

# INFORME CIENTIFICO DE BECA

Legajo N°: 4317

**TIPO DE BECA** Beca doctoral 2do año

**PERIODO** 01-04-2018 a febrero 2019.

## 1. DATOS PERSONALES

*APELLIDO: de Lucía*

*NOMBRES: Micaela*

*Dirección Particular: Calle: Localidad: La*

*Plata CP: 1900 Tel:*

*Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):  
micadelucia@gmail.com;*

## 2. TEMA DE INVESTIGACION (Debe adjuntarse copia del plan de actividades presentado con la solicitud de Beca)

DISTRIBUCIÓN Y VULNERABILIDAD DE DOS GÉNEROS DE GASTERÓPODOS DULCIACUÍCOLAS ENDÉMICOS DE SUDAMÉRICA, EN LA COSTA BONAERENSE DEL RÍO DE LA PLATA.

Objetivo general:

Evaluar el grado de vulnerabilidad de los gasterópodos nativos de los géneros Potamolithus y Chilina presentes en la costa bonaerense del Río de la Plata.

Objetivos específicos:

- Completar y actualizar la descripción anatómica y genética de las especies de Potamolithus y Chilina presentes en la costa bonaerense del Río de la Plata, a efecto de estimar la contribución e importancia relativa de cada especie para su conservación, de acuerdo a la variabilidad que presenta.
- Evaluar el grado de interferencia o incidencia de moluscos no-nativos e invasores (Limnoperna fortunei) en la distribución de los géneros Potamolithus y Chilina en las costas bonaerenses del Río de la Plata.
- Analizar la distribución de la malacofauna dulciacuícola presente en la costa bonaerense del Río de la Plata, con énfasis en los géneros Potamolithus y Chilina, evaluando áreas protegidas y no protegidas (con alto impacto antropogénico).
- Categorizar a las especies de los géneros Potamolithus y Chilina en la costa bonaerense de acuerdo a los criterios regionales de conservación definidos por la IUCN (2012a), a través de estudios de patrones de población, como la densidad, la tasa de crecimiento individual y los tiempos de reclutamiento.

## ANTECEDENTES

En el presente, la introducción de especies no-nativas constituye la principal causa de pérdida de biodiversidad, seguida por la destrucción del hábitat (Hylton-Taylor, 2000). Los ecosistemas de aguas continentales albergan aproximadamente el 12% de la diversidad animal, y la supervivencia de otras

especies depende directa o indirectamente de ellos (Abramovitz, 1996). A pesar de su importancia, estos ambientes están siendo rápidamente alterados con la construcción de represas, contaminación del agua (p. ej.: nitratos, productos químicos utilizados en la agricultura, mala gestión de aguas doméstica residuales) y la introducción de especies no-nativas que afectan letal o subletalmente a las poblaciones, entre otros, de moluscos de agua dulce (Cuttelod et al., 2011; Clavijo & Scarabino, 2013; Cowie et al., 2017). Los gasterópodos de agua dulce se encuentran dentro del grupo de taxones que presentan especies en peligro de extinción o extintas global o localmente (Master et al., 1998; Duncan & Lockwood, 2001; Scarabino, 2004). Además, esta situación se ve agravada debido a que una gran cantidad de entidades no se encuentran identificadas, sumado a la falta de datos de referencia críticos relacionados con la distribución, tamaño poblacional, abundancia, ciclo vital básico, fisiología y morfología.

Los gasterópodos de agua dulce se emplean como indicadores de condiciones ambientales a través de evaluaciones de composición de la taxocenosis de moluscos o sobre la base de conjuntos de estos y otros invertebrados y/o programas de monitoreo biológico que califican la calidad del agua y el estado de los biotopos acuáticos (Strong et al., 2008).

La Lista Roja, generada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, <http://www.iucnredlist.org/>), produce una estimación relativa de la posibilidad de extinción de un taxón y sirve como un medio para evaluar el estado de conservación de las especies. De acuerdo a los criterios de la IUCN (2012b), el monitoreo del tamaño de la población, la distribución y la abundancia debe llevarse a cabo para todas las especies, ya sea que estas se encuentren amenazadas, posean datos insuficientes o que no hayan sido evaluadas aún. Para ser consideradas dentro de estos criterios, es necesaria la investigación taxonómica que permita una certera identificación y definición de las especies y diseñar buenas estrategias de conservación y gestión ambiental (Clavijo et al., 2010; Cuttelod et al., 2011). Sin embargo, se estima que existen descripciones válidas para aproximadamente 7.000 especies de moluscos de agua dulce, y cerca de 3.000 a 10.000 faltan por describir (Lydeard et al. 2004). Actualmente, para realizar una adecuada descripción específica de moluscos se requiere conocer su morfo-anatomía y genética (Pujadas et al., 2015). El uso de técnicas de secuenciación permite completar el conocimiento taxonómico, contribuyendo a los estudios sobre biodiversidad y conservación (Vidigal et al., 2013). Asimismo, estudios del ciclo de vida, por ejemplo en poblaciones de bivalvos unionidos, es fundamental para establecer el grado de vulnerabilidad de las mismas (Torres, et al. 2016)

Los sitios “hotspots” (puntos calientes) de diversidad de gasterópodos de agua dulce se han clasificado a nivel mundial (Strong et al., 2008) identificando al río Uruguay y el Río de la Plata como uno de ellos. El Río de la Plata se destaca por presentar los mayores valores de diversidad de moluscos (Rumi et al., 2006, 2008; Núñez et al., 2010), junto con los ríos Paraná, Iguazú y Uruguay. Las mayores riquezas específicas en la Argentina están dadas por los géneros endémicos *Potamolithus* Pilsbry, 1896 (23 especies) y *Chilina* Gray, 1828 (22 especies) (Gutiérrez Gregoric & de Lucía, 2016; Núñez, 2016).

El género *Potamolithus* pertenece a la familia Tateidae y junto a los Chiliniidae y Glacidorbidae presentan vinculación filogenética con malacofauna de Australasia. Glacidorbidae se encuentra representada por 19 especies en Oceanía y cuatro en la Patagonia de América del Sur (Ponder &

Avern 2000; Rumi et al., 2015). Los Chilinoidea están representados por el género *Chilina* (Chiliniidae) en América del Sur y *Latiia* (Latiidae) en Oceanía (Marshall, 2011). El género *Potamolithus* se encuentra vinculado con nueve géneros de la familia Tateidae que habitan en Oceanía (Wilke et al., 2013).

En la Argentina las especies del género *Potamolithus* se distribuyen principalmente en las cuencas de los ríos Iguazú, Paraná y Uruguay, siendo el Río de la Plata la cola de distribución del mismo (López Armengol, 1985). El género *Chilina* presenta una distribución más amplia con especies en la Patagonia, Cuyo y Cuenca del Plata (Rumi et al., 2008). Es importante destacar que el género *Potamolithus*, en la “lista roja” de la IUCN solo posee evaluadas siete especies (Pastorino & Darrigan, 2011, 2012, 2015), de las cuales cuatro se catalogan como de “preocupación menor”; y tres especies como con “datos insuficientes”. Mientras que para el género *Chilina* en la Argentina posee evaluadas cinco especies (Pastorino & Darrigan, 2011) de las cuales tres se catalogan como de “preocupación menor” y dos como con “datos insuficientes”. La IUCN (2016) aclara que para estas especies se necesitan investigaciones adicionales, en relación con la abundancia, distribución, ecología y evolución de sus poblaciones, y los impactos de las amenazas sobre ellas. Según Rumi et al. (2006; 2008) y Gutiérrez Gregoric & de Lucía (2016) 25 especies de estos géneros son consideradas vulnerables debido a su distribución restringida y/o discontinua.

El género *Chilina* ha sido estudiado desde el punto de vista taxonómico y poblacional con indicios de estudios genéticos-moleculares (Gutiérrez Gregoric, 2008; Gutiérrez Gregoric et al. 2010, 2012; Gutiérrez Gregoric & de Lucía, 2016). Mientras que del género *Potamolithus* se posee información mayormente de sus conchas y muy pocos sobre su anatomía, careciendo de estudios poblacionales y genéticos-moleculares.

Las dos especies de *Chilina* que poseen poblaciones establecidas en las costas bonaerenses del Río de la Plata, *C. fluminea* (Maton, 1809) y *C. rushii* Pilsbry, 1896, poseen descripciones anatómicas, mientras que solo *C. fluminea* posee estudios poblacionales (Gutiérrez Gregoric, 2008, 2010, Gutiérrez Gregoric et al., 2012). Dichas especies carecen de estudios genéticos entre las diferentes poblaciones presentes en el Río de la Plata, que podrían indicar la presencia de más entidades de acuerdo a su variabilidad. Si bien se ha citado a *C. gallardoi* Castellanos & Gaillard, 1981 y *C. megastoma* Hylton Scott, 1958 para la Isla Martín García, no pudo constatare poblaciones establecidas de ambas especies, sino sólo conchas aisladas (Gutiérrez Gregoric, 2008). Mientras que para el género *Potamolithus*, se han citado seis especies en las costas bonaerenses del Río de la Plata, *P. agapetus* Pilsbry, 1911; *P. bisinuatus* Pilsbry, 1896; *P. buschii* (Fraenfeld, 1865); *P. lapidum* d’Orbigny, 1835; *P. orbignyi* Pilsbry, 1896 y *P. petitianus* d’Orbigny, 1840. (López Armengol & Darrigan, 1998; Darrigan & López Armengol, 1998; Darrigan, 1999; Rumi et al., 2008; César et al., 2012).

Los múltiples usos de la cuenca del Río de la Plata (puerto, recreación, fuente de agua potable y de aguas residuales, para vertido de residuos y efluentes industriales, pesca deportiva y comercial, deportes náuticos) podrían afectar a estas especies, sin embargo, el impacto real de estas amenazas es desconocido (Darrigan & Lagreca, 2005). Es de destacar que en el año 1991 se cita para el Río de la Plata, la presencia del mejillón invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Pastorino et al., 1993), el cual es considerado un “ingeniero de ecosistema” por su habilidad de transformar el

ambiente que coloniza (Darrigran & Damborenea, 2011). La presencia y abundancia del mejillón dorado ha favorecido el aumento de ciertos macroinvertebrados y la disminución de gasterópodos nativos (Darrigran et al., 1998), desplazando a poblaciones locales de *Chilina fluminea* y *Uncancylus concentricus* (d'Orbigny, 1835) en la costa argentina del estuario del Río de la Plata (Martín & Darrigran, 1994).

Debido a que existe una marcada insuficiencia general de datos sobre el estado de las especies de estos géneros dentro de la región, se pretende aplicar los criterios de la IUCN a nivel regional como un inicio para futuras evaluaciones de conservación a un nivel más amplio. Los datos obtenidos de regiones más pequeñas son fundamentales para la evaluación de regiones más extensas, y son importantes para la planificación de la conservación (IUCN, 2012a).

