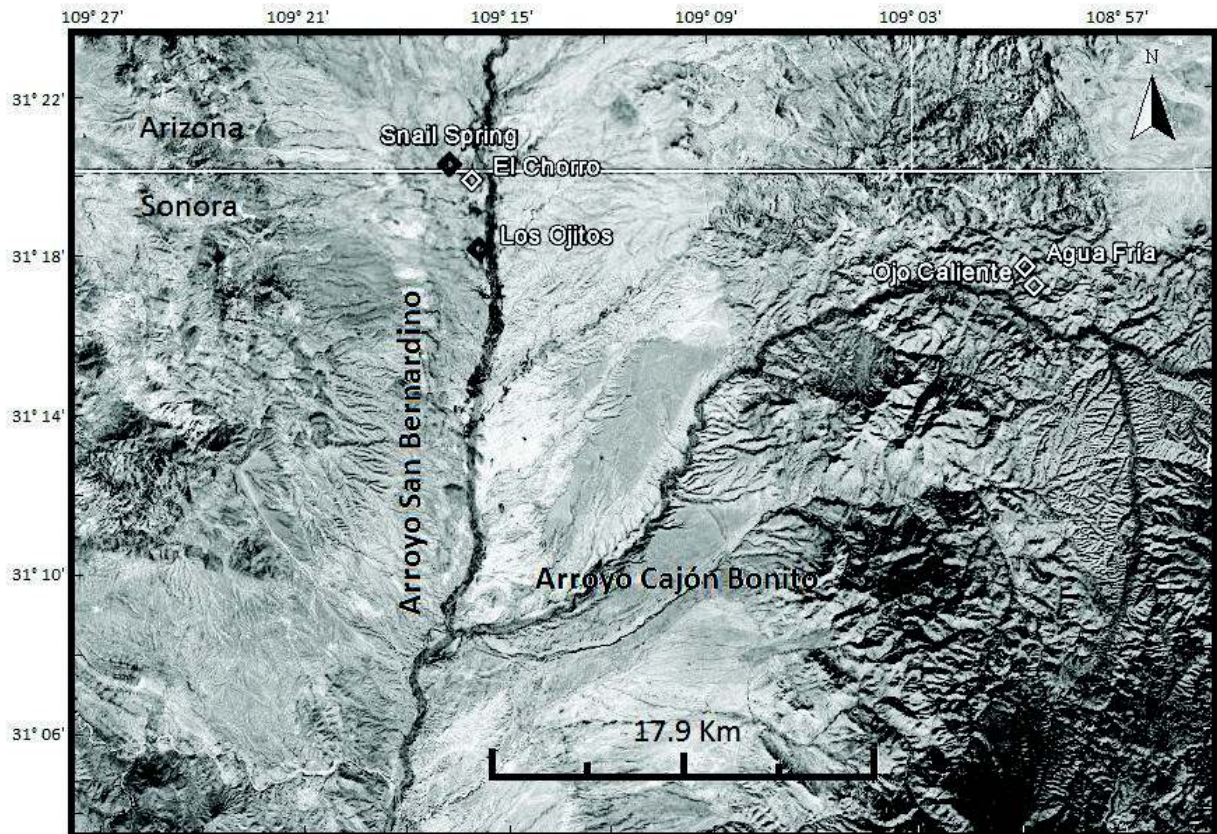


Figura 4. Subcuenca del Río San Bernardino en Sonora y Arizona. Los rombos blancos indican las localidades muestreadas en este estudio. Los rombos negros indican las otras dos localidades conocidas. Fuente: Mapa tomado del Google Earth.

VI.1.1. Ojo El Chorro

Ojo El Chorro está aproximadamente a 1.25 km río abajo de la localidad tipo en Arizona (Snail Spring). Aparentemente, el agua de este lugar alimenta directamente al Arroyo San Bernardino que fluye a 1.5 km río abajo del Ojo El Chorro, aunque el flujo está ahora retenido

en una serie de barreras artificiales. El flujo superficial de agua entre Arizona y Ojo El Chorro esta interrumpida por una barrera que ha creado un pequeño pantano en el Manantial El Chorro (Varela-Romero y Myers, 2010).

El exceso de agua en el Ojo El Chorro es desviado a otro embalse artificial río arriba. El flujo de salida del Ojo El Chorro creó un pequeño espacio (de uno a dos metros) de arena y grava limpia con poca profundidad dentro de la densa vegetación dominada por totora *Scirpus olneyi* (González-Elizondo et al., 2008) la cual cubre la mayora parte de la Ciénega de San Bernardino (Minckley y Brunelle, 2007). La temperatura del agua en el ojo de agua está alrededor de 22° C en verano (Varela-Romero y Myers, 2010).

VI.1.2. Ojo Agua Fría

El Ojo Agua Fría es tributario del Arroyo Cajón Bonito y se encuentra al Noreste del cauce principal. El sitio está dominado por pastos, ciperáceas y un dosel de árboles de táscate (*Juniperus* sp.) que sombrean los ojos de agua. La temperatura del agua de este sitio se encuentra alrededor de los 23° C en verano (Varela-Romero y Myers, 2010).

VI.1.3.Ojo Caliente

El sitio de Ojo Caliente es el tributario del Arroyo Cajón Bonito inmediatamente al Sur del Ojo Agua Fría y está compuesto por varios ojos de agua, donde algunos son influenciados por aguas termales, los cuales se unen al Arroyo Ojo Caliente que desemboca en el Arroyo Cajón Bonito. Este sitio cuenta con un sedimento oscuro entre la vegetación de ciperáceas y diez metros río abajo también se localizó un sustrato orgánico en un pequeño ojo de agua caliente bajo la sombra del dosel de los arboles. La temperatura del agua en este sitio es de 28° C en verano (Varela-Romero y Myers 2010).

VI.2. Recolecta de Ejemplares

Para determinar las localidades de muestreo se contactó a personas relacionadas con estos caracoles para determinar posibles lugares donde habita *Pyrgulopsis bernardina* y se buscaron registros en museos, de literatura y reportes. Se visitaron tres sitios de muestreo dentro de dos arroyos tributarios al Río San Bernardino, del 28 al 30 de Mayo de 2010 y del 23 al 25 de junio de 2010 para obtener las muestras. Se utilizaron las mismas salidas de campo que las realizadas por Varela-Romero y Myers (2010) para la recolecta de ejemplares.

Los especímenes se detectaron por inspección visual y fueron colectados manualmente. En cada sitio se buscaron estos caracoles en diferentes microhábitats, adheridos al sustrato rocoso, plantas o en materia orgánica. Además, para cada sitio se identificó a los caracoles del género *Pyrgulopsis* según sus características morfológicas y se colectaron 30 especímenes de diferentes tallas. Todos los especímenes fueron colocados en pequeños contenedores con etanol absoluto, etiquetados con la localidad y fecha, enumerados y depositados en una hielera para su preservación y transporte al laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora.

