

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Descripción y análisis molecular de una especie de molusco en el Bosque

Protector Prosperina: Descubrimiento de nuevas especies

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Martha Giuliana Dolmo Zavala

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

Dedicatoria

A mi familia, quienes han sido un gran pilar de apoyo incondicional. Gracias por cada palabra de aliento, y por darme la motivación para continuar y concluir este proyecto.

Este logro es el reflejo de su amor, paciencia y constante motivación para que nunca me rinda. Este logro es tanto mío como suyo.

A mis amigos, que han estado a mi lado durante todo este proceso. Gracias por estar ahí en los momentos difíciles, por las risas compartidas y por nunca dejarme caer. Este logro no sería el mismo sin su compañía y amistad a lo largo de estos años. Gracias por ser parte de este viaje académico y personal.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor de proyecto Julio Bonilla por su invaluable guía y paciencia durante todo el desarrollo de esta investigación. Su dedicación y confianza en mi trabajo me motivaron a mejorar constantemente y alcanzar mis objetivos.

Al Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE-ESPOL), por brindarme las herramientas y el espacio necesarios para desarrollar este proyecto. Agradezco especialmente a todo el equipo del laboratorio por su profesionalismo y apoyo continuo durante el proceso de investigación.

A mis amigos del Laboratorio, Byron, Aracely, y Melany quienes me apoyaron en todos los obstáculos para el desarrollo del proyecto. Gracias a sus ideas alentadoras continúe pese a los problemas que tuve.

Declaración Expresa

Yo **Martha Giuliana Dolmo Zavala** acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 8 de septiembre del 2024.



Martha Dolmo Zavala

Evaluadores

Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor de Materia

Julio Andrés Bonilla Jaime

Tutor de proyecto

Resumen

El Bosque Protector "La Prosperina" (BPP) en Guayaquil, Ecuador, alberga una rica biodiversidad de moluscos de agua dulce, aunque su estudio ha sido limitado. El objetivo de este proyecto es identificar la identidad molecular y morfológica de una especie de micro molusco en el BPP, mediante la validación de un protocolo de extracción de ADN y la comparación de características con las descritas en la literatura. Se recolectaron muestras de moluscos del género *Ferrissia*, se extrajo ADN utilizando un protocolo modificado y se amplificó la región COI mediante PCR. Los datos de secuenciación fueron analizados con herramientas bioinformáticas. A pesar de la baja biomasa, el ADN extraído fue suficiente para una secuenciación exitosa, identificando a los especímenes como *Ferrissia fragilis*. El análisis filogenético mostró alta similitud genética con otras poblaciones a nivel global. Las conclusiones resaltan la importancia del BPP para la conservación de la biodiversidad y la necesidad de futuros estudios que amplíen el conocimiento sobre otras especies de moluscos presentes. Se recomiendan estudios complementarios sobre la ecología de estos organismos y la implementación de programas de monitoreo genético a largo plazo.

Palabras clave: ADN, secuenciación, *Ferrissia*, COI

Abstract

“La Prosperina” Protected Forest (BPP) in Guayaquil, Ecuador, harbors a rich biodiversity of freshwater mollusks, although their study has been limited. The objective of this project is to identify the molecular and morphological identity of a micromollusk species in the BPP by validating a DNA extraction protocol and comparing characteristics with those described in the literature. Samples of mollusks from the genus Ferrissia were collected, DNA was extracted using a modified protocol, and the COI region was amplified by PCR. Sequencing data were analyzed using bioinformatics tools. Despite the low biomass, the extracted DNA was sufficient for successful sequencing, identifying the specimens as Ferrissia fragilis. Phylogenetic analysis showed a high genetic similarity with other populations worldwide. The conclusions highlight the importance of the BPP for biodiversity conservation and the need for further studies to expand knowledge about other mollusk species present. Complementary studies on the ecology of these organisms and the implementation of long-term genetic monitoring programs are recommended.

Keywords: DNA, sequencing, Ferrissia, COI

Índice general

Resumen.....	6
<i>Abstract.....</i>	<i>7</i>
Abreviaturas.....	10
Simbología.....	10
Índice de figuras.....	11
Índice de tablas.....	12
Capítulo 1.....	13
1.1 Introducción.....	13
1.2 Descripción del problema.....	13
1.3 Justificación del Problema.....	15
1.4 Objetivos.....	16
1.4.1 Objetivo general.....	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	16
1.5 Marco teórico.....	17
Capítulo 2.....	22
2. Metodología.....	22
2.1 Área de estudio.....	22
2.2 Muestreo.....	23
2.3 Descripción morfológica.....	23
2.4 Extracción de ADN.....	24
2.5 Calidad de ADN por electroforesis.....	25
2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
2.7 Análisis de datos.....	26

<i>Capítulo 3</i>	28
3. Resultados y análisis	28
3.1 Análisis morfológico	28
<i>3.1.1 Sistemática</i>	28
<i>3.1.2 Caracteres diagnósticos del género Ferrissia (Walker, 1903)</i>	28
<i>3.1.3 Ferrissia fragilis (Tryon, 1863)</i>	31
3.2 Discusión de detalles morfológicos	34
3.2 Análisis molecular	36
<i>3.2.1 Extracción de ADN de especímenes</i>	36
<i>3.2.2 Amplificación de region COI</i>	37
3.3 Análisis bioinformático	41
3.4 Análisis filogenético	43
3.5 Discusión de relaciones filogenéticas construidas	47
<i>Capítulo 4</i>	50
4. Conclusiones y recomendaciones	50
4.1 Conclusiones	50
4.2 Recomendaciones	51

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

BPP: Bosque Protector "La Prosperina"

BSA: Seroalbúmina bovina

COI/CO1 Citocromo C oxidasa subunidad I

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ESPOL: Escuela Superior Politécnica del Litoral

GTR: Modelo General Time Reversible (modelo de sustitución de nucleótidos)