Por lo tanto, es indispensable mantener actualizados los monitoreos poblacionales a efectos de relevar la información necesaria que permita evaluar el estado de conservación de las especies de los géneros endémicos *Potamolithus* y *Chilina* en la costa bonaerense del Río de la Plata, y poder de esta manera, generar herramientas de manejo para la conservación de estas especies endémicas.

## HIPOTESIS

1. La producción de información proveniente de los estudios morfo-anatómicos y genéticos permitirán sostener la posición taxonómica de las especies de *Potamolithus* presentes en la costa de bonaerense del Río de la Plata.
2. Los datos genéticos del género *Chilina* presente en la costa bonaerense del Río de la Plata indican la presencia de más de dos especies establecidas.
3. La presencia de moluscos no-nativos en las costas del Río de la Plata interfieren negativamente en la distribución de los géneros *Potamolithus* y *Chilina*.
4. Las áreas protegidas definidas en esta cuenca conservan mayor variabilidad específica de los géneros mencionados, con respecto a las presentes en áreas con alto impacto antropogénico.
5. De los estudios realizados de acuerdo a los criterios regionales de la IUCN, las especies de los géneros *Potamolithus* y *Chilina* se consideran Vulnerables en la costa bonaerense del Río de la Plata.

## ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA

Área, material de estudio, estrategia de muestreo y análisis poblacional:

El área de estudio abarcará la costa bonaerense del Río de la Plata desde su extremo más interno (Isla Martín García) hasta el extremo intermedio (Punta Piedras) donde se han registrado moluscos dulciacuícolas de estos géneros (López Armengol & Darrigran, 1998; Gutiérrez Gregoric, 2008). En dichas zonas se inspeccionarán las localidades con registros históricos de especies de estos géneros, sobre la base de trabajos y colecciones malacológicas (e.g. Museo de La Plata, Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia). Las potenciales localidades donde se llevaran a cabo los muestreos son: Reserva de Uso Múltiple Isla Martín García, San Isidro (Parque Natural Municipal Ribera Norte y Balneario Anchorena), Vicente López (reserva ecológica), Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Reserva ecológica costanera sur), Reserva Natural de Punta Lara, playa

Bagliardi, Magdalena (Reserva Natural Privada “El Destino”) y Punta Piedras. Las campañas se realizarán en las cuatro estaciones climáticas.

La colecta de ejemplares se realizará fundamentalmente por recolección manual en ambientes con sustrato duro o rocoso delimitando un área determinada (utilizando grillas), o mediante el auxilio de muestreadores de aproximadamente 15 cm de diámetro y tamiz de 1,5 mm de apertura de malla en ambientes de sustrato blando, y en ambientes con macrófitos, con un copo de 1,5 mm de apertura de malla (Thiengo, 1995; Gutiérrez Gregoric & Núñez, 2010). En cada sitio de muestreo se medirán los parámetros físico-químicos del agua: oxígeno disuelto (OD mg L<sup>-1</sup>), Temperatura, pH, Salinidad, conductividad, total de Sólidos disueltos (TDS), utilizando un sensor multiparamétrico; además se describirá el tipo de sustrato.

Con el fin de evaluar la vulnerabilidad de los taxones se analizarán los criterios regionales A, B, D y E definidos por la IUCN (2012a). Algunos de estos criterios tratan acerca de la reducción del tamaño de la población basado en la observación directa o los efectos de taxones introducidos; la distribución geográfica mediante la extensión de presencia o área de ocupación; y la población muy pequeña o restringida en su área de ocupación o en el número de localidades. El tamaño y estado poblacional se analizarán en cada sitio de muestreo contabilizando el número de individuos (abundancia relativa, densidad), la tasa de crecimiento individual y los tiempos de reclutamiento. Para estimar el criterio de reclutamiento en campo de Chilina se utilizarán los estudios de crecimiento empleados por Gutiérrez Gregoric et al. (2010; 2012). En cuanto al género *Potamolithus*, para estimar el crecimiento se realizarán ensayos en acuarios individuales en el laboratorio (ver mantenimiento de ejemplares en laboratorio), que luego permitirán en campo estimar periodos de reclutamiento.

#### Procesamiento del material malacológico:

Los ejemplares colectados serán relajados en agua con cristales de mentol, por aproximadamente 6 a 10 horas. Seguidamente, se sumergirán en agua a 70°C, por aproximadamente 50 segundos y luego en agua fría (Gutiérrez Gregoric & Núñez, 2010). Las partes blandas se extraerán de las conchas y se fijarán para los estudios anatómicos en solución de Raillet-Henry modificada (agua destilada 93%, ácido acético 2%, formol 5% y 6 gramos de Cloruro de Sodio por litro de solución) (Paraense, 1976). Previo a la fijación, se cortará una pequeña porción del pie en al menos cinco ejemplares de cada población, y se fijarán en alcohol absoluto, a los efectos de realizar análisis genéticos. Para la preparación de las rádulas se utilizará el protocolo de Holznagel (1998). Luego, serán montadas para ser revisadas en microscopio electrónico de barrido del Museo de La Plata, FCNyM-UNLP. Se empleará un microscopio binocular estereoscópico con cámara clara de dibujo y un microscopio óptico, ambos con pastilla graduada, para la observación y mejor precisión en la medición de la anatomía interna y externa. Además el material observado será foto-documentado (tanto partes blandas como conchas). El material será depositado en la colección de la Sección Malacología de la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata.

#### Mantenimiento de ejemplares en laboratorio:

Se seleccionarán ejemplares adultos de la especie más abundante del género *Potamolithus* y se mantendrán con vida en acuarios separados de acuerdo con los sitios muestreados. Los acuarios

serán revisados periódicamente, donde se recolectaran los huevos, los cuales serán separados en acuarios individuales más pequeños. Para evaluar el crecimiento de los ejemplares se tomara solo la medida del diámetro mayor de la concha en vista dorsal. En el mantenimiento de los acuarios se tendrá en cuenta: temperatura del agua, temperatura del ambiente, corriente de agua, alimento, fotoperiodo, renovación del agua y eliminación de organismos que fueran perjudiciales (oligoquetos, anfípodos, ostrácodos, algas filamentosas, entre otros). Los valores obtenidos en laboratorio se extrapolarán a los datos obtenidos en campo.

#### Descripción morfo-anatómica:

En la identificación de las especies del género *Chilina* se seguirá a Gutiérrez Gregoric (2008). Para la identificación específica de los *Potamolithus* se realizará la morfometría de la conchas (largo total, diámetro, largo de la abertura, número de vueltas) considerando el posible dimorfismo sexual, siguiendo a Parodiz (1951), López Armengol (1985) y Hershler & Landye (1988). Para la caracterización anatómica de cada especie se tendrá en cuenta fundamentalmente la anatomía descriptiva del aparato reproductor, cabeza, pie, órganos paleales (número de filamentos branquiales, relación porcentual longitud osfradio/branquia), rádula (morfología de los dientes centrales y laterales) y sistema nervioso de acuerdo a Davis et al. (1976, 1986), Hershler & Landye (1988) y Hershler & Ponder (1998).

#### Análisis genéticos en *Potamolithus* y *Chilina*:

Se ensayarán análisis genéticos utilizando los fragmentos del pie que fueron fijados en alcohol absoluto. Se analizarán tres genes mitocondriales, dos de los cuales son genes no codificantes (subunidad menor del ribosoma -12S- y subunidad mayor del ribosoma -16S-) y un gen codificante (citocromo c subunidad I -COI-). Se decide analizar genes mitocondriales debido a que poseen una velocidad evolutiva acelerada, la cual implica que se podrían observarse cantidades significativas de variación de secuencia en especies estrechamente relacionadas (una característica útil para los procedimientos de identificación de especies) (Yang et al., 2014; Vogler et al., 2014). No se analizarán genes ribosomales nucleares (e.g. subunidad menor del ribosoma 18S), ya que estos evolucionan lentamente, y se utilizan para comparar taxones muy distantes (Palumbi, 1996). El ADN genómico total será extraído por el método CTAB (Sambrook et al., 1989) o mediante kit comercial. La extracción se verificará y semicuantificará por electroforesis en gel de agarosa utilizando un marcador de peso y masa molecular conocidos. La visualización en un transiluminador UV permitirá verificar la presencia del ADN, el nivel de degradación del mismo, su grado de pureza y presencia de contaminantes. Los geles serán fotodocumentados. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar el gen mitocondrial citocromo oxidasa c subunidad I (COI) se realizará siguiendo a Gutiérrez Gregoric et al., (2013, 2014); mientras que para los genes mitocondriales subunidad mayor ARNr (16S ARNr) y subunidad menor ARNr (12S ARNr) se seguirá a Hausdorf et al. (2003). Los productos de PCR serán enviados a MACROGEN, Inc. para su secuenciación automática en ambos sentidos. Las secuencias se alinearán con el software Clustal X 2.0.12 (Larkin et al. 2007). Se analizará la distancia genética mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), a través del programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013) empleando el modelo Kimura dos Parámetros

(K2P). Se procederá a realizar análisis filogenéticos por los métodos de Inferencia Bayesiana y Maxima Verosimilitud siguiendo a Vogler et al. (2014).

#### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Busqueda y actualización bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Muestreos	X			X				X				X
Procesamiento de ejemplares y caracterización de especies	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mantenimiento de ejemplares en acuarios	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis poblacional	X	X		X	X		X	X		X	X	
Informes										X		

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abramovitz, J.N. 1996. Imperiled waters, impoverished future: The decline of freshwater ecosystems. Worldwatch DC, Worldwatch Insitute. (Worldwatch Paper 128).
- César, I.I.; Martín, S.M.; Rumi, A. & Tassara, M. 2012. Mollusks (Gastropoda and Bivalvia) of the Multiple-Use Reserve Martín García Island, Río de la Plata River: biodiversity and ecology. Brazilian Journal of Biology, 72(1): 121-130.
- Clavijo, C.; Carranza, A.; Scarabino, F. & Soutullo, A. 2010. Conservation priorities for Uruguayan land and freshwater Molluscs. Tentacle, 18: 14-16.
- Clavijo, C. & Scarabino, F. 2013. Moluscos continentales. In: Soutullo, A.; Clavijo, C. & Martínez-Lanfranco, J.A. (Eds.). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. Montevideo, Museo Nacional de Historia Natural. p. 73-90.
- Cowie, R.H.; Régnier, C.; Fontaine, B. & Bouchet, P. 2017. Measuring the Sixth Extinction: what do mollusks tell us? The Nautilus, 131 (1): 3-41.
- Cuttelod, A.; Seddon, M. & Neubert, E. 2011. European Red List of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Darrigran, G.; Martin, S.M.; Gullo, B. & Armendariz, L. 1998. Macroinvertebrates associated with *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. Hydrobiologia, 367 (1-3): 223-230.
- Darrigran, G. 1999. Longitudinal distribution of molluscan communities in the Río de la Plata estuary as indicators of environmental conditions. Malacological Review, (Suppl. 8): 1-12.
- Darrigran, G. & López Armengol, MF. 1998. Composition, structure and distribution of malacofauna living on a hard substrate at the Argentinian shore of Río de la Plata, Argentina. Gayana, 62(1):79-89.
- Darrigran, G. y Lagreca, M. 2005. Moluscos Litorales del Estuario del Río de la Plata - Argentina. ProBiota, FCNyM, UNLP, Serie Técnica y Didáctica N° 8.