VI.3. Extracción y Análisis de ADN

El ADN total se obtuvo a partir de tejido del espécimen completo, eliminando la concha con unas pinzas finas y triturando el ejemplar en un microtubo. Después el tejido fue digerido con proteinasa K para obtener el ADN que es precipitado con etanol de acuerdo a lo especificado en el kit QIAamp DNA Mini Kit de la compañía QIAGEN. Se determinó la concentración y pureza del ADN por medio de un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 a absorbancias de 260 y 280 nm. La integridad del ADN se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

VI.3.1. Amplificación del gen mitocondrial COI

Para el análisis de PCR se estandarizaron los métodos en el laboratorio de Ecología Molecular del DICTUS siguiendo las recomendaciones de Avise (1994). Se buscó obtener un número

mínimo de 30 organismos por cada sitio muestreado y mediante el uso de PCR se amplificó la región de gen Citocromo Oxidasa I del ADN mitocondrial utilizando los oligonucleótidos: FW-LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' y RV-HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'. Estos oligonucleótidos fueron diseñados por Folmer et al. (1994).

VI.3.2. Condiciones de la PCR

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando las esferas PCR PuRe Taq Ready-to-Go (GE Healthcare). Cada esfera contiene 200 μ M de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP), 2.25 unidades de PuRe Taq ADN polimerasa, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, estabilizadores y BSA. A cada esfera se le agregaron 17.5 μ l de agua estéril milli-Q. 1.25 μ l (10 μ M) de cada oligonucleótido FW- LCO1490 y RV- HCO2198, finalmente se añadió 5 μ l de ADN del individuo para así obtener un volumen final de 25 μ l en cada tubo. Para la reacción se utilizó un termociclador BioRad DNA Engine PTC 0200, para el cual se diseñó un programa con la finalidad de amplificar el gen COI, que consta de los siguientes pasos: desnaturalización inicial 95° C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 94° C por un minuto, 40° C por un minuto, 72° C por 2 minutos y finalmente un ciclo de 7 minutos a 72° C para la extensión final. Los productos de PCR fueron almacenados a -20° C.

VI.3.3. Electroforesis de los productos de PCR

Para determinar si el producto de PCR obtenido es del tamaño esperado (600-700 pb) se tomó una muestra de 2 μ l, se llevó a cabo una electroforesis y se visualizó utilizando geles de agarosa (Sigma-Aldrich) preparados al 1 % con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). Se usó un marcador de peso molecular de 1000 pb (Invitrogen) para estimar el peso molecular de la banda obtenida. Las imágenes de los geles expuestos a luz UV fueron capturadas con la ayuda de un fotodocumentador MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging System).

VI.3.4. Secuenciación y análisis de los productos de PCR

Los productos de PCR del tamaño esperado para COI de cada uno de los individuos de *P. bernardina* fueron enviados a Macrogen, Inc. (Seúl, Corea) según las especificaciones de la compañía, para su purificación y secuenciación en ambos sentidos de la cadena de ADN. Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa Chromas Pro versión 1.41 (www.technelysium.com.au) y alineadas por medio del ClustalW (Thompson et al., 1994). Se utilizó el análisis BLAST (Altschul et al., 1990) para comparar las secuencias obtenidas con las existentes en GenBank.

VI.3.5. Análisis de secuencias

Para determinar la heterogeneidad en la distribución de las frecuencias haplotípicas entre las localidades de El Chorro, Ojo Caliente y Ojo Agua Fría se realizó una prueba de χ^2 con aleatorización de Monte Carlo con 10,000 réplicas, de acuerdo al procedimiento del programa CHI2MCS de Danzmann e Ihssen (1995). Se utilizó el programa Arlequín 3.0 para los análisis de diversidad de genes, número de loci analizados, sitios polimórficos (S), diversidad nucleotídica, frecuencia haplotípica y diversidad molecular (análisis molecular de varianza, AMOVA) (Excoffier et al., 2005). El valor obtenido del coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) en el análisis de AMOVA se probó mediante la hipótesis $F_{st} = 0$ usando la fórmula $\chi^2 = 2NF_{st}(k-1)$, con g.l. = $(k-1)(s-1)$, en donde “ k ” es el número de alelos diferentes, N el número de organismos y “ s ” el número de muestras (Workman y Niswander, 1970). Además, se estimó el número de migrantes por generación de acuerdo a la fórmula $N_e m = (F_{st}^{-1} - 1)/2$ (Hartl, 1988).

VI. RESULTADOS

De los tres muestreos realizados se recolectaron 90 ejemplares del caracol de manantial de San Bernardino (*Pyrgulopsis bernardina*) de los ojos de agua El Chorro, Agua Fría y Ojo Caliente los cuales representaron las tres localidades estudiadas (Tabla 1).

De las 90 muestras colectadas se generaron un total de 90 secuencias del gen COI cuya longitud varió entre los 598 y 599 pares de bases. En una comparación mediante un análisis BLAST del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I para la especie *P. bernardina* reportada en GenBank (Número de acceso AY_627951.1), se detectó una identidad del 98% en comparación con una de nuestras muestras seleccionada al azar. Se realizó un análisis BLAST de los haplotipos obtenidos en el presente estudio y los haplotipos del trabajo de Hurt (2004) presentes en GenBank y se obtuvo que una homología entre el 95 y 100% entre estas localidades para los haplotipos de El Chorro de los cuales dos de estos fueron los que reporta Hurt (2004) y los otros cuatro son haplotipos nuevos.

El análisis de los datos obtenidos de las distribuciones de las frecuencias haplotípicas del gen mitocondrial COI para los individuos agrupados por las localidades de El Chorro, Agua Fría, y Ojo Caliente, se encontraron un total de 21 haplotipos de los cuales sólo uno (haplotipo 2) está presente en más de una localidad, El Chorro y Agua Fría. El resto de los haplotipos no estuvieron presentes en más de una localidad (Tabla II).

En el análisis de la heterogeneidad en la distribución de las frecuencias haplotípicas de acuerdo una prueba de χ^2 con aleatorización Monte Carlo se encontraron diferencias en su distribución entre todas las localidades. Los 20 haplotipos restantes fueron exclusivos para sus respectivas localidades: seis haplotipos únicos para la localidad El Chorro (2, 7, 8, 9, 10, 11). Para la localidad Agua Fría se registraron ocho haplotipos únicos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 20, 21) y por último se registraron ocho haplotipos únicos (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19) para la localidad Ojo Caliente (Tabla II).

Tabla I. Relación de localidades de recolecta de *Pyrgulopsis bernardina* en la cuenca alta del Río San Bernardino y número total de secuencias de ADN mitocondrial obtenidas.

Localidad	Fecha de Recolecta	Coordenadas geográficas	Números de Organismos	Secuencias obtenidas
El Chorro (EC)				
Arroyo San Bernardino, manantial El Chorro, Rancho San Bernardino	28 de Mayo de 2010	31 19,8 N 109 16,0 W	30	30
Agua Fría (AF)				
Arroyo Cajón Bonito, Arroyo Agua Fría, del lado Este del arroyo, Rancho Cajón Bonito.	23 de Junio de 2010	31 17,550 N 108 59,675 W	30	30
Ojo Caliente (OC)				
Arroyo Cajón Bonito, Arroyo Ojo Caliente, al Noroeste de la cabaña, Rancho Cajón Bonito	24 de Junio de 2010	31 17,064 N 108 59,404 W	30	30
Total			90	90

Tabla II. Frecuencia absoluta de los haplotipos del gen COI obtenidos mediante secuenciación en individuos de *Pyrgulopsis bernardina* en la cuenca alta del Río San Bernardino.