HKY: Modelo Hasegawa-Kishino-Yano (modelo de sustitución de nucleótidos)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

TAE: Tris-acetato-EDTA

UV: Ultravioleta

Simbología

bp: Pares de bases

mL: Mililitros

μL: Microlitros

Índice de figuras

<i>Figura 1. Área del Bosque Protector La Prosperina</i>	<i>23</i>
<i>Figura 2. Observación de dibujos comparativos de entre F. fragilis y F. rivularis.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 3. Vista superior de especímenes analizados.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 4. Vista ventral de los organismos.....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 5. Vista dorsal de las conchas de especímenes de estudio</i>	<i>32</i>
<i>Figura 6. Medidas conquiológicas de especímenes</i>	<i>33</i>
<i>Figura 7. Vista lateral comparativa de especímenes.....</i>	<i>34</i>
<i>Figura 8. Ilustración de los segmentos de la región Folmer flanqueados por combinación de primers</i>	<i>39</i>
<i>Figura 9. Amplificación de fragmento de región COI, flanqueadas por el set de primers</i>	<i>40</i>
<i>Figura 10. Secuencias ensambladas de 28 especímenes de estudio en el software Ugene.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 11. Análisis en MEGA del modelo evolutivo para inferencias por método de Maximun likelihood.....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 12. Imagen comparativa de los valores de soporte en ramas de los 3 árboles generados con el modelo HYK85+G+I.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 13. Árbol filogenético basado en las secuencias de la región COI.....</i>	<i>48</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1</i> Reactivos y composición por reacción con un volumen final de 20 uL.....	26
<i>Tabla 2</i> Concentración (ng/uL) de ADN en las muestras obtenidas.....	37
<i>Tabla 3</i> Primers usados en el estudio para flanquear la región Folmer	38

Capítulo 1

1.1 Introducción

Los ecosistemas acuáticos de agua dulce representan uno de los entornos más diversos y complejos a nivel global. A pesar de que solo representan alrededor del 1% de la superficie del planeta, estos son capaces de proveer hábitat a alrededor del 10% de toda las especies animales, un tercio de los vertebrados y 40% de las especies de peces (Tockner, 2021). En Ecuador, un ejemplo de estos ecosistemas es el Bosque Protector "La Prosperina" (BPP), un bosque seco tropical ubicado en la provincia del Guayas. Este bosque abarca 332.3 hectáreas y presenta una diversidad considerable, incluyendo cuerpos de agua como las albarradas, que han facilitado la creación de hábitats acuáticos, fundamentales para la biodiversidad local

A pesar de su gran importancia, la investigación de los servicios que ofrecen los ecosistemas acuáticos, acompañado de la biodiversidad que albergan, resulta limitada. En general, los análisis bibliométricos realizados por Faghihinia en *Freshwater biodiversity at different habitats: Research hotspots with persistent and emerging theme*, señalan que, a pesar de la diversidad de hábitats que engloban los cuerpos de agua dulce, la mayoría de estudios científicos se centran principalmente en el estudio de la biodiversidad en ríos y lagos (Faghihinia et al., 2021). En cuanto a la distribución geográfica de la investigación, los estudios mayormente se han focalizado en zonas de países europeos, los Estados Unidos y Asia (Ho & Goethals, 2020; Zieritz et al., 2018), lo cual refleja la escasez en la información científica en diversas partes del mundo, en particular, en países en desarrollo. Esto a su vez, se vincula con la pérdida de biodiversidad que enfrentan estas zonas debido a la sobreexplotación de los recursos hídricos.

1.2 Descripción del problema

Actualmente, los hábitats de agua dulce y la gran diversidad de organismos que los habitan están bajo creciente presión humana debido a la sobreexplotación, la alteración de

ecosistemas, la construcción de represas y la aparición de nuevos factores estresantes, como la contaminación por productos químicos, la luz y el ruido. Se ha reportado que las principales causas de la pérdida de biodiversidad son la alteración de los flujos, la contaminación, la degradación por urbanización y pérdida de hábitat, la sobreexplotación de especies y las especies invasoras no nativas (Dudgeon et al., 2006). Debido a estos problemas se ha sugerido que aproximadamente una de cada tres especies de agua dulce presentan riesgo de extinción en todo el mundo (Collen et al., 2014). En el Bosque Protector "La Prosperina", las albarradas, como la albarrada "Cañas", han sido fundamentales en la conservación de especies locales al proporcionar cuerpos de agua que mantienen el equilibrio ecológico en la zona. No obstante, las presiones antropogénicas, sumadas a la falta de investigación, limitan el conocimiento sobre la biodiversidad, especialmente en invertebrados como los moluscos.

Los ecosistemas de agua dulce se encuentran catalogados como los ecosistemas más amenazados en comparación con los ecosistemas terrestres o marinos, debido a la gran pérdida de su hábitat se encuentran catalogados como los ecosistemas más amenazados (W. Reid et al., 2005). En la región de Europa y Asia (ECA), estos han presentado una disminución de alrededor del 50% de la superficie entre 1970 y 2008 (Gozlan et al., 2019) y hasta un 64% de su área a nivel global desde 1997 hasta 2001 (IPBES, 2018). En particular, los humedales han disminuido un 75% en las últimas décadas (Tockner, 2021).

Un problema significativo al evaluar el estado de la diversidad en estos ecosistemas es la escasez de datos sobre los invertebrados de agua dulce, a pesar de que constituyen uno de los grupos más abundantes. El estado actual está disponible sólo para una minoría de especies, y resulta desconocido, en gran medida, el impacto de especies exóticas invasoras en diferentes localidades. Se han descrito más de 107000 especies de invertebrados de agua dulce, y aún existen muchas más sin descubrirse, e incluso cada año se encuentran nuevas especies y géneros (Balian et al., 2008). Sin embargo, y pese a que se encuentran registrados

en menor proporción que los vertebrados, se ha reportado que las poblaciones de invertebrados de agua dulce se han visto más afectadas que sus homólogos terrestres (Reid et al., 2019).