- Darrigran, G. & Damborenea, C. 2011. Ecosystem engineering impacts of *Limnoperna fortunei* in South America. *Zoological Science*, 28: 1-7.
- Davis, G.M.; Kitikoon, V. & Temcharoen, P. 1976. Monograph on "Lithoglyphopsis" aperta, the snail host of Mekong River schistosomiasis. *Malacologia*, 15(2): 241-287
- Davis, G.M.; Rao, N.S. & Hoagland, K.E. 1986. In search of *Tricula* (Gastropoda: Prosobranchia): *Tricula* defined, and a new genus described. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 138(2): 426-442.
- Duncan, J.R. & Lockwood, J.L. 2001. Extinction in a field of bullets: a search for causes in the decline of the world's freshwater fishes. *Biological Conservation*, 102: 97-105.
- Gutiérrez Gregoric, D.E. 2008. Estudios morfoanatómicos y tendencias poblacionales en especies de la familia Chiliniidae Dall, 1870 (Mollusca: Gastropoda) en la Cuenca del Plata. Tesis Doctoral N° 959, Facultad Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Gutiérrez Gregoric, D.E. 2010. Redescription of two endemic species of Chiliniidae (Gastropoda: Basommatophora) from Del Plata basin (South America). *Journal of Conchology*, 40(3): 321-332.
- Gutiérrez Gregoric, D.E. & Núñez, V. 2010. Método de colección de moluscos: gasterópodos continentales. División Zoología Invertebrados, FCNyM-UNLP, Serie Didáctica N° 1.
- Gutiérrez Gregoric, D.E.; Núñez, V. & Rumi, A. 2010. Populational studies in a endemic gastropod species of waterfalls environment. *American Malacological Bulletin*, 28(1-2): 159-165.
- Gutiérrez Gregoric, D.E.; Núñez, V. & Rumi, A. 2012. Population Dynamics of Freshwater Gastropod *Chilina fluminea* (Chiliniidae) in a Temperate Climate Environment in Argentina. *The Veliger*, 51(3):109–116.
- Gutiérrez Gregoric, D.E.; Beltramino, A.; Vogler, R.E.; Cuezco, M.G.; Núñez, V.; Gomez, S.; Virgillito, M. & Miquel, S.E. 2013. First records of four exotic slugs in Argentina. *American Malacological Bulletin*, 31: 245-256.
- Gutiérrez Gregoric, D.E.; Ciocco, N.F. & Rumi, A. 2014. Two new species of *Chilina* Gray from Cuyo Malacological Province, Argentina. (Gastropoda: Hygrophila: Chiliniidae). *Molluscan Research*, 34: 84-97.
- Gutiérrez Gregoric, D.E. & de Lucía, M. 2016. Freshwater gastropods diversity hotspots: three new species from the Uruguay River (South America). *PeerJ*, 4:e2138.
- Hausdorf, B.; Röpstorf, P. & Riedel, F. 2003. Relationships and origin of endemic Lake Baikal gastropods (Caenogastropoda: Rissooidea) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 435–443.
- Hershler, R. & Landye, J. 1988. Arizona Hydrobiidae (Prosobranchia: Rissoacea. *Smithsonian contributions to zoology*, 459:1-63 459.
- Hershler, R. & Ponder, W.F. 1998. A review of morphological characters of hydrobioid snails. *Smithsonian contributions to zoology*, 600:1-55.
- Holznagel, W.E. 1998. A non destructive method for cleaning gastropod radulae from frozen, alcohol-fixed, or dried material. *American Malacological Bulletin*, 14 (2): 181-183.
- Hylton-Taylor, C. 2000. 2000 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, xviii + 61 pp.

- IUCN. 2012a. Directrices para el uso de los Criterios de la Lista Roja de la IUCN a nivel regional y nacional: Versión 4.0. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. iii + 43pp. Originalmente publicado como Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional and National Levels: Version 4.0. (Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2012).
- IUCN. 2012b. Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. vi + 34pp. Originalmente publicado como IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition. (Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2012).
- IUCN, International Union for Conservation of Nature. 2016. The IUCN Red List of Treatedened Species. Version 2016-1. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acceso 15 -07- 2016.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallacw, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J. & Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.
- López Armengol, M.F. 1985. Estudio sistemático y bioecológico del género *Potamolithus* (Hydrobiidae) utilizando técnicas de taxonomía numérica. Tesis Doctoral N° 455, Facultad Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- López Armengol, M.F. & Darrigran, G. 1998. Distribución del género Neotropical *Potamolithus* Pilsbry y Rush, 1896 (Gastropoda: Hydrobiidae) en el estuario del Río de la Plata. *Iberus*, 16 (2): 67-74.
- Lydeard, C.; Cowie, R.H.; Ponder, W.F.; Bogan, A.E.; Bouchet, P.; Clark, S.A.; Cummings, K.S.; Frest, T.J.; Gargominy, O.; Herbert, D.G.; Hershler, R.; Perez, K.E.; Roth, B.; Seddon, M.; Strong, E.E. & Thompson, F.G. 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, 54(4): 321-330.
- Martín, S.M. & Darrigran, G. 1994. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en el Balneario Bagliardi, Río de la Plata. Alteración en la composición de la malacofauna litoral. *Tankay*, 1:164-166.
- Marshall, B.A. 2011. A new species of *Latia* Gray, 1850 (Gastropoda: Pulmonata: Hygrophila: Chilinoidea: Latiidae) from Miocene palaeo-lake Manuherikia, Southern New Zealand, and biogeographic implications. *Molluscan Research*. 31: 47-52.
- Master, L.L.; Flack, S.R. & Stein, B.A. 1998. *Rivers of Life: Critical Watersheds for Protecting Freshwater Biodiversity*. Arlington, The Nature Conservancy. 71p.
- Núñez, V.; Gutiérrez Gregoric, D.E. & Rumi, A. 2010. Freshwater gastropod provinces from Argentina. *Malacologia*. 53: 47-60.
- Núñez, V. 2016. Redescription of *Potamolithus paranensis* (Pilsbry, 1911) and *Potamolithus simplex* (Pilsbry, 1911) (Gastropoda: Tateidae), *Molluscan Research*, 37 (1): 17-30.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular systematics* 2.1, 205-247 pp.
- Paraense, L.W. 1976, *Lymnaea viatrix*: a study of topotypic specimens (Mollusca: Lymnaeidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 36(2): 419-428.
- Parodiz, J.J. 1951. Métodos de conchiliometria. *Physis*, 20(38): 241-248.
- Pastorino, G.; Darrigran, G.; Martin, S.M. & Lunaschi, L. 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. *Neotropica*, 39 (101-102): 34.
- Pastorino, G. & Darrigan, G. 2011. The IUCN Red List of Threatened Species 2011 Acceso 18/07/2016

- Pastorino, G. & Darrigan, G. 2012. The IUCN Red List of Threatened Species 2012. Acceso 18/07/2016.
- Pastorino, G. & Darrigan, G. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. Acceso 18/07/2016.
- Ponder, W.F. & Avern, G.J. 2000. The Glacidorbidae (Mollusca: Gastropoda: Heterobranchia) of Australia. *Records Australian Museum*, 52: 307-535.
- Pujadas, J.M.; Farber, M.; Pointier, J.P.; Giudici, C.; Wisnivesky, C. & Prepelitchi, L. 2015. New record for *Galba neotropica* (d'Orbigny, 1835) in Argentina, with a detailed analysis of its morphology and molecular characteristics. *Molluscan Research*, 35(3): 153-160.
- Rumi, A.; Gutiérrez Gregoric, D.E.; Núñez, V.; Cesar, I.I.; Roche, M.A.; Tassara, M.P.; Martín, S.M. & López Armengol, M.F. 2006. Freshwater Gastropoda from Argentina: species richness, distribution patterns, and an evaluation of endangered species. *Malacologia*, 49: 189-208.
- Rumi, A.; Gutiérrez Gregoric, D.E.; Núñez, V. & Darrigran, G. 2008. Malacología latinoamericana. Moluscos de agua dulce de la República Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 56: 77-111.
- Rumi, A.; Gutiérrez Gregoric, D.E.; Landoni, N.; Cárdenas Mancilla, J.; Gordillo, S.; González, J. & Álvarez, D. 2015. Glacidorbidae in South America: Revision and description of a new genus and new species from Argentinean Patagonia and Chile. *Molluscan Research*. 35(3): 143-152.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-25.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scarabino, F. 2004. Conservación de la malacofauna uruguaya. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 8(82/83): 267-273.
- Strong, E.E.; Gargominy, O.; Ponder, W.F. & Bouchet, P. 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 149-166.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Thiengo, S. 1995. Coleta; remessa de exemplares vivos; fixação e dissecação, 255-260. En: Barbosa, F.S. (Ed.). *Tópicos em Malacologia Médica*. Río de Janeiro, Fiocruz, p. 314.
- Torres, S.; Cao, I.; Reshaid, Y.; Ortiz Blanche, M.; Brea, F. & Darrigran, G. 2016. Distribución y status de conservación de las náyades (*Bivalvia*, *Unionoidea*) en territorio argentino. Segundo Congreso Argentino de Malacología, Mendoza.
- Vidigal, T.H.D.A.; Coscarelli, D. & Montesor, L.C. 2013. Molecular studies in Brazilian malacology: Tools, trends and perspectives. *Lundiana*, 11(1/2): 47-63.
- Vogler, R.E.; Beltramino, A.A.; Peso, J.G. & Rumi, A. 2014. Threatened gastropods under the evolutionary genetic species concept: redescription and new species of the genus *Aylacostoma* (Gastropoda: Thiaridae) from High Paraná River (Argentina-Paraguay). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 172(3):501-520.
- Wilke, T.; Haase, M.; Hershler, R.; Liu, H.P.; Misof, B. & Ponder, W. 2013. Pushing short DNA fragments to the limit: Phylogenetic relationships of 'hydrobioid' gastropods (Caenogastropoda: Rissoidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 715-736.

Yang, L.; Tan, Z.; Wang, D.; Xue, L.; Guan, M.X.; Huang, T. & Li, R. 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. Scientific Reports, 4: 4089.