Haplotipo	El Chorro (EC)	Agua Fría (AF)	Ojo Caliente (OC)
1		1	
2	1	1	
3		16	
4		1	
5		2	
6		7	
7	1		
8	20		
9	5		
10	2		
11	1		
12			2
13			2
14			1
15			3
16			19
17			1
18			1
19			1
20		1	
21		1	
TOTAL	30	30	30

El análisis de las secuencias obtenidas demuestra que los caracoles de manantial de San Bernardino pertenecientes a la localidad El Chorro presento un valor de diversidad genética de 0.5379 ± 0.0985 , en la localidad Agua Fría presento un valor de 0.6736 ± 0.0780 , por último la localidad Ojo Caliente presento una valor de 0.5954 ± 0.1015 . El valor promedio del total de las tres localidades fue de 0.6023 ± 0.0926 . Los valores de diversidad nucleotídica son de 0.026320 ± 0.013444 para El Chorro, 0.002034 ± 0.001482 para Agua Fría y 0.002828 ± 0.001894 para Ojo Caliente (Figura 5). Estos valores muestran un promedio de 0.010394 ± 0.005606 para el total de las localidades.

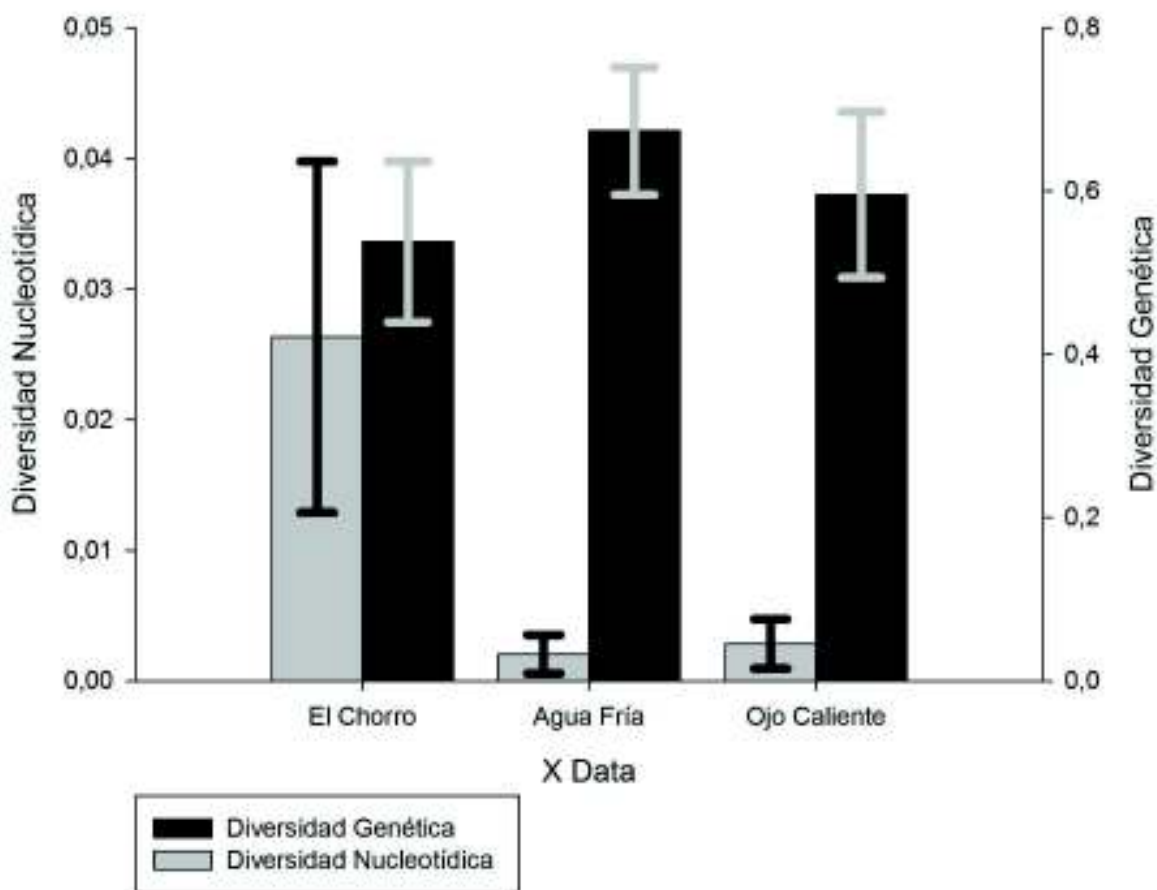


Figura 5. Comparación de la diversidad genética y la diversidad nucleotídica (\pm desviación estándar) en *Pyrgulopsis bernardina* de tres localidades de la cuenca alta del Río San Bernardino.

En el análisis de secuencias para obtener la diversidad molecular se observaron 599 loci para todas las secuencias. Así, tenemos que se obtuvieron 70 loci polimórficos para la localidad El Chorro, para la localidad Agua Fría se obtuvieron 11 y por último la localidad Ojo Caliente con 11 sitios polimórficos (Tabla III).

Tabla III. Índices de diversidad molecular de las tres localidades de estudio de *Pyrgulopsis bernardina* en la cuenca alta del Río San Bernardino.

	No. Copias de genes	No. de Haplotipos	No. de loci	No. Loci utilizados	No. de sitios polimórficos
EL Chorro	30	6	599	599	70
Agua Fría	30	8	599	599	11
Ojo Caliente	30	8	599	599	11

Para determinar la estructura genética se realizó un análisis AMOVA que indicó que el 60.25% de la varianza molecular total ocurre dentro de las poblaciones, mientras que el 39.75% se presenta entre las poblaciones. El valor de $F_{st} = 0.39748$ representa un nivel de diferenciación muy alto entre las tres poblaciones analizadas (Tabla IV). También se estimó el F_{st} entre las localidades y presentaron valores altos, muy similares al valor de F_{st} general. Así, entre El Chorro y Agua Fría se observó un $F_{st} = 0.39358$, para El Chorro y Ojo Caliente un $F_{st} = 0.43333$ y para Agua Fría y Ojo Caliente un $F_{st} = 0.36552$ (Tabla V). El número de migrantes por generación tomando en cuenta el F_{st} obtenido para todas las poblaciones (Tabla IV) fue de 0.75, lo que sugiere un número muy reducido de migrantes por generación entre todas las poblaciones estudiadas. De acuerdo a los F_{st} que se muestran en la Tabla V, el número de migrantes por generación entre El Chorro y Agua Fría fue de 0.77, entre El Chorro y Ojo Caliente fue de 0.65 y finalmente entre Ojo Caliente y Agua Fría fue de 0.86, que concuerda con el valor bajo de migrantes detectado para todas las poblaciones estudiadas.

Tabla IV. Análisis Molecular de varianza (AMOVA) de las tres localidades de muestreo. g.l. = grados de libertad. F_{st} = índice de fijación.

Origen de la variación	g. l.	Suma de Cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de Varianza
Entre poblaciones	2	12.522	0.19867	39.75
Dentro de poblaciones	87	26.200	0.30115	60.25
Total	89	38.722	0.49981	

$F_{st} = 0.39748$

Tabla V. Valores de F_{st} (Índice de Fijación) entre las distintas localidades de muestreo.