Considerando la alarmante pérdida de biodiversidad que enfrentan estos ecosistemas, se presenta como otro gran inconveniente la investigación sesgada a ciertos grupos taxonómicos dentro de estos hábitats. Los estudios sobre la diversidad en hábitats de agua dulce se enfocan mayormente en taxones como los peces, debido a la abundante información disponible a nivel global y a su importancia como indicadores zoogeográficos en diversos análisis (Abell et al., 2008; Celi & Villamarín, 2020; Luiza-Andrade et al., 2017). No obstante, otros grupos importantes como los moluscos, que desempeñan un papel crucial en procesos ecológicos como el ciclo de nutrientes y la productividad primaria, están subrepresentados en la investigación. A pesar de ser altamente amenazados, los moluscos han recibido menos atención que otros taxones, lo que deja muchas lagunas en el conocimiento sobre su estado de conservación y ecología.

En Ecuador, la biodiversidad de moluscos de agua dulce es poco conocida. La obtención de muestras en cantidad y calidad suficiente para la secuenciación puede ser un desafío, especialmente si se trabaja con especies no descritas. Este problema es evidente en el Bosque Protector Prosperina, donde muchas especies aún no han sido estudiadas.

1.3 Justificación del Problema

La investigación de la biodiversidad en los ecosistemas acuáticos es crucial para la conservación y manejo sostenible de estos hábitats. La falta de datos precisos sobre la diversidad de moluscos y otros invertebrados de agua dulce limita nuestra capacidad para implementar estrategias efectivas de conservación. Además, la identificación molecular de especies es esencial para descubrir especies crípticas y actualizar taxonomías obsoletas basadas únicamente en estudios morfológicos. El Bosque Protector Prosperina presenta una

oportunidad única para estudiar y describir nuevas especies de moluscos, contribuyendo significativamente a la bibliografía científica y proporcionando datos fundamentales para evaluaciones globales del estado de la diversidad de especies. A nivel macro, estos estudios pueden influir en políticas de conservación y manejo de recursos hídricos, promoviendo la sostenibilidad y el bienestar humano. Es así como la investigación se alinea a los objetivos de desarrollo sostenible 14, sobre vida submarina y 15, enfocado en la vida de ecosistemas terrestres, mediante la generación de conocimiento científico, esencial para la conservación de la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas acuáticos. Sirviendo de base para futuros estudios en ecología, biología de la conservación o biología evolutiva, para fortalecer la capacidad local de enfrentar los desafíos ambientales globales. Y de esa manera, poder un impacto en políticas y estudios de conservación y manejo de recursos hídricos, promoviendo la sostenibilidad y el bienestar humano.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificar la identidad molecular y morfológica de una especie de molusco en el Bosque Protector Prosperina (BPP) mediante la obtención de muestras de alta calidad y la secuenciación genética para la contribución al conocimiento científico local y a la conservación de la biodiversidad en Ecuador.

1.4.2 Objetivos específicos

Validar un protocolo de extracción de ADN de moluscos, asegurando la calidad y cantidad necesarias para su secuenciación.

Analizar los datos de secuenciación utilizando métodos bioinformáticos para la identificación molecular de los especímenes

Realizar una descripción morfológica de los especímenes de micro moluscos presentes para la determinación de su identidad basada en características externas de la concha.

Realizar comparaciones morfológicas y genéticas con organismos previamente descritos en la literatura científica, identificando posibles novedades de especies descubiertas.

1.5 Marco teórico

Los ecosistemas de agua dulce son críticos para la biodiversidad global, proporcionando hábitat a una gran cantidad de especies y servicios ecosistémicos esenciales para el bienestar humano (Tockner, 2021). Estos hábitats de agua dulce pueden clasificarse de acuerdo con factores como el tipo de vegetación que albergan, el grado de penetración de luz solar, o la temperatura. Existen dos clasificaciones principales: Los ecosistemas lenticos o cuerpos de agua estancados, y los ecosistemas lóticos o de agua que fluye. Siendo así que, estos abarcan miles de ríos, lagos, humedales, estanques temporales y no temporales, en más de 400 ecorregiones (Abell et al., 2008) Además, estos proporcionan una amplia gama de bienes y servicios ecosistémicos que resultan críticos para el bienestar humano, entre los que se destaca el suministro de agua potable, su valor recreativo y la provisión de alimentos (Green et al., 2015).

El agua dulce es vital para la vida humana y ha influido en la ubicación de asentamientos humanos durante milenios (Kummu et al., 2011). Frente a los desafíos del cambio climático, la actividad industrial y el crecimiento poblacional, la disponibilidad y gestión futura de este recurso es una preocupación clave para la sostenibilidad, tal como lo destaca el Objetivo de Desarrollo Sostenible 6 de las Naciones Unidas (Horvath, 2016). Actualmente, los ecosistemas de agua dulce están en peligro y los moluscos que los habitan son uno de los grupos de fauna más amenazados del mundo. Motivo por el cual se ha hecho un llamado urgente para aumentar la investigación con el fin de conservar estos animales y sus hábitats (Stringer & Prendergast, 2023). Debido a que la biota descrita, aunque no completamente, es mucho mayor de lo que se esperaría por su área cubierta, los ecosistemas de agua dulce se convierten en importantes puntos críticos para la biodiversidad, pues

cuentan con una cantidad desproporcionadamente grande de especies y de la diversidad genética del mundo (Balian et al., 2008).