#### FACTIBILIDAD

La temática aquí presentada se encuadra en los proyectos de investigación en desarrollo por el grupo de investigación en la División Zoología Invertebrados (DZI). Además, se cuenta con la disponibilidad de la infraestructura de la DZI necesaria para los estudios anatómicos, como equipo óptico de fotografía, microscopía y computación; como así también un sitio apropiado para el mantenimiento de poblaciones en condiciones de laboratorio, con equipos de fotoperíodo y temperatura controlados. Para los estudios genético-moleculares se cuenta con un espacio en el Laboratorio Molecular de la DZI en el Anexo del Museo de La Plata y con un termociclador Perkin-Elmer, microcentrifuga, cuba electroforética horizontal, baño termostático húmedo, vortex y transiluminador luz UV; como también micropipetas de varios volúmenes. Por otra parte se cuenta con el equipamiento necesario para encarar las campañas a campo, inclusive un utilitario para el transporte terrestre. El Museo de La Plata cuenta además con el microscopio electrónico de barrido (MEB) apropiado para realizar la observación de las rádulas.

**PALABRAS CLAVE (HASTA 3)** Conservación                      Anatomía                      Río de la Plata

#### 3. OTROS DATOS (Completar lo que corresponda)

**BECA DOCTORAL 1º AÑO** (ex ESTUDIO 1º AÑO): *Fecha inicio:* 01-04-2017

**BECA DOCTORAL 2º AÑO** (ex ESTUDIO 2º AÑO): *Fecha inicio:* 01-04-2018

**BECA DOCTORAL 3º AÑO** (ex PERFECCIONAMIENTO 1º AÑO): *Fecha inicio:*

**BECA DOCTORAL 4º AÑO** (ex PERFECCIONAMIENTO 2º AÑO): *Fecha inicio:*

#### 4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

*Universidad y/o Centro:* Universidad Nacional de La Plata

*Facultad:* Ciencias Naturales y Museo

*Departamento:* División Zoología Invertebrados, Laboratorios Anexos del Museo de La Plata

*Cátedra:*

*Otros:* Laboratorio 130

*Dirección: Calle:* 122 y 60 *Nº:*

*Localidad:* La Plata *CP:* 1900 *Tel:* 4228451 *int* 130

#### 5. CARGO UNIVERSITARIO (si existe, especificar categoría, dedicación, condición de ordinario, regular o interino):

Ayudante Diplomado, dedicación simple, interino. Cátedra de Malacología, FCNyM. Período: 01/06/2017 hasta la fecha.

#### 6. CARGOS EN OTRAS INSTITUCIONES:

#### 7. DIRECTOR DE BECA

*Apellido y Nombres: Gutiérrez Gregoric, Diego*

*Eduardo Dirección Particular: Calle:*

*Localidad: La Plata CP: 1900 Tel:*

*Dirección electrónica: dieguty@fcnym.unlp.edu.ar*

## **8. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA**

*Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.*

Disección de caracoles de agua dulce del género *Potamolithus* y *Chilina*. Análisis de caracteres morfológicos de concha y anatomía interna (sistema reproductor, digestivo, nervioso y órganos de la cavidad paleal). Uso de microscopio binocular estereoscópico con cámara clara de dibujo. Sobre los dibujos de las conchas y la anatomía se realizan las mediciones necesarias. Extracción, limpieza y preparación de rádulas para ser revisadas en microscopio electrónico de barrido. Técnicas de extracción de ADN y análisis filogenéticos moleculares. Los datos de morfología de la concha, rádula, anatomía interna y genética se utilizan para llegar a la correcta identificación de las especies. Ensayos de crecimiento y reclutamiento de ejemplares del género *Potamolithus*.

## **9. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.**

*Debe exponerse la orientación impuesta a los trabajos, técnicas empleadas, métodos, etc., y dificultades encontradas en el desarrollo de los mismos, en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

Se realizaron los muestreos correspondientes a las estaciones verano, otoño, invierno y primavera, en áreas no protegidas (Playa Anchorena, Bagliardi y La Balandra) y áreas protegidas (Isla Martín García y Reserva Natural de Punta Lara).

En las áreas no protegidas y en la Reserva Natural de Punta Lara los ejemplares fueron recolectados de manera manual, ya que los sustratos eran principalmente rocosos y de caliche. En el caso del género *Chilina* y la malacofauna acompañante se tomó como medida el esfuerzo por unidad de tiempo, y en el caso del bivalvo invasor *Limnoperna fortunei* se tomaron tres cuadrículas de 10 x 10 cm en cada área muestreada. En el muestreo de verano todos los ejemplares fueron llevados vivos, con agua de lugar, al laboratorio, y en el mismo se les colocaron cristales de mentol durante 10 horas para su relajación. Posteriormente, se sumergieron durante 50 segundos en agua a 70°C, y luego en agua fría. Los ejemplares de *Limnoperna fortunei* fueron conservados en alcohol al 70%, además se separaron, midieron y contaron de acuerdo a seis intervalos de talla: (0,00-0,49 cm]; (0,50-0,99 cm]; (1,00-1,49 cm]; (1,50-1,99 cm]; (2,00-2,49 cm]; (2,50-2,99 cm]. Los ejemplares del género *Chilina* fueron fotografiados, se les cortó parte del pie para ser guardado en alcohol absoluto para realizar análisis genéticos, y el resto del cuerpo, junto con la concha, fue conservado en alcohol al 70%. La malacofauna acompañante fue contabilizada, separada y conservada en alcohol 70%, para posteriormente realizar la identificación. En los muestreos posteriores, los ejemplares del género *Chilina* se colectaron, midieron en campo con calibre digital y fueron devueltos al medio. En ninguno de estos sitios se hallaron ejemplares de *Potamolithus*.

En la Isla Martín García (IMG) el muestreo se realizó en forma manual en dos zonas, playa de "Casa de Bombas" y "Punta Cañón" en la zona Intangible. En los dos sitios se colectaron ejemplares de *Potamolithus*, *Chilina* y *Limnoperna fortunei*, además de malacofauna acompañante. En "Casa de Bombas" se realizaron dos transectas desde la costa hacia el río, que consistían en 7 puntos, donde se levantaron 3 piedras en cada uno, se colectaron los ejemplares en frascos separados y rotulados, las piedras se colocaron fuera del agua con su respectivo frasco y luego en un balde con agua se determinó su volumen por volumetría indirecta. Los ejemplares de *Potamolithus* se contabilizaron y midieron, y solo un frasco de cada punto fue llevado al laboratorio, el resto fue devuelto al medio de manera de no influir negativamente en la densidad de estos ejemplares, ya que la idea fundamental de este trabajo es analizar el estado de conservación de los gasterópodos. Los ejemplares de *Chilina* se contabilizaron, midieron y fueron devueltos al medio. En cuanto a *Limnoperna*

fortunei se tomaron tres cuadrados de 5x5cm, se relajaron los ejemplares y fijaron para ser llevados al laboratorio, contarlos y medirlos. En “Punta Cañón” se colectaron manualmente ejemplares que fueron medidos y devueltos al medio. También se tomaron tres cuadrados de 5x5 cm de *Limnoperna fortunei*, los cuales fueron llevados al laboratorio. Los ejemplares llevados al laboratorio fueron relajados con mentol de la misma manera que los ejemplares colectados en las áreas no protegidas, y conservados con alcohol al 70%.

La principal dificultad observada durante este período fue el nivel del Río de la Plata, el cual debe tener alturas menores a 0,58 metros para poder realizar un buen muestreo. En algunos muestreos (sobre todo en la IMG), una vez realizado el viaje, las mareas no se comportaron según las tablas publicadas, y por consiguiente no se pudieron realizar todos los puntos de muestreo programados.

En el laboratorio se comenzó la determinación de la malacofauna acompañante de los muestreos realizados, y se contaron y midieron ejemplares de *Limnoperna fortunei*. De cada sitio de muestreo se depositarán en la colección de Malacología del Museo de La Plata ejemplares de *Limnoperna fortunei*.

En marzo de 2018 se colocaron ejemplares adultos de *Potamolithus*, provenientes de la Isla Martín García, con huevos sobre sus conchas en seis acuarios. Una vez que eclosionaron, los adultos fueron retirados. Estos acuarios son revisados una vez por semana y a los individuos se les mide, bajo microscopio binocular estereoscópico, el diámetro mayor de la concha en vista dorsal. En el mantenimiento de los acuarios, todas las semanas se les realiza renovación parcial del agua, se eliminan organismos perjudiciales (oligoquetos, ostrácodos, algas filamentosas, etc.), y se controla temperatura del agua, temperatura del ambiente, corriente de agua, alimento y fotoperiodo. Como resultados preliminares, se obtiene que los ejemplares alcanzaron la adultez y son fértiles; los mismos se continuaran midiendo una vez por semana hasta que mueran.

Se inició el análisis de caracteres anatómicos externos, internos y rádulas de dos morfos de *Potamolithus* correspondientes al sitio “Casa de Bombas” de la IMG. Para la obtención y limpieza de rádulas se extrajo el bulbo y se siguió el protocolo de Holznagel (1998), luego fueron revisadas en el microscopio electrónico de barrido del Museo de La Plata.

Además este año se comenzó con los análisis genéticos a todos los posibles morfos de *Potamolithus* y a las Chilina a partir de un fragmento de pie que fue cortado y fijado en alcohol absoluto. El ADN genómico total fue extraído, por el método CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), a 21 ejemplares del género *Potamolithus* y 14 ejemplares del género Chilina. La extracción se verificó y semicuantificó por electroforesis en gel de agarosa utilizando un marcador de peso y masa molecular conocidos. Los geles se visualizaron en un transiluminador UV y fueron fotodocumentados. Una vez obtenido el ADN genómico total se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar el gen mitocondrial citocromo oxidasa c subunidad I (COI), siguiendo a Gutiérrez Gregoric et al. (2013, 2014). Los productos de PCR fueron enviados a MACROGEN, Inc. y se secuenciaron en ambos sentidos. Se obtuvieron 16 secuencias de COI para *Potamolithus* agrupadas en cinco haplotipos, de los cuales uno se corresponde con *P. agapetus* y otro con *P. buschii*. Los tres haplotipos restantes no se corresponden con ninguna secuencia de *Potamolithus* conocida hasta el momento.

En cuanto al género Chilina, se obtuvieron seis secuencias de COI, las cuales se agrupan en cinco haplotipos, para cinco ejemplares del área no protegida “Anchorena” y un ejemplar de “Casa de Bombas”, los cuales corresponde a la especie Chilina fluminea. Se enviaron a secuenciar 10 productos de PCR más para este gen de ejemplares de la IMG y otras áreas. El año entrante se pondrá a punto los otros dos genes mitocondriales no codificantes 12S (subunidad menor del ribosoma) y 16S (subunidad mayor del ribosoma), para los cuales ya fueron adquiridos los primers de los mismos de acuerdo a los protocolos ya utilizados por Collado & Méndez (2012) y por Collado et al. (2013) para las especies presentes en Chile.