	El Chorro	Agua Fría	Ojo Caliente
El Chorro	0.0		
Agua Fría	0.39358	0.0	
Ojo Caliente	0.43333	0.36552	0.0

VII. DISCUSIÓN

El conocimiento acerca de los moluscos dulceacuícolas de México es más reducido en comparación a otros grupos de moluscos, tal vez porque se considera un grupo difícil de estudiar ya que se definieron numerosas especies basándose en la descripción de la concha, la cual es muy variable dependiendo de las condiciones ambientales, lo que dificulta su estudio (Naranjo-García, 2003). Se desconoce a la mayoría de las especies de moluscos dulceacuícolas que habitan en gran parte del territorio mexicano y posiblemente nunca conoceremos las especies que se están extinguiendo constantemente por la contaminación química y biológica del agua (Naranjo-García, 2003). A pesar de la existencia de algunos estudios sobre miembros de la familia Hydrobiidae en nuestro país, son muy pocos los trabajos que mencionan la presencia del género *Pyrgulopsis* en Sonora y aún menos los trabajos sobre su variabilidad genética y estructura poblacional. Malcom et al. (2005) menciona por primera vez la presencia de *Pyrgulopsis bernardina* en México y describe las condiciones de los sitios donde esta especie habitaba en Arizona. Además menciona que en Sonora también se había documentado la especie en la localidad de El Chorro, lo cual resulta de gran interés debido a que es la más cercana a la localidad tipo para esta especie recientemente declarada como amenazada por el gobierno de EUA.

En nuestro país, el trabajo más similar al nuestro de acuerdo al propósito, área de estudio y organismos de interés se llevó a cabo por Moline et al. (2004) en Cuatro Ciénegas, Coahuila, donde evaluaron la diversidad genética del caracol *Nynphophilus minckleyi* y encontraron un grado moderado de estructura genética entre las sub-poblaciones, además que la mayoría de la diversidad genética se encuentra entre las poblaciones, al igual que en nuestro estudio. Igualmente en el mismo año se realizó una evaluación de la diversidad genética de los caracoles del género *Pyrgulopsis* del estado de Arizona, donde se tomaron 32 individuos y se encontraron tres haplotipos de *P. bernardina* del manantial Snail Spring (Hurt, 2004). Varela-Romero et al. (2013), identificaron las poblaciones de *Pyrgulopsis* en la cuenca del Río San

Bernardino en Sonora asignándolas a *P. bernardina*, en la cual encuentran dos sitios con caracoles de esta especie en el Arroyo San Bernardino y dos más en el Arroyo Cajón Bonito. En ese trabajo se concluyó que había diferencias entre los sitios muestreados pero que todos los organismos eran considerados como un grupo monofilético. La población ubicada en la localidad El Chorro supone un gran interés debido a que es la más cercana a la localidad tipo en Arizona (Snail Spring) y a que la especie en Estados Unidos se ha declarado recientemente como amenazada, por lo cual era urgente conocer la situación genética de las poblaciones en Sonora.

Los análisis de variabilidad genética del presente trabajo muestran que, el sitio de El Chorro obtuvo el valor más alto de diversidad nucleotídica de los tres con 0.0282 difiriendo del valor de diversidad nucleotídica reportado por Hurt (2004) de 0.0187 para la localidad tipo (Snail Spring) en Arizona. Esto puede ser debido a que el sitio de El Chorro se encuentra dentro del mismo cauce río abajo de la localidad tipo y es probable que exista flujo genético entre estas localidades, como en la temporada de lluvias cuando las corrientes de agua de estos arroyos son más intensas haciendo posible así el transporte pasivo de estos caracoles por medio de estas corrientes. Además es importante hacer notar que las tomas de muestras entre estos estudios son de casi diez años de diferencia y desafortunadamente en la actualidad no hay caracoles en Snail Spring para realizar comparaciones actuales. En Arizona solamente se encuentran caracoles de manantial de San Bernardino en Goat Spring el cual es un pequeño estanque artificial donde esta especie ha logrado sobrevivir.

En la localidad de El Chorro se encontraron los seis haplotipos, dos de las cuales reporta Hurt (2004) para la localidad de Snail Spring y para los cuales encontró una gran distancia genética entre sí que atribuye a un evento de mezcla de poblaciones, aumentando así en gran medida la diversidad nucleotídica de esa población. Además de estos dos haplotipos, también encontramos cuatro haplotipos adicionales en nuestro estudio que no se habían reportado anteriormente, los cuales contribuyeron a que El Chorro presentara una mayor diversidad nucleotídica que Snail Spring.

Para el caso de la distribución de las frecuencias haplotípicas, sólo el haplotipo 2 está presente en dos localidades (Agua Fría y El Chorro) de las tres estudiadas, es decir, sólo dos individuos de 90 compartieron este haplotipo. La presencia de este haplotipo compartido en

estas localidades es un caso raro y no se detectó más de un ejemplar en alguna de las dos localidades donde se encontró este haplotipo. Ya que los tres sitios están en afluentes diferentes, la distancia, las montañas y el terreno seco representan grandes barreras geográficas para la dispersión de la especie lo cual dificulta mucho la migración de individuos entre estos sitios y se puede observar en otros estudios de diversidad genética de caracoles dulceacuícolas (Hershler et al., 1999; Liu y Hershler, 2007; Hershler et al., 2005; Hershler y Liu, 2008). Este haplotipo 2 compartido sólo entre Agua Fría y El Chorro difiere del haplotipo más frecuente de cada localidad donde se presentó, es decir comparado con el haplotipo 3 de Agua Fría difiere en tres mutaciones puntuales (Transversiones) y comparado con el haplotipo 8 de El Chorro que difiere en 46 mutaciones puntuales (5 son transiciones y 41 son transversiones) lo cual nos permite pensar que esta es más relacionada con la localidad de Agua Fría. Adicionalmente al traducir estas secuencias a su expresión peptídica para observar la influencia de las mutaciones nucleotídicas en la función de la proteína, se observa que para la comparación entre este haplotipo 2 con respecto al haplotipo 3 de Agua Fría sólo se sustituyen tres aminoácidos, y al comparar esta con el haplotipo 8 de El Chorro se sustituyen cinco aminoácidos con respecto a este haplotipo compartido. Esta inferencia sugiere considerar que este haplotipo compartido se ha originado en la localidad de Agua Fría y ha sufrido un proceso de migración hacia otras localidades de la cuenca, como El Chorro.

Liu et al. (2003) demuestran que dos poblaciones de *Pyrgulopsis micrococcus* se separaron hace relativamente poco tiempo y lo atribuyen a un fenómeno de colonización de algún tipo, el cual tiene como principal hipótesis el transporte pasivo de estos organismos a través de algunas aves acuáticas. También se cree que para la especie *Tryonia porrecta* se esté presentando una dispersión pasiva por medio de las aves (Hershler et al., 2005). Este fenómeno ya había sido propuesto anteriormente por Darwin (1859), Ponder et al. (1994), Figuerola y Green (2002), por mencionar algunos. Entre los trabajos en los que se ha comprobado la dispersión de moluscos terrestres por medio de aves, está el caso de Fuentealba et al. (2010) donde comprobó la falta de estructura genética en *Diplodon chilensis* debido a la intervención del ave conocida como el zambullidor mayor (*Podiceps mayor*), una ave acuática que actuaba como medio de transporte entre las poblaciones. Russel y Monson (1998) mencionan al zambullidor orejado (*Podiceps nigricollis*) como habitante del Río San Bernardino,

posibilitando la existencia de este fenómeno de transporte. Otro caso que refuerza esta idea de migración de moluscos dulceacuícolas por medio de aves es el de la especie *Tornatellides boening* la cual sobrevive al tracto intestinal de las especies de aves *Zosterops japonicus* y *Hypsipetes amaurotis* y evita la estructuración de las poblaciones de este caracol en las Islas Ogasawara en Japón (Wada, 2012). Sin embargo, para estos sitios no se tienen registros actualizados de las aves que visitan específicamente estos manantiales dentro de la cuenca del Río San Bernardino y puedan apoyar esta teoría como una posible vía de dispersión pasiva entre las poblaciones de *P. bernardina*.