Dentro de los grupos animales menos estudiados, a pesar de los niveles altos de extinción reportados (Régnier et al., 2015), y el gran número de especies existentes, se encuentran los moluscos. Actualmente, se han reportado alrededor de 7000 especies validas de moluscos de agua dulce (Lydeard et al., 2004), dentro de los cuales abundan los gasterópodos con más de 4800 especies, siguiendo los bivalvos con aproximadamente 1200 especies (Molluscabase, 2020). Estos organismos cumplen roles muy importantes en los ecosistemas donde habitan, contribuyendo a diferentes procesos ecológicos tales como el ciclo de nutrientes y la productividad primaria, gracias a su acción de pastoreo de algas y su rol de filtradores (C. C. Vaughn, 2018). También contribuyen en la dinámica de los sedimentos y en la modificación del hábitat (Howard & Cuffey, 2006). En particular, los organismos tales como los gasterópodos y bivalvos son capaces de consumir materia orgánica, algas y bacterias presentes en los cuerpos de agua para regular los niveles de nutrientes, y de esa manera reducir la concentración de las partículas suspendidas y la biomasa de fitoplancton. Por ello, estos grupos representan una piedra angular en la calidad del agua, la estabilidad y la salud general de estos ecosistemas acuáticos (C. C. Vaughn & Hakenkamp, 2001). Estas cualidades convierten a los a los moluscos en organismos claves como indicadores ecológicos de los ecosistemas acuáticos (Wu et al., 2017). A pesar de su importancia ecológica, este grupo es considerado altamente amenazado, de ahí que en Europa el 44% de estas especies está amenazada con extinción, mientras que en África Continental un 29%, y un 17% en la región Indo-Birmania de estas especies se encuentran amenazadas (Annabelle Cuttelod et al., 2011) (Seddon et al., 2011) (Köhler et al., 2012); incluso se estima que existan muchos más organismos en peligro de extinción alrededor del mundo, remarcando así el declive general y el alto nivel de amenaza que presentan estas poblaciones.

Uno de los principales inconvenientes para realizar estudios globales sobre la riqueza de moluscos y sus amenazas es la desactualización de las fuentes primarias que registran las especies, sus distribuciones y su biogeografía. Este problema es especialmente evidente en áreas donde la diversidad ha sido poco investigada, lo que, junto con la falta de monitoreo de la abundancia y el estado de las poblaciones, incrementa el número de especies catalogadas como "Data Deficient" (DD) en los estudios (Böhm et al., 2021). Además, el aislamiento y las condiciones únicas de los ecosistemas de agua dulce han dado lugar a altos niveles de endemismo, con muchas especies limitadas a ecorregiones específicas (A. Reid et al., 2019). Otro factor que dificulta el conocimiento sobre estos grupos es que muchas taxonomías de moluscos de agua dulce siguen basándose únicamente en estudios morfológicos, sin actualizaciones que incorporen análisis moleculares más recientes (Graf, 2007).

Sudamérica posee una diversa fauna de moluscos no marinos, aunque carece de listas completas y precisas de las especies nativas. Para lograr determinar de forma estimada esta riqueza, se podrían combinar los datos de reportados por Pereira sobre la distribución de bivalvos en regiones hidrográficas de América del Sur, que registran 168 mejillones de agua dulce en Sudamérica (Pereira et al., 2014), con los datos reportados para la región neotropical con 533 gasterópodos de agua dulce (Strong et al., 2008), y las documentaciones realizadas en Brasil y áreas circundantes de 700 caracoles terrestres (Simone, 2006). Estos reportes suman un total mínimo de 1401 especies reportadas. Sin embargo, esta cifra subestima la verdadera diversidad. Recientes descripciones de nuevas especies e interacciones ecológicas (Mansur et al., 2019) (Volkmer-Ribeiro et al., 2019) se reconoce que existe una biodiversidad aún por descubrir, manteniendo así el hecho de que muchas áreas siguen poco exploradas, lo cual dificulta una estimación precisa del número total de especies en el continente. Más aún, cuando se habla a nivel local como Ecuador, cuya biodiversidad de moluscos de agua dulce es poco conocida. En general, se conocen muchos taxones de limitadas localidades, e incluso

un gran número de especies no han presentado registro alguno después de su descripción inicial. Breure en su lista patrón de moluscos no marinos del Ecuador, presenta datos únicamente de 331 especies, dentro de las cuales 5 se presentan como especies dudosas o con evidencia insuficiente, '*nomen dubium*' (Breure et al., 2022). Destacando así la necesidad de estudios anatómicos y moleculares para resolver enigmas taxonómicos locales.

Los estudios moleculares sobre moluscos se han reportado principalmente en países europeos (Kruckenhauser et al., 2014), y estos son aún más escasos cuando se trata de moluscos de agua dulce (Marrone et al., 2011; Popa et al., 2006). Además, las metodologías empleadas en estos estudios suelen enfocarse en macroinvertebrados con abundante tejido (Aranishi & Okimoto, 2006; Graterol et al., 2020), lo que resalta nuevamente la dificultad de estudiar a otros organismos del mismo grupo, como aquellos cuyos tamaños apenas alcanzan unos pocos milímetros de longitud. De este modo, los estudios moleculares se han limitado en su mayoría a moluscos de mayor tamaño. Si bien se han elaborado varios reportes sobre bivalvos y moluscos marinos en Ecuador, los homólogos de agua dulce y terrestres han recibido poca atención. Una investigación realizada por Chakraborty (2020) provee una descripción de extracciones de ADN genómicos de gasterópodos terrestres y de agua dulce de localidades de India (Chakraborty et al., 2020). Uno de los escasos estudios realizados a nivel de sur América, se enfoca en la extracción de ADN de gasterópodos plagas reportados en Venezuela (Graterol et al., 2020). Los especímenes usados presentan abundante tejido, logrando coleccionar alrededor de 100mg de epitelio para realizar las extracciones de ADN total. Esto señala que se requiere de suficiente biomasa para la efectividad de las metodologías, y los estudios moleculares.