## **10. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.**

**10.1 PUBLICACIONES.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en la cual se haya hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC (Ver*

*instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada ya que no será tomada en consideración. A cada trabajo asignarle un número e indicar el nombre de los autores, en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, lugar donde fue publicado, volumen, página y año si corresponde. En cada trabajo que el becario presente -si lo considerase de importancia- agregará una nota justificando el mismo y su grado de participación. Asimismo, en cada caso deberá indicar si el trabajo se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

1- Torres, Santiago; Cao, Luciana; Gutiérrez Gregoric, Diego Eduardo; de Lucía, Micaela; Brea, Francisco & Darrigran, Gustavo. 2018. Distribution of the Unionida (Bivalvia, Paleoheterodonta) from Argentina and its conservation in the Southern Neotropical Region. PLoS ONE 13(9): e0203616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203616> (No se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital).

**10.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.** *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Becario de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que aparecen en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el becario deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1- Collado, Gonzalo A.; Aguayo, Karina P.; Cazzaniga, Néstor J.; Gutiérrez Gregoric, Diego E.; de Lucía, Micaela & Haase, Martin. Systematic evaluation of cryptic freshwater snails from central Chile including the enigmatic *Littoridina santiagensis* (Gastropoda, Truncatelloidea).

Enviado a European Journal of Taxonomy.

Resumen: In 1944, Walter Biese described *Littoridina santiagensis* (Cochliopidae) from Estero Dehesa based exclusively on external shell features and a second allopatric population in Yeso Spring three years later. Different samplings carried out since 2011 in the type locality have only provided specimens of the morphologically similar invasive mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Tateidae) raising doubts about the identity of the species. The recent finding of two snail morphotypes in Yeso Spring, a thick shelled form congruent with type specimens of *L. santiagensis* and a slender one morphologically associable to *P. antipodarum*, allowed comparative studies, including the taxonomic analysis of additional populations with similar shell morphology occurring in central Chile. A DNA barcoding (COI) approach identified the slender form from Yeso Spring in Maipo Basin and a second population from the contiguous Rapel Basin indeed as the invasive *P. antipodarum*, however, *L. santiagensis* was recovered among species of the genus *Potamolithus* (Tateidae) justifying the binomen *Potamolithus santiagensis* as a new combination. Besides recognition of other three populations as belonging to *Potamolithus*, the molecular analysis also suggests trans-Andean dispersal of this group of snails in the Southern Cone of South America.

**10.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que ha sido enviado. Adjuntar copia de los manuscritos.*

1- Daglio, Eduardo D.; de Lucía, Micaela; Robinson David G. & Gutiérrez Gregoric, Diego E. Ocular tentacle malformation in *Deroceras reticulatum* (Mollusca: Gastropoda: Agriolimacidae).

Enviado a Papeis Avulsos de Zoologia

Resumen: Malformations in animals have long been known. In gastropod, natural and induced malformations are mentioned in different systems and in ocular tentacles, mainly linked to cases of parasitism and exposure to pollutants (molluscicides and chemicals). In this study we present a new malformation not documented in the ocular tentacles of slug *Deroceras reticulatum* that could be due to the action of pesticides. This malformation in *D. reticulatum* is the first malformation to be mentioned for South America in nursery gardens.

2- Gutiérrez Gregoric, Diego E.; Daglio, Eduardo D.; de Lucía, Micaela; Darrigran, Gustavo A. & Robinson, David G. Plant nurseries as pathways of slug pests.

Enviado a Biological Invasions.

Resumen: The horticultural trade is a major mechanism for the long- range dispersal of terrestrial snails and slugs, which have low natural mobility. Plant nurseries serve as pathways for these mollusks (native and non-native) through the trade of plants and soil, with the associated transfer of eggs and small specimens that is likely to go unnoticed. To investigate the role of plant nurseries as a source for distribution of non-native and native slugs, we collected and examined slugs in 11 plant nurseries in Buenos Aires province and compared our survey with similar surveys worldwide. Eight species of slugs were identified, three of them were native Veronicellidae and the rest non-native Stylommatophoran slugs. Although this is the first study at this level in South America, the results are similar to those observed in other countries, mainly in the USA. Despite there are regulations at the state level, the proliferation of slugs through this medium increases year by year and that is clearly because the government regulations are not enough to keep the proliferation of slugs under control. A significant percentage of the plants that are sold in these plant nurseries are of own production and delivered to different points around the country. Unfortunately treatments for the control of mollusks can just only be seen in a few of them increasing the risk of dispersion of potential pests and parasitism.

**10.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.** *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

1- de Lucía, M.; Gonçalves, I.; Collado, G. & Gutiérrez Gregoric, D.E. "El género *Potamolithus* (Gastropoda: Tateidae) en la provincia de Misiones (Argentina), nuevas especies y re-descripciones".

Resumen: La provincia de Misiones cuenta con 16 especies de *Potamolithus*, tres de ellas con descripciones anatómicas y conquiológicas completas, el resto sólo con descripciones conquiológicas. Además, ninguna de las especies citadas para esta provincia posee análisis moleculares. El objetivo de este trabajo fue analizar la conquiología, anatomía y el gen mitocondrial citocromo oxidasa c subunidad I (COI), de ejemplares colectados en la Reserva de la Biosfera Yabotí y en el arroyo Acaraguá (perteneciente al Centro de Investigaciones Antonia Ramos). Se analizaron caracteres de concha, anatomía externa e interna, rádulas y el gen COI. El resultado fue la identificación de 4 nuevas especies y la redescrición de dos especies de *Potamolithus* de las cuales solo se conocían datos de conquiológicos.

**10.5 COMUNICACIONES.** *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

1- de Lucía, Micaela & Gutiérrez Gregoric, Diego E. 2018. "El género *Potamolithus* (Gastropoda: Tateidae) en la Isla Martín García".

**10.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.** *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

1- Informe Técnico: Darrigran, G; Gutiérrez Gregoric, D.E. & de Lucía, M. Informe Técnico Final, 2017. Diversidad de Moluscos Continentales en la Reserva Natural de Punta Lara. Presentado en el Organismo Provincial de Desarrollo Sustentable de la Provincia de Buenos Aires. (No se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital).

2- Nota de divulgación: Darrigran, G.; Gutiérrez Gregoric, D.; de Lucía, M.; Vilches, A.; Legarralde, T. y Maroñas, M. "UTILIZACIÓN DE ENCUESTAS ON LINE PARA LA VALORACIÓN DE LOS VIAJES DE CAMPAÑA POR PARTE DE LOS ESTUDIANTES DE LA ASIGNATURA MALACOLOGÍA (UNLP)". Boletín de la Asociación Argentina de Malacología, 8 (1). (No se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital).

## **11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:**

### **11.1 DOCENCIA**

Libro de Cátedra en elaboración: "El Trabajo de Campo como Espacio de Construcción del Conocimiento. Criterios y orientaciones en el ámbito de la Enseñanza de la Biología". Autores: Lapasta, Leticia; Legarralde, Teresa; Vilches, Alfredo; Darrigran, Gustavo; Damborenea, Cristina; Drago, Fabiana; Gorriti, Gabriela; Gutierrez Gregoric, Diego E.; Maroñas, Miriam; Rabanaque, Claudia; de Andrea, Pablo; de Lucía, Micaela; Guadagno, Luciano; Acosta, Romina; Atencio, Luciana; Barra, Rosana; Brea, Francisco; Custodio, Heliana; Fernández, Jesica; Galván, Eliana & Marafuschi, Constanza.

### **11.2 DIVULGACIÓN**

### **11.3 OTROS**

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

## **12. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.** *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

Evento: XIX Congreso de Ciencias Morfológicas y 17avas Jornadas de Educación.

Lugar: La Plata, Argentina. 25 y 26 de octubre de 2018.

Tipo de participación: Asistencia y presentación mural.

Título del trabajo: El género *Potamolithus* (Gastropoda: Tateidae) en la Isla Martín García.

Autores: de Lucía, Micaela & Gutiérrez Gregoric, Diego E. Tipo de comunicación: Presentación mural.

## **13. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc, y si se realizó algún entrenamiento.*

Cursos de Posgrado realizados:

1- Nombre: Sistema de información geográfica (SIG) Teoría y Práctica.

Lugar: Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.

Período: 11 de junio al 13 de julio de 2018.

Asistido o aprobado: Aprobado

Institución: Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP.

Carga horaria: 60 horas.

## **14. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

## **15. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**

1) Denominación del premio: COA Grants to Malacology.

Alcance geográfico: Internacional.

Año: 2018.

Institución otorgante: Conchologists of America (COA)

2) Denominación del premio: Premio Estímulo a la Investigación Malacológica "Juan José Parodiz".

Alcance geográfico: Nacional

Año: 2018.

Institución otorgante: Asociación Argentina de Malacología (ASAM).

**16. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Ayudante Diplomado en la Cátedra de Malacología, FCNyM. Desde el 01 de Junio de 2017 hasta la fecha, pero por ser una materia del primer cuatrimestre solo demando el 5% del tiempo.

**17. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

**18. DESCRIPCION DEL AVANCE EN LA CARRERA DE DOCTORADO.**

*Debe indicarse los logros alcanzados en la carrera de Doctorado en relación a los requisitos particulares de la misma (cursos, seminarios, trabajos de campo, etc), así como el porcentaje estimado de avance en la tesis.*

En el segundo año de Beca Doctoral se realizó un curso de posgrado denominado "Sistema de Información Geográfica (SIG)", para cumplir con los créditos requeridos en la Carrera de Doctorado de la FCNyM-UNLP a través de las Actividades Complementarias.

En el mes de octubre se realizó una presentación mural en el XIX Congreso de Ciencias Morfológicas y 17 Jornadas de Educación en la ciudad de La Plata.

Se continuó con la búsqueda bibliográfica de descripciones originales y otros manuscritos que traten los temas a investigar. Se consiguieron fotografías de material tipo de *Potamolithus buschii*, enviadas por la curadora de la colección de moluscos del NHM, Museo de Historia Natural de Viena, Austria.

Se realizaron los muestreos de verano, otoño, invierno y primavera en las áreas protegidas y áreas no protegidas. Los ejemplares colectados comenzaron a ser procesados. Se realizó el ensayo de crecimiento y reclutamiento del género *Potamolithus*, donde todas las semanas se midieron ejemplares eclosionados en los acuarios.

Se extrajo ADN genómico total de ejemplares de *Potamolithus* pertenecientes a Isla Martín García, y a ejemplares del género *Chilina* correspondiente a todos los sitios muestreados. A todos los *Potamolithus* y a seis ejemplares del género *Chilina* se les secuenció el gen mitocondrial citocromo oxidasa c subunidad I (COI).

Con esto se estima un avance total de 40% la tesis doctoral.

**19. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.** *Deberán indicarse claramente las acciones a desarrollar.*

DISTRIBUCIÓN Y VULNERABILIDAD DE DOS GÉNEROS DE GASTERÓPODOS DULCIACUÍCOLAS ENDÉMICOS DE SUDAMÉRICA, EN LA COSTA BONAERENSE DEL RÍO DE LA PLATA.