Para los haplotipos restantes, 20 fueron únicos en sus respectivas localidades lo que nos indica un alto grado de diferenciación en los haplotipos de cada localidad, lo que resulta un indicador del aislamiento reproductivo entre las poblaciones. La mayor parte de la diversidad genética de *P. bernardina* es exclusiva de cada sitio de muestreo y probablemente ésta diversidad puede reconocerse para nuevas poblaciones que se pudieran detectar en otros ojos de agua en la cuenca del Río San Bernardino debido a las barreras geográficas existentes al interior de la cuenca. En las cercanías a la localidad de El Chorro, históricamente se habían encontrado más sitios propicios para albergar poblaciones de esta especie y es además el sitio más cercano a la localidad tipo en Arizona, donde por registro de ejemplares se encontraban varios ojos de agua con poblaciones de caracoles de manantial, que han ido desapareciendo progresivamente desde hace aproximadamente diez años (Malcom et al., 2005). Este gran número de haplotipos exclusivos de cada sitio puede deberse al aislamiento reproductivo que provocan las marcadas barreras geográficas que representan un gran reto a la biología de la especie por su tipo de desplazamiento. La exclusividad de los haplotipos en cada una de las localidades representa un componente muy importante en el mantenimiento de la diversidad genética de la especie, ya que bajo la perspectiva de la genética de poblaciones, la diversidad es un factor clave en la conservación, minimizando así el riesgo de extinción (Saccheri et al., 1998) y favoreciendo el potencial evolutivo de la especie (Spielman et al., 2004). Si por el contrario, la diversidad genética se pierde también se reduce la habilidad de las poblaciones para sortear los cambios ambientales (Frankham et al., 1999).

Los valores de diversidad nucleotídica de las poblaciones AF y OC son relativamente bajas en comparación EC, lo cual nos permite pensar que estas poblaciones son el resultado de

un evento de cuello de botella genético o de efecto fundador, ya que las poblaciones que resultan de estos eventos provienen de una pequeña muestra de individuos que no es representativa de la diversidad genética original lo cual provoca bajos índices de diversidad (Mayr, 1942).

En México, son pocos los estudios sobre estructura genética de caracoles dulceacuícolas, sin embargo un estudio similar al del presente trabajo se llevó a cabo en Cuatro Ciénegas (Moline, 2004) en donde se comprobó que el caracol de manantial del desierto (*Ninphophilus minckleyi*) mediante el índice de fijación detectado ($F_{st} = 0.259$), presenta estructura poblacional moderada entre los 14 sitios muestreados. Esta zona de estudio presenta diferentes vertientes representan barreras geográficas las cuales separan los diferentes sitios de muestreo, razón por la cual existe estructura poblacional. El número de migrantes por generación para el estudio fue de 1.4 entre estos sitios lo cual no es suficiente para evitar la divergencia entre las poblaciones (Wright, 1973). Este comportamiento también se presentó en las poblaciones del caracol de manantial de nuestro estudio pero con un mayor grado de estructura poblacional. La estructura genética de las poblaciones de caracoles de manantial en el Suroeste de Estados Unidos se ha estudiado principalmente con las especies que habitan en Nuevo México, Arizona y California. Utilizado la variación del gen COI se determinó la existencia de estructura genética entre las localidades y el grado de diferenciación genética dentro de las poblaciones de una o más especies (Hurt, 2004), lo que brindó criterios para la definición de taxones de especies emparentadas (Hershler et al., 2010) y ofreció evidencia de eventos biogeográficos (Hershler et al., 1999; Hershler et al., 2005; Liu y Hershler, 2007; Hershler y Liu, 2008). Este tipo de estudios se podrían aplicar muy bien a al Norte de Sonora ya que presentan similitudes en cuanto a tipo de hábitats y de organismos.

Los altos grados de diferenciación genética en poblaciones dentro de una misma cuenca e incluso dentro de una misma vertiente se le pueden atribuir a un efecto de aislamiento parecido al que presentan las islas oceánicas, provocando que con el paso del tiempo tengan frecuencias haplotípicas distintas (Chambers, 1980). Efectivamente, en el área de estudio se observa un fuerte comportamiento de aislamiento geográfico entre los sitios muestreados (El Chorro, Agua Fría y Ojo Caliente) ya que se encuentran en vertientes diferentes (Río San Bernardino y Arroyo Cajón Bonito) lo cual hace poco probable para el organismo el

desplazamiento de un arroyo a otro, a pesar de la existencia de la propuesta de dispersión pasiva por aves (Ponder y Colgan, 2002).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que las poblaciones de esta especie tiene un grado muy alto de diferenciación genética, ya que presentó un índice de fijación de $F_{st} = 0.39748$, por lo que se sugiere que sean consideradas como poblaciones diferentes, considerando también que existe un número reducido de migrantes por generación (0.75), de acuerdo con Wright (1973). Esto es debido principalmente al reducido flujo de genes que hay entre las poblaciones de estos sitios, debido a la barrera geográfica que representa el estar habitando vertientes separadas unas de otras por varios kilómetros de distancia. En hábitats fragmentados con baja conectividad, el flujo genético entre las subpoblaciones tiende a disminuir y la deriva génica aumenta, estructurando las poblaciones de hábito sedentario (Mech y Hallet, 2001). Al analizar los valores de F_{st} entre las poblaciones obtuvimos valores semejantes todos con un índice de fijación mayor a 0.36 resultando en una muy alta diferenciación genética entre pares de poblaciones.

El análisis molecular de varianza mostró que el 60.25 % de la varianza molecular total ocurre dentro de las poblaciones, mientras que el 39.75 % se presenta entre las poblaciones. Estos datos arrojan un índice de fijación muy alto para las tres localidades de la cuenca, los cuales se comportaron de una manera similar a los estudios de Moline (2004), Liu y Hershler (2007) y Liu y Hershler (2012). Comparando los datos obtenidos de la localidad El Chorro, que se encuentra río abajo a pocos kilómetros de la localidad tipo de Estados Unidos (Snail Spring), tenemos que la localidad de Arizona presenta menor diversidad nucleotídica (0.0187) que la localidad de El Chorro en Sonora (0.026320); la identidad de los haplotipos entre estas dos localidades cercanas estuvo entre 95 y 100% y se encontró que de los haplotipos extintos de Snail Spring por Hurt (2004), dos coinciden con los haplotipos que detectamos en EL Chorro con una identidad del 100%, lo que proporciona a El Chorro como una localidad relevante por mantener haplotipos relictos de la especie y su conservación en la cuenca.

Los individuos de Snail Spring fueron recolectados en 2002 cuando la contaminación y las condiciones de sequía promovían la reducción poblacional que terminó con la eliminación de estos caracoles. La diferencia haplotípica y nucleotídica entre EL Chorro y Snail Spring puede deberse a las malas condiciones del hábitat en la localidad tipo y su progresiva

reducción de organismos, causando así la eliminación de haplotipos de baja frecuencia. A pesar de esto, se colectaron 32 individuos de la localidad tipo en Arizona justo antes de su extinción local, de los cuales se detectaron sólo 3 haplotipos. Actualmente la única población de caracol de manantial de San Bernardino existente se encuentra restringida a un estanque artificial (Goat Spring) cercano a la localidad tipo. De esta manera, cualquier esfuerzo de restauración de la ocurrencia en la distribución del territorio histórica de las poblaciones de esta especie deberá estar sustentado por estudios genéticos a nivel poblacional para describir la variación genética entre *P. bernardina* en ambos lados de la frontera.