La secuenciación genética y el análisis molecular han demostrado ser herramientas efectivas para descubrir nuevas especies y actualizar taxonomías. Estudios en otras regiones han revelado especies crípticas y proporcionados datos cruciales para la conservación de la

biodiversidad acuática. En el contexto del Bosque Protector Prosperina, estos métodos pueden ser aplicados para llenar vacíos en el conocimiento, identificar posibles nuevas especies endémicas de la localidad y apoyar el desarrollo de estrategias de conservación efectivas.

Capítulo 2

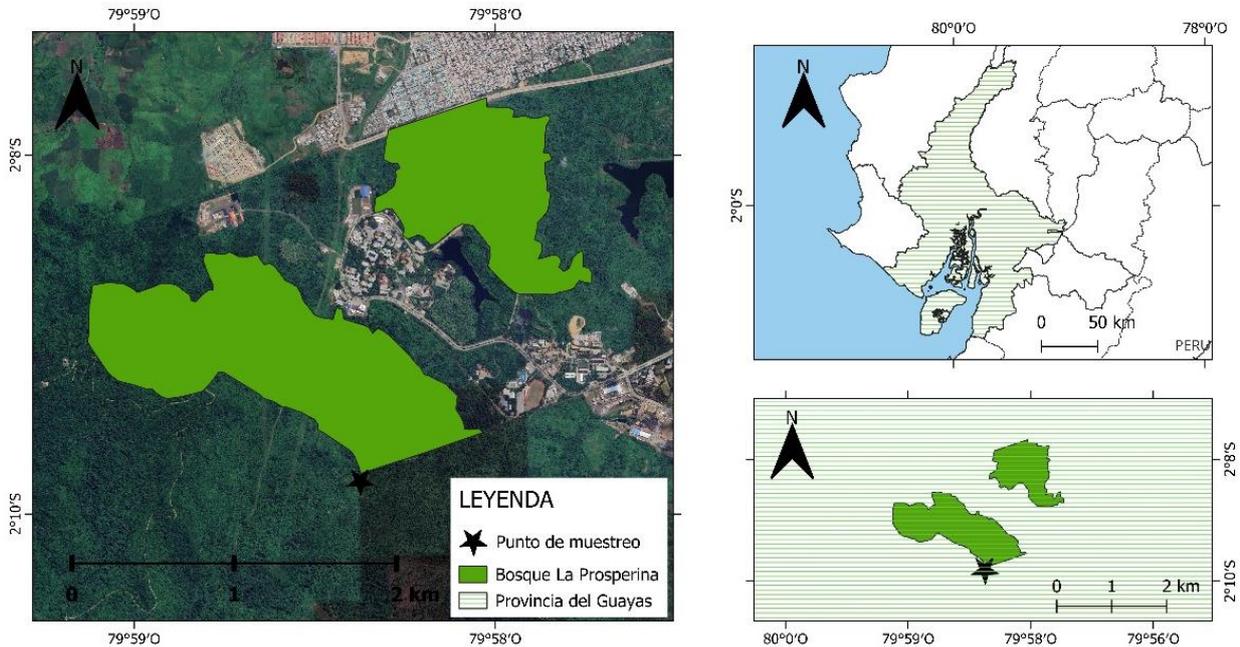
2. Metodología

2.1 Área de estudio

El Bosque Protector "La Prosperina" (BPP) está ubicado al oeste del Ecuador en la provincia del Guayas, cantón Guayaquil, en las parroquias Chongón y Tarqui, Km. 30.5 de la vía Perimetral, en el campus "Gustavo Galindo" de ESPOL. Es un bosque seco tropical que abarca 332.3 hectáreas y se encuentra en las coordenadas 2°09'03.8"S 79°57'57.1"W. El BPP presenta características típicas de los bosques secos ecuatoriales, con una precipitación media anual de 1,135 mm y temperaturas que varían entre los 25°C y 27°C (Vera Morales et al., 2021).

Albarrada “Cañas”

Dentro del BPP se han formado albarradas de varios tamaños y formas desde 1984, como estructuras diseñadas para retener agua, parte de una iniciativa del Ing. Miguel Chávez (Cadena Cazar & Yanez Rojas, 2009). Entre ellas, la albarrada “Cañas” destaca como un importante cuerpo de agua que ha contribuido significativamente a la creación de un ecosistema diverso. Este reservorio no solo sirve como fuente de agua permanente, sino que también proporciona un hábitat para una amplia variedad de especies de flora y fauna, apoyando tanto a la fauna residente como migratoria (Castillo Sánchez, 2021). En el presente estudio, el muestreo se realizó en un punto ubicado en las coordenadas 2°09'29.5"S 79°58'02.9"W dentro de la albarrada “Canias”, vea figura 1.

Figura 1*Área del Bosque Protector La Prosperina*

Nota. Punto de muestreo dentro del Bosque marcado en negro.

2.2 Muestreo

Se recolectaron de forma aleatoria especímenes de lapas dentro de la albarrada Cañas, del Bosque Protector Prosperina. Se realizaron muestreos manuales en los cuales se colectó vegetación y restos orgánicos del agua de la albarrada. Las muestras colectadas fueron guardadas en fundas ziplock para su posterior separación, identificación de los especímenes bajo un estereoscopio y extracción de ADN.

Los organismos completos fueron separados y colocados en tubos eppendorf de 0.6 ml, suspendidos en agua doblemente destilada, para su posterior almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y análisis molecular (Montero-Pau et al., 2008) (S. Vaughn & Jackson, 2022).

2.3 Descripción morfológica

Los especímenes usados para las observaciones y comparaciones con literatura fueron separados en laboratorio y conservados en etanol al 70%. Se realizó observaciones con un estereoscopio digital para la identificación basada en caracteres conquiologicos.

Las medidas de las conchas de los especímenes se calcularon usando una cámara de un microscopio digital MSAK810-Dinolite con el software DinoCapture 2.0.