Objetivo general:

Evaluar el grado de vulnerabilidad de los gasterópodos nativos de los géneros *Potamolithus* y *Chilina* presentes en la costa bonaerense del Río de la Plata.

Objetivos específicos:

- Completar y actualizar la descripción anatómica y genética de las especies de *Potamolithus* y *Chilina* presentes en la costa bonaerense del Río de la Plata, a efecto de

estimar la contribución e importancia relativa de cada especie para su conservación, de acuerdo a la variabilidad que presenta.

- Evaluar el grado de interferencia o incidencia de moluscos no-nativos e invasores (*Limnoperna fortunei*) en la distribución de los géneros *Potamolithus* y *Chilina* en las costas bonaerenses del Río de la Plata.

- Analizar la distribución de la malacofauna dulciacuícola presente en la costa bonaerense del Río de la Plata, con énfasis en los géneros *Potamolithus* y *Chilina*, evaluando áreas protegidas y no protegidas (con alto impacto antropogénico).

- Categorizar a las especies de los géneros *Potamolithus* y *Chilina* en la costa bonaerense de acuerdo a los criterios regionales de conservación definidos por la IUCN (2012a), a través de estudios de patrones de población, como la densidad, la tasa de crecimiento individual y los tiempos de reclutamiento.

## ANTECEDENTES

En el presente, la introducción de especies no-nativas constituye la principal causa de pérdida de biodiversidad, seguida por la destrucción del hábitat (Hylton-Taylor, 2000). Los ecosistemas de aguas continentales albergan aproximadamente el 12% de la diversidad animal, y la supervivencia de otras especies depende directa o indirectamente de ellos (Abramovitz, 1996). A pesar de su importancia, estos ambientes están siendo rápidamente alterados con la construcción de represas, contaminación del agua (p. ej.: nitratos, productos químicos utilizados en la agricultura, mala gestión de aguas doméstica residuales) y la introducción de especies no-nativas que afectan letal o subletalmente a las poblaciones, entre otros, de moluscos de agua dulce (Cuttelod et al., 2011; Clavijo & Scarabino, 2013; Cowie et al., 2017). Los gasterópodos de agua dulce se encuentran dentro del grupo de taxones que presentan especies en peligro de extinción o extintas global o localmente (Master et al., 1998; Duncan & Lockwood, 2001; Scarabino, 2004). Además, esta situación se ve agravada debido a que una gran cantidad de entidades no se encuentran identificadas, sumado a la falta de datos de referencia críticos relacionados con la distribución, tamaño poblacional, abundancia, ciclo vital básico, fisiología y morfología.

Los gasterópodos de agua dulce se emplean como indicadores de condiciones ambientales a través de evaluaciones de composición de la taxocenosis de moluscos o sobre la base de conjuntos de estos y otros invertebrados y/o programas de monitoreo biológico que califican la calidad del agua y el estado de los biotopos acuáticos (Strong et al., 2008).

La Lista Roja, generada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, <http://www.iucnredlist.org/>), produce una estimación relativa de la posibilidad de extinción de un taxón y sirve como un medio para evaluar el estado de conservación de las especies. De acuerdo a los criterios de la IUCN (2012b), el monitoreo del tamaño de la población, la distribución y la abundancia debe llevarse a cabo para todas las especies, ya sea que estas se encuentren amenazadas, posean datos insuficientes o que no hayan sido evaluadas aún. Para ser consideradas dentro de estos criterios, es necesaria la investigación taxonómica que permita una certera identificación y definición de las especies y diseñar buenas estrategias de conservación y gestión ambiental (Clavijo et al., 2010; Cuttelod et al., 2011). Sin embargo, se estima que existen descripciones válidas para aproximadamente 7.000 especies de moluscos de agua dulce, y cerca de 3.000 a 10.000 faltan por describir (Lydeard et al. 2004). Actualmente, para realizar una adecuada descripción específica de moluscos se requiere conocer su morfo-anatomía y genética (Pujadas et al., 2015). El uso de técnicas de secuenciación permite completar el conocimiento taxonómico, contribuyendo a los estudios sobre biodiversidad y conservación (Vidigal et al., 2013). Asimismo, estudios del ciclo de vida, por ejemplo en poblaciones de bivalvos unionidos, es fundamental para establecer el grado de vulnerabilidad de las mismas (Torres, et al. 2016)

Los sitios "hotspots" (puntos calientes) de diversidad de gasterópodos de agua dulce se han clasificado a nivel mundial (Strong et al., 2008) identificando al río Uruguay y el Río de la Plata como uno de ellos. El Río de la Plata se destaca por presentar los mayores valores de diversidad de moluscos (Rumi et al., 2006, 2008; Núñez et al., 2010), junto con los ríos

Paraná, Iguazú y Uruguay. Las mayores riquezas específicas en la Argentina están dadas por los géneros endémicos *Potamolithus* Pilsbry, 1896 (23 especies) y *Chilina* Gray, 1828 (22 especies) (Gutiérrez Gregoric & de Lucía, 2016; Núñez, 2016).

El género *Potamolithus* pertenece a la familia Tateidae y junto a los Chiliniidae y Glacidorbidae presentan vinculación filogenética con malacofauna de Australasia. Glacidorbidae se encuentra representada por 19 especies en Oceanía y cuatro en la Patagonia de América del Sur (Ponder & Avern 2000; Rumi et al., 2015). Los Chilinoidea están representados por el género *Chilina* (Chiliniidae) en América del Sur y *Latia* (Latiidae) en Oceanía (Marshall, 2011). El género *Potamolithus* se encuentra vinculado con nueve géneros de la familia Tateidae que habitan en Oceanía (Wilke et al., 2013).

En la Argentina las especies del género *Potamolithus* se distribuyen principalmente en las cuencas de los ríos Iguazú, Paraná y Uruguay, siendo el Río de la Plata la cola de distribución del mismo (López Armengol, 1985). El género *Chilina* presenta una distribución más amplia con especies en la Patagonia, Cuyo y Cuenca del Plata (Rumi et al., 2008). Es importante destacar que el género *Potamolithus*, en la “lista roja” de la IUCN solo posee evaluadas siete especies (Pastorino & Darrigran, 2011, 2012, 2015), de las cuales cuatro se catalogan como de “preocupación menor”; y tres especies como con “datos insuficientes”. Mientras que para el género *Chilina* en la Argentina posee evaluadas cinco especies (Pastorino & Darrigran, 2011) de las cuales tres se catalogan como de “preocupación menor” y dos como con “datos insuficientes”. La IUCN (2016) aclara que para estas especies se necesitan investigaciones adicionales, en relación con la abundancia, distribución, ecología y evolución de sus poblaciones, y los impactos de las amenazas sobre ellas. Según Rumi et al. (2006; 2008) y Gutiérrez Gregoric & de Lucía (2016) 25 especies de estos géneros son consideradas vulnerables debido a su distribución restringida y/o discontinua.

El género *Chilina* ha sido estudiado desde el punto de vista taxonómico y poblacional con indicios de estudios genéticos-moleculares (Gutiérrez Gregoric, 2008; Gutiérrez Gregoric et al. 2010, 2012; Gutiérrez Gregoric & de Lucía, 2016). Mientras que del género *Potamolithus* se posee información mayormente de sus conchas y muy pocos sobre su anatomía, careciendo de estudios poblacionales y genéticos-moleculares.

Las dos especies de *Chilina* que poseen poblaciones establecidas en las costas bonaerenses del Río de la Plata, *C. fluminea* (Maton, 1809) y *C. rushii* Pilsbry, 1896, poseen descripciones anatómicas, mientras que solo *C. fluminea* posee estudios poblacionales (Gutiérrez Gregoric, 2008, 2010, Gutiérrez Gregoric et al., 2012). Dichas especies carecen de estudios genéticos entre las diferentes poblaciones presentes en el Río de la Plata, que podrían indicar la presencia de más entidades de acuerdo a su variabilidad. Si bien se ha citado a *C. gallardoi* Castellanos & Gaillard, 1981 y *C. megastoma* Hylton Scott, 1958 para la Isla Martín García, no pudo constatarse poblaciones establecidas de ambas especies, sino sólo conchas aisladas (Gutiérrez Gregoric, 2008). Mientras que para el género *Potamolithus*, se han citado seis especies en las costas bonaerenses del Río de la Plata, *P. agapetus* Pilsbry, 1911; *P. bisinatus* Pilsbry, 1896; *P. buschii* (Fraenfeld, 1865); *P. lapidum* d'Orbigny, 1835; *P. orbigny* Pilsbry, 1896 y *P. petitianus* d'Orbigny, 1840. (López Armengol & Darrigran, 1998; Darrigran & López Armengol, 1998; Darrigran, 1999; Rumi et al., 2008; César et al., 2012).

Los múltiples usos de la cuenca del Río de la Plata (puerto, recreación, fuente de agua potable y de aguas residuales, para vertido de residuos y efluentes industriales, pesca deportiva y comercial, deportes náuticos) podrían afectar a estas especies, sin embargo, el impacto real de estas amenazas es desconocido (Darrigran & Lagreca, 2005). Es de destacar que en el año 1991 se cita para el Río de la Plata, la presencia del mejillón invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Pastorino et al., 1993), el cual es considerado un “ingeniero de ecosistema” por su habilidad de transformar el ambiente que coloniza (Darrigran & Damborenea, 2011). La presencia y abundancia del mejillón dorado ha favorecido el aumento de ciertos macroinvertebrados y la disminución de gasterópodos nativos (Darrigran et al., 1998), desplazando a poblaciones locales de *Chilina fluminea* y *Uncancylus concentricus* (d'Orbigny, 1835) en la costa argentina del estuario del Río de la Plata (Martín & Darrigran, 1994).

Debido a que existe una marcada insuficiencia general de datos sobre el estado de las especies de estos géneros dentro de la región, se pretende aplicar los criterios de la IUCN a nivel regional como un inicio para futuras evaluaciones de conservación a un nivel más amplio. Los datos obtenidos de regiones más pequeñas son fundamentales para la evaluación de regiones más extensas, y son importantes para la planificación de la conservación (IUCN, 2012a).

Por lo tanto, es indispensable mantener actualizados los monitoreos poblacionales a efectos de relevar la información necesaria que permita evaluar el estado de conservación de las especies de los géneros endémicos *Potamolithus* y *Chilina* en la costa bonaerense del Río de la Plata, y poder de esta manera, generar herramientas de manejo para la conservación de estas especies endémicas.

#### HIPOTESIS

1. La producción de información proveniente de los estudios morfo-anatómicos y genéticos permitirán sostener la posición taxonómica de las especies de *Potamolithus* presentes en la costa de bonaerense del Río de la Plata.

2. Los datos genéticos del género *Chilina* presente en la costa bonaerense del Río de la Plata indican la presencia de más de dos especies establecidas.

3. La presencia de moluscos no-nativos en las costas del Río de la Plata interfieren negativamente en la distribución de los géneros *Potamolithus* y *Chilina*.