Nuestros resultados demuestran que los caracoles de manantial de San Bernardino, *P. bernardina*, que habitan en los diferentes sitios de la cuenca del Río San Bernardino en Sonora deben ser consideradas como poblaciones diferentes. La diferenciación genética que se detectó en este estudio puede ser debido a que existe un aislamiento reproductivo entre los individuos de los sitios estudiados desde hace mucho tiempo. Los caracoles dulceacuícolas son muy propensos a tener niveles altos de diversidad genética y un bajo flujo de genes aún cuando están dentro de una misma vertiente (Chambers, 1980). La biología y ecología de la especie la cual no le permite salir de una determinada área con condiciones específicas para su establecimiento, aunado a su susceptibilidad a los cambios en su entorno, pueden ser unos de los principales factores que causen la presencia de estructura poblacional en la cuenca del Río San Bernardino en Sonora.

Como se mencionó anteriormente *P. bernardina* resulta una especie muy susceptible a ligeros cambios ambientales y debido a su restringida distribución y abundancia, está propensa a desaparecer. Varios autores mencionan para otras especies del género *Pyrgulopsis* que los cambios que han promovido la desaparición de estos caracoles nativos son en escala mayor, es decir a nivel drásticos (Dillon, 1988; O'Brien y Blinn, 1999; Mladenka y Minshall, 2001; Ponder y Colgan, 2002). Varela-Romero y Myers (2010), reportan la reducción de la abundancia de la población de *P. bernardina* del Ojo Los Ojitos, ubicado kilómetros río abajo de El Chorro, al no encontrar ni un sólo individuo en el muestreo durante el muestreo del 23 al 25 de Junio, debido quizá a las estrategias de control de la vegetación por medio de quema. El sitio aparentemente había sufrido un incendio, cubriendo con las cenizas el sitio específico

donde se encontraban los organismos lo cual sugiere que hubo un cambio en la calidad del agua requerida para que la especie se mantuviera.

La evidente estructura genética que presentan las poblaciones en Sonora es la base del diseño de estrategias de estudio, conservación y manejo de la especie en México. Los haplotipos exclusivos detectados son considerados como elementos distintivos de cada población que en conjunto contribuyen a la mayor variabilidad genética de las poblaciones en Sonora con respecto a las de Arizona.

La teoría de metapoblaciones respalda la idea de que aquellas especies con pocas subpoblaciones dentro de una población presentan una mayor probabilidad de extinción que aquellas con más subpoblaciones (Meffe y Carrol, 1994). De acuerdo con este estudio existen varias subpoblaciones de *P. bernardina* lo cual reduce el riesgo de extinción con respecto a cuándo se pensaba que sólo había una población en Arizona. Aunque la extirpación de los individuos de Estados Unidos no significará la extinción de la especie gracias a las poblaciones de Sonora, el recurso genético que representan los individuos de Arizona se perderá para siempre.

La mayor amenaza para las poblaciones mexicanas de los caracoles dulceacuícolas es la alteración del hábitat, ocasionada por la disminución del agua debido a la explotación de los mantos freáticos (Malcom et al., 2005), la introducción de especies exóticas como el pez mosquito (*Gambusia affinis*) el cual se sabe que es un gran depredador de *P. morrisoni* (Martinez y Thome, 2006), la contaminación por pesticidas (Malcom et al., 2005) y los problemas de control de la vegetación acuática (USFWS, 2011). A pesar de lo anterior, ninguno de los dos países presentan adecuadas situaciones de conservación para los caracoles de manantial de San Bernardino (Varela-Romero y Myers, 2010). Esto puede verse reflejado en la desaparición de algunas poblaciones; en Arizona originalmente existían cuatro sitios donde habitaban estos caracoles pero en la actualidad solamente habitan en un estanque artificial y esta desaparición ha sido atribuido a la explotación excesiva de los mantos freáticos (USFWS, 2012); en Sonora, la aparente desaparición de la población de Los Ojitos quizás debido la quema de la vegetación circundante (Varela-Romero y Myers, 2010). Actualmente el territorio donde habitan estos caracoles es administrado por la organización no gubernamental Fundación Cuenca Los Ojos la cual trata de proteger el hábitat, pero es

necesario que dentro de su manejo eviten las quemadas controladas para no afectar la calidad del agua, no sobreexplotar los mantos freáticos y tratar la problemática de las especies invasivas que puedan depredar caracoles dulceacuícolas. A pesar de que Estados Unidos ya se incluye esta especie bajo la categoría de amenazada en la ley de especies en peligro (Endangered Species Act), en México no existe un nivel de protección oficial para la especie y se hace necesario impulsar también un programa de protección por parte del gobierno para conservar esta especie ya que no se encuentra bajo ninguna categoría de protección. Toda la información obtenida en este trabajo tiene la finalidad de contribuir al conocimiento del estado actual de la especie *P. bernardina* con especial enfoque en las poblaciones mexicanas.

Como medidas de conservación para las poblaciones mexicanas se pueden incluir estrategias básicas de protección y manejo del hábitat, específicamente con la cantidad y calidad de agua, la existencia y permanencia de la vegetación acuática y ribereña de los hábitats que ocupan para que estas poblaciones únicas persistan. Adicionalmente se recomienda la búsqueda de nuevas posibles poblaciones al interior de la cuenca en Sonora. Las estrategias de translocación y repoblación deberán estar sustentadas en estudios adicionales de la estructura genética de la totalidad de las poblaciones de la especie después de un inventario exhaustivo en la totalidad de la cuenca del Río San Bernardino en Sonora.

VIII. CONCLUSIONES

Se detectaron 21 haplotipos en las tres poblaciones mexicanas estudiadas de *Pyrgulopsis bernardina*, y solamente uno se compartió entre localidades de El Chorro, en el Arroyo San Bernardino, y Agua Fría, en el Arroyo Cajón Bonito; los 20 haplotipos restantes fueron exclusivos de sus respectivos sitios.

Se detectó un alto grado de estructura poblacional para la cuenca del Río San Bernardino, Sonora, por lo que se trata de tres poblaciones diferentes, donde una de estas (El Chorro) se encuentra dentro del Arroyo San Bernardino y dos (Ojo caliente y Agua Fría) en cauces separados en el Arroyo Cajón Bonito.

La diversidad nucleotídica de El Chorro en el Rancho San Bernardino, Sonora, fue mayor que la reportada en una localidad muy cercana en Arizona. El análisis de la secuencia del gen COI de *P. bernardina* representa una herramienta muy útil para conocer la variabilidad genética y estructura poblacional de moluscos dulceacuícolas.

Las poblaciones que habitan la cuenca alta del Río San Bernardino, en Sonora, representan información genética única y constituyen una parte muy importante del acervo genético de la especie, por lo que los resultados obtenidos de este trabajo de diversidad genética de *P. bernardina* son fundamentales para las necesidades de conservación de esta especie y de su hábitat en Estados Unidos y en México.