2.4 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN genómico de las muestras de lapas siguiendo el protocolo HOTSHOT con modificaciones (Montero et al., 2008). Se preparó una solución de lisis alcalina compuesta por NaOH 25 mM y EDTA disódico 0,2 mM (pH 8), disolviendo las sales en agua destilada. Se preparó una solución neutralizante con Tris-HCl 40 mM (pH 5) en agua destilada.

Debido al tamaño milimétrico de las muestras, se tomó el organismo completo de forma individual para cada extracción con la ayuda de una lupa y espátula. Se colocó una lapa por tubo de 0.6 mL, se agregaron 50 uL del buffer de lisis alcalina. Luego, con una punta de pipeta se rompió el tejido del organismo y se agregaron 5uL de proteinasa K a 2 mg/ml (Sweeney & Walker, 1993). Se incubó a 65 °C para activar la proteinasa K durante 30 min seguido de una segunda incubación a 95 °C durante 30 min y completar la fase de lisis.

Se realizó un choque termino por 4 min en hielo y se agregaron nuevamente 50 uL de solución neutralizante. Se mezcló la muestra en un agitador Vortex y se centrifugó brevemente la muestra por 10 segundos a máxima velocidad. Se transfirieron 80uL del sobrenadante a un nuevo tubo, limitando la degradación por presencia de contaminantes en la muestra.

El tampón resultante de la combinación de los dos reactivos consistió en Tris-HCl 20 mM (pH 8,1) y EDTA 0,1 mM, que es similar al tampón de almacenamiento de ADN tradicional. El ADN extraído se almacenó a -20°C.

2.5 Calidad de ADN por electroforesis

Para visualizar las bandas, se utilizó una solución de TAE 1X con agarosa al 1.2%, a la que se añadió 1 μ L de Thiazole Orange Dye al 90% por cada 10 ml. Este colorante actúa como un intercalante fotosensible para detectar la presencia de ADN frente a la exposición de luz UV.

El gel corrió a una corriente de 100V durante 30 minutos, usando un marcador de 100 pb y 1 Kb. En cada pocillo se cargaron 5 μ L de ADN y 1 μ L de Blue/Orange 6X Loading Dye para el seguimiento visual de la migración de las bandas.

2.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificaron fragmentos de las regiones conservadas de la subunidad I de la citocromo C oxidasa mitocondrial (COI) (Hebert, Cywinska, et al., 2003). Esto se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica de amplificación de ácidos nucleicos que se utiliza para desnaturalizar y sintetizar secuencias de ácido desoxirribonucleico ADN utilizando la enzima ADN polimerasa I. Durante esta reacción, se realiza una amplificación in vitro de millones de veces de una copia única del fragmento objetivo, siguiendo las fases de desnaturalización, hibridación/recocido, elongación/amplificación (Khehra et al., 2024).

Se combinaron 2 sets de primers, fwh2RN-fwhf2 y dghHCO-dgLCO, siendo los primeros primers con un mayor índice de degeneración de bases (Zhang et al., 2021; Vamos et al., 2017). Las mezclas para la reacción de PCR fueron de 20 μ l y se realizaron con 10 μ l de KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (5x), 1 μ L de primer Forward (10 μ M), 1 μ L de primer reverse, 2 μ L de BSA (Seroalbúmina bovina como estabilizador de la reacción), 5 μ L de agua ultrapura y 1 μ L de ADN del organismo, tal como se observa en la tabla 1.

Para la amplificación, las condiciones del termociclado fueron: Desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguido de 30 ciclos de 15s de desnaturalización a 95°C, 30 s de

annealing a 40°C, 15s de extensión a 72°C, seguido de una extensión final de 1 min a 72°C.

Se estableció un protocolo relativamente corto, debido a la eficiencia y la robustez de la polimerasa empleada. Los productos de PCR se secuenciaron bajo el método de Sanger (Sanger et al., 1977), usando un volumen de 50 uL, por la compañía Macrogen (Korea).

Tabla 1

Reactivos y composición por reacción con un volumen final de 20 uL

Reactivos	Volumen por reacción (µL)
KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (5x)	10
<i>Primers Forward</i>	1
<i>Primers Reverse</i>	1
BSA	2
ADN	1
H ₂ O ultrapura	5

2.7 Análisis de datos

Las secuencias resultantes se ensamblaron y editaron utilizando el software *bioedit* (Sofi et al., 2022) y UGENE (Rose et al., 2019).

Para la inferencia de las relaciones evolutivas a través de árboles filogenéticos se utilizó el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis, MEGA (Kumar et al., 2008). Los alineamientos múltiples se realizaron con el algoritmo CLUSTAL W de la misma herramienta. Para la creación de modelos filogenéticos, se utilizaron métodos de inferencia por Máxima verosimilitud o Maximum Likelihood (ML).

Todas las secuencias obtenidas de los especímenes de estudio se compararon usando la base de datos de Genetic sequence database, GENBANK (Benson et al., 2010) y The Barcode of Life Data System (BOLD) (RATNASINGHAM & HEBERT, 2007). Se buscaron secuencias similares por medio del alineamiento múltiple usando la herramienta BLAST. Se

tomaron 45 secuencias basadas en el fragmento COI. Se tomaron 2 especies del género *Acroloxus*, agrupadas dentro de la misma familia como outgroup en la construcción filogenética; basado en los análisis filogenéticos de Walther (Walther et al., 2010) (Walther et al., 2006a).