4. Las áreas protegidas definidas en esta cuenca conservan mayor variabilidad específica de los géneros mencionados, con respecto a las presentes en áreas con alto impacto antropogénico.

5. De los estudios realizados de acuerdo a los criterios regionales de la IUCN, las especies de los géneros *Potamolithus* y *Chilina* se consideran Vulnerables en la costa bonaerense del Río de la Plata.

#### ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA

Área, material de estudio, estrategia de muestreo y análisis poblacional:

El área de estudio abarcará la costa bonaerense del Río de la Plata desde su extremo más interno (Isla Martín García) hasta el extremo intermedio (Punta Piedras) donde se han registrado moluscos dulciacuícolas de estos géneros (López Armengol & Darrigran, 1998; Gutiérrez Gregoric, 2008). En dichas zonas se inspeccionarán las localidades con registros históricos de especies de estos géneros, sobre la base de trabajos y colecciones malacológicas (e.g. Museo de La Plata, Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia). Las potenciales localidades donde se llevaran a cabo los muestreos son: Reserva de Uso Múltiple Isla Martín García, San Isidro (Parque Natural Municipal Ribera Norte y Balneario Anchorena), Vicente López (reserva ecológica), Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Reserva ecológica costanera sur), Reserva Natural de Punta Lara, playa Bagliardi, Magdalena (Reserva Natural Privada “El Destino”) y Punta Piedras. Las campañas se realizaran en las cuatro estaciones climáticas.

La colecta de ejemplares se realizará fundamentalmente por recolección manual en ambientes con sustrato duro o rocoso delimitando un área determinada (utilizando grillas), o mediante el auxilio de muestreadores de aproximadamente 15 cm de diámetro y tamiz de 1,5 mm de apertura de malla en ambientes de sustrato blando, y en ambientes con macrófitos, con un copo de 1,5 mm de apertura de malla (Thiengo, 1995; Gutiérrez Gregoric & Núñez, 2010). En cada sitio de muestreo se medirán los parámetros físico-químicos del agua: oxígeno disuelto (OD mg L<sup>-1</sup>), Temperatura, pH, Salinidad, conductividad, utilizando un sensor multiparamétrico; además se describirá el tipo de sustrato.

Con el fin de evaluar la vulnerabilidad de los taxones se analizarán los criterios regionales A, B, D y E definidos por la IUCN (2012a). Algunos de estos criterios tratan acerca de la reducción del tamaño de la población basado en la observación directa o los efectos de taxones introducidos; la distribución geográfica mediante la extensión de presencia o área de ocupación; y la población muy pequeña o restringida en su área de ocupación o en el número de localidades. El tamaño y estado poblacional se analizarán en cada sitio de muestreo contabilizando el número de individuos (abundancia relativa,

densidad), la tasa de crecimiento individual y los tiempos de reclutamiento. Para estimar el criterio de reclutamiento en campo de Chilina se utilizarán los estudios de crecimiento empleados por Gutiérrez Gregoric et al. (2010; 2012). En cuanto al género Potamolitus, para estimar el crecimiento se realizaran ensayos en acuarios individuales en el laboratorio (ver mantenimiento de ejemplares en laboratorio), que luego permitirán en campo estimar periodos de reclutamiento.

#### Procesamiento del material malacológico:

Los ejemplares colectados serán relajados en agua con cristales de mentol, por aproximadamente 6 a 10 horas. Seguidamente, se sumergirán en agua a 70°C, por aproximadamente 50 segundos y luego en agua fría (Gutiérrez Gregoric & Núñez, 2010). Las partes blandas se extraerán de las conchas y se fijarán para los estudios anatómicos en solución de Raillet-Henry modificada (agua destilada 93%, ácido acético 2%, formol 5% y 6 gramos de Cloruro de Sodio por litro de solución) (Paraense, 1976). Previo a la fijación, se cortará una pequeña porción del pie en al menos cinco ejemplares de cada población, y se fijarán en alcohol absoluto, a los efectos de realizar análisis genéticos. Para la preparación de las rádulas se utilizará el protocolo de Holznagel (1998). Luego, serán montadas para ser revisadas en microscopio electrónico de barrido del Museo de La Plata, FCNyM-UNLP. Se empleará un microscopio binocular estereoscópico con cámara clara de dibujo y un microscopio óptico, ambos con pastilla graduada, para la observación y mejor precisión en la medición de la anatomía interna y externa. Además el material observado será fotodocumentado (tanto partes blandas como conchas). El material será depositado en la colección de la Sección Malacología de la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata.

#### Mantenimiento de ejemplares en laboratorio:

Se continuará con la medición de los ejemplares de Potamolitus hasta la muerte de los mismo para estimar crecimiento y longevidad.

#### Descripción morfo-anatómica:

En la identificación de las especies del género Chilina se seguirá a Gutiérrez Gregoric (2008). Para la identificación específica de los Potamolitus se realizará la morfometría de la conchas (largo total, diámetro, largo de la abertura, número de vueltas) considerando el posible dimorfismo sexual, siguiendo a Parodiz (1951), López Armengol (1985) y Hershler & Landye (1988). Para la caracterización anatómica de cada especie se tendrá en cuenta fundamentalmente la anatomía descriptiva del aparato reproductor, cabeza, pie, órganos paleales (número de filamentos branquiales, relación porcentual longitud osfradio/branquia), rádula (morfología de los dientes centrales y laterales) y sistema nervioso de acuerdo a Davis et al. (1976, 1986), Hershler & Landye (1988) y Hershler & Ponder (1998).

#### Análisis genéticos en Potamolitus y Chilina:

Se ensayarán análisis genéticos utilizando el ADN genómico total que ya fue extraído por el método CTAB (Sambrook et al., 1989) a partir de fragmentos del pie que fueron fijados en alcohol absoluto. Se analizarán los genes mitocondriales no codificantes 12S (subunidad menor del ribosoma) y 16S (subunidad mayor del ribosoma). Se decide analizar genes mitocondriales debido a que poseen una velocidad evolutiva acelerada, la cual implica que se podrían observar cantidades significativas de variación de secuencia en especies estrechamente relacionadas (una característica útil para los procedimientos de identificación de especies) (Yang et al., 2014; Vogler et al., 2014). No se analizarán genes ribosomales nucleares (e.g. subunidad menor del ribosoma 18S), ya que estos evolucionan lentamente, y se utilizan para comparar taxones muy distantes (Palumbi, 1996). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para amplificar los genes se realizará siguiendo Collado & Méndez (2012) y a Collado et al. (2013). Los productos de PCR serán enviados a MACROGEN, Inc. para su secuenciación automática en ambos sentidos. Las secuencias se alinearán con el software Clustal X 2.0.12 (Larkin et al. 2007). Se analizará la distancia genética mediante el algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987), a través del programa MEGA 6 (Tamura

et al., 2013) empleando el modelo Kimura dos Parámetros (K2P). Se procederá a realizar análisis filogenéticos por los métodos de Inferencia Bayesiana y Maxima Verosimilitud siguiendo a Vogler et al. (2014).

#### CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Meses											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Búsqueda y actualización bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Muestreos			X		X			X			X	
Procesamiento de ejemplares y caracterización de especies	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Mantenimiento de ejemplares en acuarios	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis molecular de los genes 12S y 16S	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análisis poblacional	X	X		X	X		X	X		X	X	
Informes										X		

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abramovitz, J.N. 1996. Imperiled waters, impoverished future: The decline of freshwater ecosystems. Worldwatch DC, Worldwatch Insitute. (Worldwatch Paper 128).

César, I.I.; Martín, S.M.; Rumi, A. & Tassara, M. 2012. Mollusks (Gastropoda and Bivalvia) of the Multiple-Use Reserve Martín García Island, Río de la Plata River: biodiversity and ecology. Brazilian Journal of Biology, 72(1): 121-130.

Clavijo, C.; Carranza, A.; Scarabino, F. & Soutullo, A. 2010. Conservation priorities for Uruguayan land and freshwater Molluscs. Tentacle, 18: 14-16.

Clavijo, C. & Scarabino, F. 2013. Moluscos continentales. In: Soutullo, A.; Clavijo, C. & Martínez-Lanfranco, J.A. (Eds.). Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares. Montevideo, Museo Nacional de Historia Natural. p. 73-90.

Collado, G.A.; Valladares, M.A. & Méndez, M.A. 2013. Hidden diversity in spring snails from the Andean Altiplano, the second highest plateau on Earth, and the Atacama Desert, the driest place in the world. Zoological Studies, 52: 50.

Collado, G.A. & Méndez, M.A. 2012. Phylogenetic relationships and taxonomy of Altiplano populations of Biomphalaria (Gastropoda: Planorbidae): inference from a multilocus approach. Zoological Journal of the Linnean Society, 165: 795-808.

Cowie, R.H.; Régnier, C.; Fontaine, B. & Bouchet, P. 2017. Measuring the Sixth Extinction: what do mollusks tell us? The Nautilus, 131 (1): 3-41.

Cuttelod, A.; Seddon, M. & Neubert, E. 2011. European Red List of Non-marine Molluscs. Luxembourg: Publications Office of the European Union.

Darrigran, G.; Martín, S.M.; Gullo, B. & Armendariz, L. 1998. Macroinvertebrates associated with Limnoperna fortunei (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) in Río de la Plata, Argentina. Hydrobiologia, 367 (1-3): 223-230.

Darrigran, G. 1999. Longitudinal distribution of molluscan communities in the Río de la Plata estuary as indicators of environmental conditions. Malacological Review, (Suppl. 8): 1-12.

Darrigran, G. & López Armengol, MF. 1998. Composition, structure and distribution of malacofauna living on a hard substrate at the Argentinian shore of Río de la Plata, Argentina. Gayana, 62(1):79-89.

Darrigran, G. y Lagreca, M. 2005. Moluscos Litorales del Estuario del Río de la Plata - Argentina. ProBiota, FCNyM, UNLP, Serie Técnica y Didáctica N° 8.

Darrigran, G. & Damborenea, C. 2011. Ecosystem engineering impacts of Limnoperna fortunei in South America. Zoological Science, 28: 1-7.