IX. RECOMENDACIONES

Monitorear permanentemente las poblaciones de *Pyrgulopsis bernardina* para evaluar el estado de salud de sus poblaciones y del ecosistema.

Promover el estudio de la biología de la especie de los caracoles del género *Pyrgulopsis* de la región para entender mejor su función en el ecosistema.

Búsqueda de poblaciones adicionales del caracol de San Bernardino a lo largo de la cuenca para conocer su diversidad genética y la posible existencia de estructura en sus poblaciones y construir así un panorama más amplio del estado de salud genética de la especie.

Diseñar y promover los esfuerzos de restauración del hábitat a través de la protección del hábitat y la cosecha de agua, evitando las quemadas controladas. Evaluar la correlación entre la variación genética y la variación morfométrica de las poblaciones de la especie para definir criterios de diagnósticos morfológicos para la especie.

Secuenciar el genoma mitocondrial completo de *P. bernardina*. Elaborar un reporte con la información recabada en este trabajo para entregar a las autoridades directamente responsables de conservar especies en peligro de extinción.

Como medidas de conservación para las poblaciones mexicanas se pueden incluir inicialmente sólo estrategias de protección y de manejo del hábitat para asegurar la prevalencia de las abundancias hasta el momento detectadas.

No se recomiendan estrategias de translocación y repoblación para las poblaciones en Sonora, debido a que estas deberán estar sustentadas en estudios adicionales de la estructura genética de la totalidad de las poblaciones de la especie en la cuenca del Río San Bernardino en Sonora.

VIII. LITERATURA CITADA

- Altschul, F., G. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Avise, J. C., 1994. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. Chapman-Hall. New York, Estados Unidos.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb y J. E. Neigel. 1987. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematic. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Birky, C. W. Jr., P. Fuerst y T. Maruyama. 1989. Organelle gene diversity under migration mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121: 613-627.
- Call, R.E. y H. A. Pilsbry. 1886. On *Pyrgulopsis*, a New Genus of Rissoid Mollusk, with Descriptions of Two New Forms. *Proceedings of the Davenport Academy of Natural Sciences* 5:9-14.
- Chambers, S. M., 1980. Genetic divergence between populations *Goniobasis* (Pleuroceridae) occupying different drainage systems. *Malacología* 20:63-81.
- Danzmann, R. G. y P. E. Ihssen. 1995. A phylogeographic survey of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) in Algonquin Park, Ontario based upon mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 4:681-697.
- Darwin, C., 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray. London, Inglaterra.
- Davison, A., R. Blackie y G. Scothern. 2009. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. *Molecular Ecology Resources* 9:1092-1101.
- DeBano, L. F., G. J. Gotffried, R. H. Hamre, y C. B. Edminster. 1994. *Biodiversity and the Management of the Madrean Archipelago: The Sky Islands of Southwestern United States and Northwestern Mexico*. DIANE Publishing. Arizona, Estados Unidos de América.

- Dillon R. T. 1988. The influence of minor human disturbance on biochemical variation in a population of freshwater snails. *Biological Conservation* 43:137–144.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An Integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1:4750.
- Ferris, S. D. y W. J. Berg. 1987. The utility of mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. 277-299 p. En: Ryman, N., y Utter, F. (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press. Seattle, Estados Unidos de América.
- Figuerola, J. y A. J. Green. 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology* 47:483-494.
- Folmer, M. B., W. L. Hoeh, R. y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase I From diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.
- Frankham, R., K. Lees, M. E. Montgomery, P. R. England, E. Lowe y D. A. Briscoe. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Animal Conservation* 2:255-260.
- Fuentealba, C., R. Figueroa, F. Gonzáles y M. Palma. 2010. Variabilidad genética local del bivalvo dulceacuícola *Diplodon chilensis* (Gray 1828) proveniente de tres lagos Nahuelbutanos. *Gayana* 72:113-124.
- Gillespie, J. H. 1986. Variability of evolutionary rates of DNA. *Genetics* 113:1077-1091.
- González-Elizondo, M. S., M. González Elizondo, J. A. Tena Flores, I. L. López Enrique, A. A. Reznicek, y N. D. Pérez. 2008. Sinopsis de *Scirpus* S. L. (Cyperaceae) para México. *Acta Botánica Mexicana* 82:15-41.
- Harrison, R. G., 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in populations and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4:6-11.
- Hartl, D. L., 1988. *A Primer of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos de América.
- Hebert, P. D. N. y T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54(5):852-859.

- Hedrick, P., 2005. Genetics of Populations. A Recent and Thorough Summary of the Principles of Population Genetics. 3ra ed. Jones and Bartlette Publishers. Boston, Estados Unidos de América.
- Hershler, R., 1994. A Review of the North American Freshwater Snail Genus *Pyrgulopsis* (Hydrobiidae). Smithsonian Contributions to Zoology Number 554. Smithsonian Institution Press. Washington, D. C., Estados Unidos de América.
- Hershler, R. y H. Liu. 2008, Ancient vicariance and recent dispersal of Springsnails (Hydrobiidae: *Pyrgulopsis*) in the Death Valley system, California-Nevada. 91-101 p. En: Reheis, M. C., R. Hershler y D. M. Miller. (Eds). Late Cenozoic Drainage History of the Southwestern Great Basin and Lower Colorado River Region: Geologic and Biotic Perspectives. Geological Society of America. Boulder, Colorado, Estados Unidos de América.
- Hershler, R. y H. Liu. 2010. Two new possibly threatened species of *Pyrgulopsis* (Gastropoda: Hydrobiidae) from southwestern California. Zootaxa 2343:1-17
- Hershler, R., y J. J. Landye. 1988. Arizona Hydrobiidae (Prosobranchia: Rissoacea). Smithsonian Contribution of Zoology Number 459. Smithsonian Institution Press. Washington, D. C., Estados Unidos de América.
- Hershler, R., H. Liu y B. Lang. 2010. Transfer of *Cochliopa texana* to *Pyrgulopsis* (Hydrobiidae) and description of a third congener from the lower Pecos River basin. Journal of Molluscan Studies 76:245-256.
- Hershler, R., H. Liu y F. Thompson. 2003. Phylogenetic relationships of North American Nymphophilina gastropods based on mitochondrial DNA sequences. Zoologica Scripta 32:357-366.
- Hershler, R., H. Liu y M. Mulvey. 1999. Phylogenetic relationships within the aquatic snail genus *Tryonia*: Implications for biogeography of the North American Southwest. Molecular Phylogenetics and Evolution 13:377-391.
- Hershler, R., M. Mulvey y H. Liu. 2005. Genetic variation in the Desert Springsnail (*Tryonia porrecta*): Implications for reproductive mode and dispersal. Molecular Ecology 14:1755-1765.