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

3.1 Análisis morfológico

3.1.1 Sistemática

Orden Mollusca

Clase Gastropoda

Familia Ancyliidae

Género *Ferrissia*

3.1.2 Caracteres diagnósticos del género *Ferrissia* (Walker, 1903)

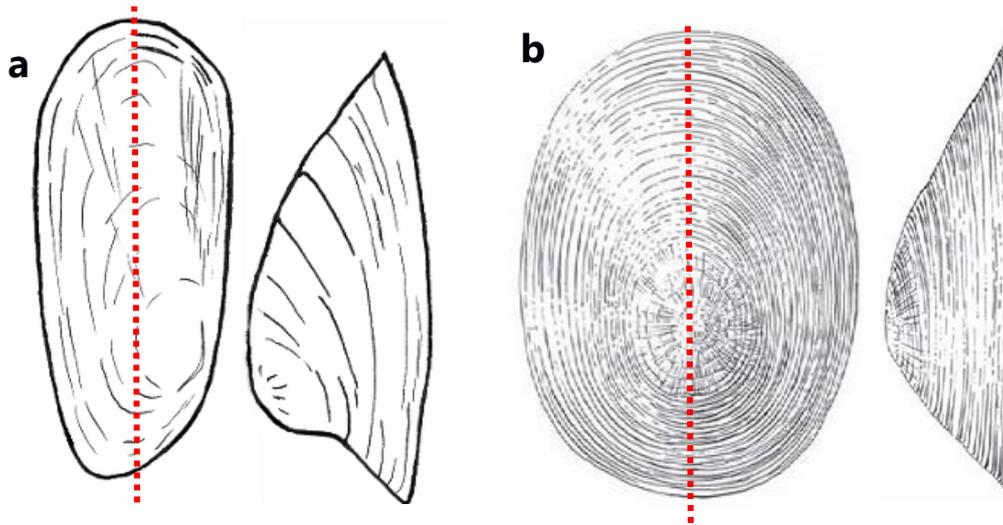
Concha pateliforme, generalmente elevada, con peristoma de contorno ovado-elíptico (Basch, 1959). Presenta ápice relativamente agudo, marcado por finas estrías radiales que representan la concha embrionaria (Basch, 1963). Organismo con una pseudobranquia simple unilobulada que lleva el ano y un sistema reproductor masculino con un flagelo. *Ferrissia* se caracteriza por la presencia de líneas radiales en el ápice de la concha embrionaria (protoconcha) (Hubendick, 1964).

La mayoría de las conchas de *Ferrissia* tienen una apertura regularmente elíptica con una parte anterior más ancha y más subcircular, que se estrecha gradualmente hacia el extremo posterior. El ápice tiene una terminación no afilada, ubicada entre el tercio posterior de la concha y el centro. Se ha reportado una microescultura apical delicada con las crestas cruzadas no tan visibles al microscopio óptico para *Ferrissia* sp. (Gómez et al., 2004) Las conchas también pueden presentarse considerablemente más aplanadas desde los lados laterales, provocando una apertura más alargada, y un ápice con mayor desplazamiento hacia la derecha, figura 2a.

Así mismo, se han observado especies de este género con presentaciones de conchas más aplanadas en el plano dorsal-ventral, y aperturas más ovaladas con el ancho máximo en la mitad del cuerpo de la concha, figura 2b, (Tokinova, 2012).

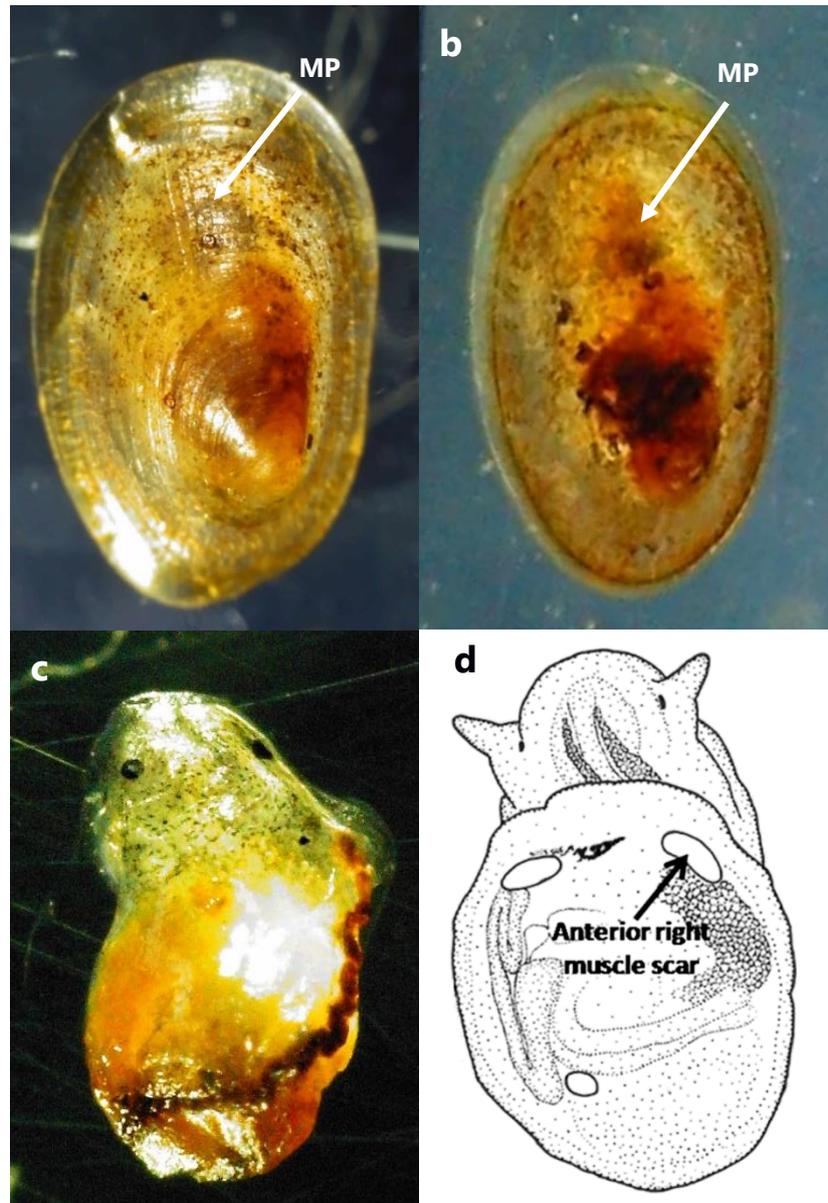
Figura 2

Observación de dibujos comparativos de entre F. fragilis y F. rivularis



Nota. Muestras de *F. fragilis* (A) del lago Kaban, Kazan y *F. rivularis* (B) del lago Crystal, Benton. Extraídos de (Walther et al., 2010) y (Tokinova, 2012)