- Davis, G.M.; Kitikoon, V. & Temcharoen, P. 1976. Monograph on "Lithoglyphopsis" aperta, the snail host of Mekong River schistosomiasis. *Malacologia*, 15(2): 241-287
- Davis, G.M.; Rao, N.S. & Hoagland, K.E. 1986. In search of *Tricula* (Gastropoda: Prosobranchia): *Tricula* defined, and a new genus described. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 138(2): 426-442.
- Duncan, J.R. & Lockwood, J.L. 2001. Extinction in a field of bullets: a search for causes in the decline of the world's freshwater fishes. *Biological Conservation*, 102: 97-105.
- Gutiérrez Gregoric, D.E. 2008. Estudios morfoanatómicos y tendencias poblacionales en especies de la familia Chiliniidae Dall, 1870 (Mollusca: Gastropoda) en la Cuenca del Plata. Tesis Doctoral N° 959, Facultad Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Gutiérrez Gregoric, D.E. 2010. Redescription of two endemic species of Chiliniidae (Gastropoda: Basommatophora) from Del Plata basin (South America). *Journal of Conchology*, 40(3): 321-332.
- Gutiérrez Gregoric, D.E. & Núñez, V. 2010. Método de colección de moluscos: gasterópodos continentales. División Zoología Invertebrados, FCNyM-UNLP, Serie Didáctica N° 1.
- Gutiérrez Gregoric, D.E.; Núñez, V. & Rumi, A. 2010. Populational studies in a endemic gastropod species of waterfalls environment. *American Malacological Bulletin*, 28(1-2): 159-165.
- Gutiérrez Gregoric, D.E.; Núñez, V. & Rumi, A. 2012. Population Dynamics of Freshwater Gastropod *Chilina fluminea* (Chiliniidae) in a Temperate Climate Environment in Argentina. *The Veliger*, 51(3):109–116.
- Gutiérrez Gregoric, D.E.; Beltramino, A.; Vogler, R.E.; Cuezco, M.G.; Núñez, V.; Gomez, S.; Virgillito, M. & Miquel, S.E. 2013. First records of four exotic slugs in Argentina. *American Malacological Bulletin*, 31: 245-256.
- Gutiérrez Gregoric, D.E.; Ciocco, N.F. & Rumi, A. 2014. Two new species of *Chilina* Gray from Cuyo Malacological Province, Argentina. (Gastropoda: Hygrophila: Chiliniidae). *Molluscan Research*, 34: 84-97.
- Gutiérrez Gregoric, D.E. & de Lucía, M. 2016. Freshwater gastropods diversity hotspots: three new species from the Uruguay River (South America). *PeerJ*, 4:e2138.
- Hausdorf, B.; Röpstorf, P. & Riedel, F. 2003. Relationships and origin of endemic Lake Baikal gastropods (Caenogastropoda: Rissoidae) based on mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 435–443.
- Hershler, R. & Landye, J. 1988. Arizona Hydrobiidae (Prosobranchia: Rissoacea. *Smithsonian contributions to zoology*, 459:1-63 459.
- Hershler, R. & Ponder, W.F. 1998. A review of morphological characters of hydrobioid snails. *Smithsonian contributions to zoology*, 600:1-55.
- Holznagel, W.E. 1998. A non destructive method for cleaning gastropod radulae from frozen, alcohol-fixed, or dried material. *American Malacological Bulletin*, 14 (2): 181-183.
- Hylton-Taylor, C. 2000. 2000 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, xviii + 61 pp.
- IUCN. 2012a. Directrices para el uso de los Criterios de la Lista Roja de la IUCN a nivel regional y nacional: Versión 4.0. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: IUCN. iii + 43pp. Originalmente publicado como Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional and National Levels: Version 4.0. (Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2012).
- IUCN. 2012b. Categorías y Criterios de la Lista Roja de la IUCN: Versión 3.1. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: IUCN. vi + 34pp. Originalmente publicado como IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition. (Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2012).
- IUCN, International Union for Conservation of Nature. 2016. The IUCN Red List of Treated Species. Version 2016-1. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acceso 15 -07- 2016.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallacw, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J. & Higgins, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.

- López Armengol, M.F. 1985. Estudio sistemático y bioecológico del género *Potamolithus* (Hydrobiidae) utilizando técnicas de taxonomía numérica. Tesis Doctoral N° 455, Facultad Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- López Armengol, M.F. & Darrigran, G. 1998. Distribución del género Neotropical *Potamolithus* Pilbry y Rush, 1896 (Gastropoda: Hydrobiidae) en el estuario del Río de la Plata. *Iberus*, 16 (2): 67-74.
- Lydeard, C.; Cowie, R.H.; Ponder, W.F.; Bogan, A.E.; Bouchet, P.; Clark, S.A.; Cummings, K.S.; Frest, T.J.; Gargominy, O.; Herbert, D.G.; Hershler, R.; Perez, K.E.; Roth, B.; Seddon, M.; Strong, E.E. & Thompson, F.G. 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, 54(4): 321-330.
- Martín, S.M. & Darrigran, G. 1994. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en el Balneario Bagliardi, Río de la Plata. Alteración en la composición de la malacofauna litoral. *Tankay*, 1:164-166.
- Marshall, B.A. 2011. A new species of *Latia* Gray, 1850 (Gastropoda: Pulmonata: Hygrophila: Chilinoidea: Latiidae) from Miocene palaeo-lake Manuherikia, Southern New Zealand, and biogeographic implications. *Molluscan Research*. 31: 47-52.
- Master, L.L.; Flack, S.R. & Stein, B.A. 1998. Rivers of Life: Critical Watersheds for Protecting Freshwater Biodiversity. Arlington, The Nature Conservancy. 71p.
- Núñez, V.; Gutiérrez Gregoric, D.E. & Rumi, A. 2010. Freshwater gastropod provinces from Argentina. *Malacologia*. 53: 47-60.
- Núñez, V. 2016. Redescription of *Potamolithus paranensis* (Pilsbry, 1911) and *Potamolithus simplex* (Pilsbry, 1911) (Gastropoda: Tateidae), *Molluscan Research*, 37 (1): 17-30.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular systematics* 2.1, 205-247 pp.
- Paraense, L.W. 1976, *Lymnaea viatrix*: a study of topotypic specimens (Mollusca: Lymnaeidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 36(2): 419-428.
- Parodiz, J.J. 1951. Métodos de conchiliometría. *Physis*, 20(38): 241-248.
- Pastorino, G.; Darrigran, G.; Martín, S.M. & Lunaschi, L. 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), nuevo bivalvo invasor en aguas del Río de la Plata. *Neotropica*, 39 (101-102): 34.
- Pastorino, G. & Darrigan, G. 2011. The IUCN Red List of Threatened Species 2011. Acceso 18/07/2016
- Pastorino, G. & Darrigan, G. 2012. The IUCN Red List of Threatened Species 2012. Acceso 18/07/2016.
- Pastorino, G. & Darrigan, G. 2015. The IUCN Red List of Threatened Species 2015. Acceso 18/07/2016.
- Ponder, W.F. & Avern, G.J. 2000. The Glacidorbidae (Mollusca: Gastropoda: Heterobranchia) of Australia. *Records Australian Museum*, 52: 307-535.
- Pujadas, J.M.; Farber, M.; Pointier, J.P.; Giudici, C.; Wisnivesky, C. & Prepelitchi, L. 2015. New record for *Galba neotropica* (d'Orbigny, 1835) in Argentina, with a detailed analysis of its morphology and molecular characteristics. *Molluscan Research*, 35(3): 153-160.
- Rumi, A.; Gutiérrez Gregoric, D.E.; Núñez, V.; Cesar, I.I.; Roche, M.A.; Tassara, M.P.; Martín, S.M. & López Armengol, M.F. 2006. Freshwater Gastropoda from Argentina: species richness, distribution patterns, and an evaluation of endangered species. *Malacologia*, 49: 189-208.
- Rumi, A.; Gutiérrez Gregoric, D.E.; Núñez, V. & Darrigran, G. 2008. Malacología latinoamericana. Moluscos de agua dulce de la República Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 56: 77-111.
- Rumi, A.; Gutiérrez Gregoric, D.E.; Landoni, N.; Cárdenas Mancilla, J.; Gordillo, S.; González, J. & Álvarez, D. 2015. Glacidorbidae in South America: Revision and description of a new genus and new species from Argentinean Patagonia and Chile. *Molluscan Research*. 35(3): 143-152.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4(4): 406-25.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Scarabino, F. 2004. Conservación de la malacofauna uruguaya. Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay, 8(82/83): 267-273.
- Strong, E.E.; Gargominy, O.; Ponder, W.F. & Bouchet, P. 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. Hydrobiologia, 595: 149-166.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipiński, A. & Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30: 2725-2729.
- Thiengo, S. 1995. Coleta; remessa de exemplares vivos; fixação e dissecação, 255-260. En: Barbosa, F.S. (Ed.). Tópicos em Malacologia Médica. Río de Janeiro, Fiocruz, p. 314.
- Torres, S.; Cao, I.; Reshaid, Y.; Ortiz Blanche, M.; Brea, F. & Darrigran, G. 2016. Distribución y status de conservación de las náyades (Bivalvia, Unionoidea) en territorio argentino. Segundo Congreso Argentino de Malacología, Mendoza.
- Vidigal, T.H.D.A.; Coscarelli, D. & Montesor, L.C. 2013. Molecular studies in Brazilian malacology: Tools, trends and perspectives. Lundiana, 11(1/2): 47-63.
- Vogler, R.E.; Beltramino, A.A.; Peso, J.G. & Rumi, A. 2014. Threatened gastropods under the evolutionary genetic species concept: redescription and new species of the genus *Aylacostoma* (Gastropoda: Thiaridae) from High Paraná River (Argentina-Paraguay). Zoological Journal of the Linnean Society, 172(3):501-520.
- Wilke, T.; Haase, M.; Hershler, R.; Liu, H.P.; Misof, B. & Ponder, W. 2013. Pushing short DNA fragments to the limit: Phylogenetic relationships of 'hydrobioid' gastropods (Caenogastropoda: Risssooidea). Molecular Phylogenetics and Evolution, 66: 715-736.
- Yang, L.; Tan, Z.; Wang, D.; Xue, L.; Guan, M.X.; Huang, T. & Li, R. 2014. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. Scientific Reports, 4: 4089.

#### FACTIBILIDAD

La temática aquí presentada se encuadra en los proyectos de investigación en desarrollo por el grupo de investigación en la División Zoología Invertebrados (DZI). Además, se cuenta con la disponibilidad de la infraestructura de la DZI necesaria para los estudios anatómicos, como equipo óptico de fotografía, microscopía y computación; como así también un sitio apropiado para el mantenimiento de poblaciones en condiciones de laboratorio, con equipos de fotoperíodo y temperatura controlados. Para los estudios genético-moleculares se cuenta con un espacio en el Laboratorio Molecular de la DZI en el Anexo del Museo de La Plata y con un termociclador Perkin-Elmer, microcentrifuga, cuba electroforética horizontal, baño termostático húmedo, vortex y transiluminador luz UV; como también micropipetas de varios volúmenes. Por otra parte se cuenta con el equipamiento necesario para encarar las campañas a campo, inclusive un utilitario para el transporte terrestre. El Museo de La Plata cuenta además con el microscopio electrónico de barrido (MEB) apropiado para realizar la observación de las rádulas.

.....  
Firma del Director

.....  
Firma del Becario

---

#### Condiciones de Presentación

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Becario, la que deberá incluir:
- Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 14).
  - Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, deben agregarse al término del desarrollo del informe

- c. Informe del Director de tareas con la opinión del desarrollo del becario (en sobre cerrado).

---

**Nota:** El Becario que desee ser considerado a los fines de una prórroga, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.