- Hudson, P. F., D. A. Hendrickson, A. C. Benke, A. Varela-Romero, A. Rodiles-Hernández y W. L. Minckley. 2005. Rivers of Mexico. 1031-1085 p. En: Benke, A. C. y C. E. Cushing, (Eds.), Rivers of North America. Elsevier Academic Press, Toronto, Canadá.
- Hurt, C. R., 2004. Genetic divergence, population structure and historical demography of rare springsnails (*Pyrgulopsis*) in the lower Colorado River basin. *Molecular Ecology* 13:1173-1187.
- Kabat A. R. y R. Hershler. 1993. The Prosobranch Snail Family Hydrobiidae (Gastropoda: Rissoidea): Review of Classification and Supraspecific Taxa. Smithsonian Contributions to Zoology Number 547. Smithsonian Institution Press. Washington, D. C., Estados Unidos de América.
- Liu H. P. y R. Hershler. 2005. Molecular systematics and radiation of western North American nymphophiline gastrophods. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34:284-298.
- Liu, H. P. y R. Hershler. 2007. A test of vicariance hypothesis of western North America Fresh Water Biogeography. *Journal of Biogeography* 34:534-55
- Liu, H. P. y R. Hershler. 2012. Phylogeography of an endangered Western North American springsnail. *Conservation Genetics* 13:299-305.
- Liu, H. P., R. Hershler y K. Clift. 2003. Mitochondrial DNA sequences reveal extensive cryptic diversity within a western American Springsnail. *Molecular Ecology* 12:2771-2782.
- Malcom, J., W. R. Radke y B. K. Lang. 2005. Habitat associations of the San Bernardino Springsnail, *Pyrgulopsis bernardina* (Hydrobiidae). *Journal of Fresh Water Ecology* 20:71-77.
- Martinez, M. A., 2009. Population Size Estimates for *Pyrgulopsis trivialis* (Hydrobiidae), an Imperiled Aquatic Snail from East-Central Arizona. *Journal of Arizona-Nevada Academy of Science* 41(1):30-33.
- Martinez, M. A. y D. M. Thome. 2006. Habitat usage by the page springsnail, *Pyrgulopsis morrisoni* (Gastropoda: Hydrobiidae), from central Arizona. *The Veliger* 48:8-16.
- Mayr, E., 1942. Systematics and the Origin of the Species. Columbia University Press, New York, Estados Unidos de América.
- Mead, J. I., E. Naranjo-García, L. H. Gilbertson y R.W. Van Devender. 2010. Moluscos terrestres. 285-291 p. En: Molina-Freaner, F. y T. R. Van Devender (Eds.), *Diversidad*

- Biológica de Sonora. Universidad Nacional Autónoma de México. Mora-Cantúa Editores, Distrito Federal, México.
- Mech, S. G. y J. G. Hallet. 2001. Evaluating the effectiveness of corridors: a genetic approach. *Conservation Biology* 15:467-474.
- Meffe, G. K., y C. R. Carroll. 1994. Principles of conservation biology. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, Estados Unidos de América.
- Minckley, T. A. y A. Brunelle. 2007. Paleohydrology and growth of a desert ciénega. *Journal of Arid Environments* 69:420-431.
- Mladenka G. C., y G. W. Minshall. 2001. Variation in the life history and abundance of three populations of Bruneau hot springsnails (*Pyrgulopsis bruneausensis*). *Western North American Naturalist* 60:204–212.
- Moline, A. B., M. Shuster, D. Stephen, A. Hendrickson, y J. C. Marks. 2004. Genetic variation in a desert aquatic snail (*Nymphophilus minckleyi*) from Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. *Hidrobiología* 522:179–192.
- Naranjo-García, E., 1991. Present status of the micromollusks of Northern Sonora, Mexico. *American Malacological Bulletin* 8:165-171.
- Naranjo-García, E., 2003. Moluscos continentales de México: Dulceacuícolas. *Revista de Biología Tropical* 51: 495-505.
- 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.
- Pérez, K. E., W. F. Ponder, S. A. Colgan, C. L. Clark. 2005. Molecular phylogeny and biogeography of springs-associated hydrobiid snails of the Great Artesian Basin, Australia. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34:545–556.
- Ponder W. F. y A. Warén. 1988. Classification of the Caenogastropoda and Heterostropha - A list of the family-group names and higher taxa. *Malacological Review* 4:288–328.
- Ponder W. F. y D. J. Colgan. 2002. What makes a narrow-range taxon? Insights from Australian freshwater snails. *Invertebrate Systematics* 16:571–582.
- Ponder, W. F., D. J. Colgan, G. A. Clark, A. C. Miller, y T. Terzis. 1994. Micro- geographic, genetic and morphological differentiation of fresh water snails, the Hydrobiidae of

- Wilsons Promontory, Victoria, South-eastern Australia. Australian Journal of Zoology 42:557-678.
- Romero, P. y R. Ramírez. 2011. Divergencia intraespecífica y código de barras de ADN en *Systrophi helycicloiddes* (Gastropoda, Scolodontidae). Revista Peruana de Biología 18:201-208.
- Russell, S. M. y G. Monson. 1998. The Birds of Sonora. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona, Estados Unidos de América.
- Saccheri, I., M. Kuussaari, M. Kankare, P. Vikman, W. Fortelius, y I. Hanski. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. Nature 392:491-494.
- SEMARNAT (SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS NATURALES). 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, Jueves 30 de diciembre de 2010:1-78.
- Servicio Meteorológico Nacional. 2012. Normales Climatológicas por Estación. Normales Climatológicas Agua Prieta, Sonora, 9 de Septiembre de 2012. http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75.
- Spielman, D., B. W. Brook y R. Frankham. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 101:15261-15264.
- Stimpson, W., 1865. Researches Upon the Hydrobiinae and Allied Forms: Chiefly Made Upon Materials in the Museum of the Smithsonian Institution. Smithsonian Miscellaneous Collections. Washington, DC., Estados Unidos de América.
- Taylor, D. W., 1987. Fresh-water molluscs from New Mexico and vicinity. Bulletin of the New Mexico Bureau of Mines and Mineral Resources 116:1-50.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Research 22: 4673-4680.
- Troschel, F. H., 1856. Das Gebiss der Schnecken zur begründung einer natürlichen Classification. Erster Band. Nicolais-che Verlagsbuchhandlung. Berlin, Alemania.

- USFWS (U. S. Fish and Wildlife Service). 2011. Endangered and threatened wildlife and plants; Proposed endangered status for the Three Forks Springsnail and San Bernardino Springsnail, and proposed designation of critical habitat; Proposed Rule. Federal Register 76:70.
- USFWS (U. S. Fish and Wildlife Service). 2012. Endangered and threatened wildlife and plants; Determination of endangered status for Three Forks Springsnail and threatened status for San Bernardino Springsnail throughout their ranges and designation of critical habitat for both species; Final rule. Federal Register 77:74.
- Varela-Romero, A. y T. Myers. 2010. Genetic evaluation of Springsnails in the San Bernardino River watershed of Sonora, México, in relation to *Pyrgulopsis bernardina* (Taylor, 1987). Final Report. International Borderlands Program, Arizona Game and Fish Department, Arizona, Estados Unidos.
- Varela-Romero, A., T. Myers., J. Sorensen, F. Abarca. 2013. Taxonomic status and phylogeny of the San Bernardino Springsnail population into the genus *Pyrgulopsis* in Sonora and Arizona. Biotecnica 15(1).
- Wada, S., K. Kawakami y S. Chiba. 2012. Snails can survive passage through a bird's digestive system. Journal of Biogeography 39:69-73.
- Wilke, T., G. M. Davis, A. Falniowski, F. Giusti, M. Bodon y M. Szarowska. 2001. Molecular Systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea) Testing Monophyly and Phylogenetic Relationships. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia 151:1-21.
- Workman, P. L. y J. D. Niswander. 1970. Population studies on Southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. American Journal of Human Genetics. 22:24-29.
- Wright, S. 1973. The Origin of *F*-statistics for Describing the Genetic Aspects of Population Structure. University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii, Estados Unidos de América.