Los especímenes analizados presentan una mancha de pigmentación oscura concentrada en la región anterior del techo del manto, figura 3a-b. Esta pigmentación en el techo del manto se encuentra ubicada entre las dos cicatrices musculares anteriores en descripciones de *F. fragilis*; la cicatriz muscular anterior derecha es alargada y colocada transversalmente en relación con la línea media del cuerpo, figura 8d (Lacerda et al., 2015) También cuenta con varias manchas pequeñas dispersas de pigmentación oscura en la cabeza, ver figura 8c. El manto es transparente, lo que permite la visualización de los órganos internos.

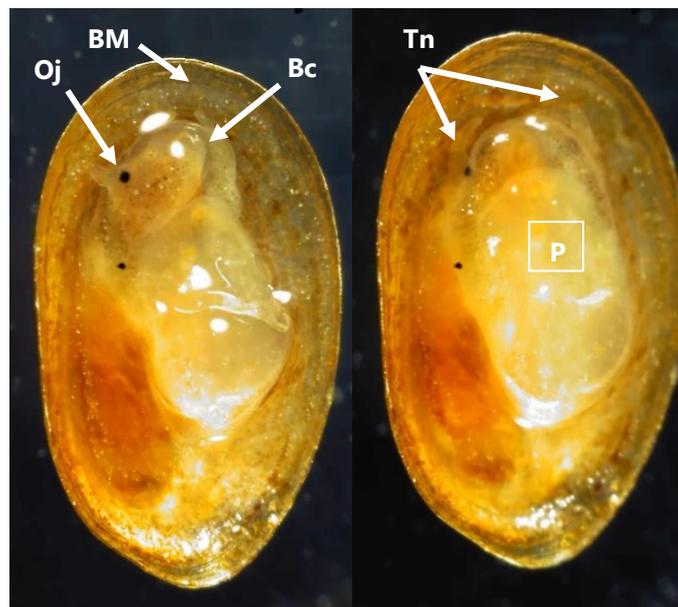
Figura 3*Vista superior de especímenes analizados*

Nota. a-b Vista dorsal de la concha, mostrando la mancha de pigmentación (Mp) ubicada en la región anterior del manto. c. Vista dorsal de partes blandas del organismo d. Ilustración de Lacerda del patrón de las cicatrices musculares de *F. fragilis* (Lacerda et al., 2015).

Los tentáculos de los especímenes son cortos y redondeados, con una base que tiende a ser triangular (ver Figura 4a; característica que los distingue de los de otros géneros como *Gundlachia* Pfeiffer, 1849, que poseen tentáculos largos, de casi el doble de longitud que los tentáculos de *Ferrissia* (Lacerda et al. 2011, 2013). Poseen un pie corto y redondeado, cuyo su extremo posterior no sobresale del caparazón del organismo en vida (ver Figura 4b

Figura 4

Vista ventral de los organismos



Nota. Los ojos (Oj) están ubicados en la base del par de tentáculos (Tn). El manto y el borde del manto (BM) se observa transparente. El pie (P) no supera el margen posterior.

3.1.3 *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863)

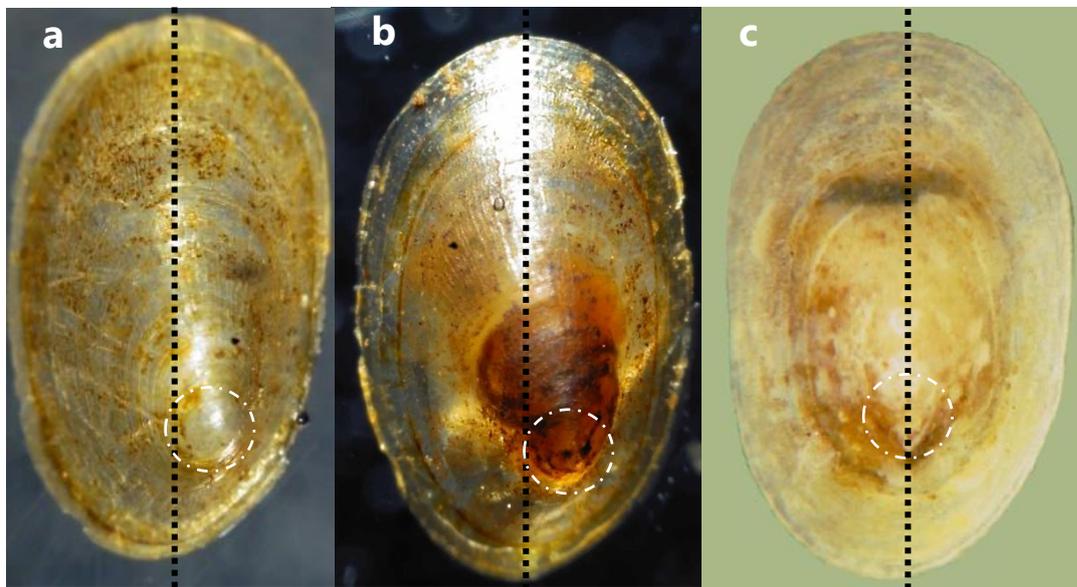
Las conchas de esta especie se presentan como delgadas y translúcidas en comparación a otras especies como *F. rivularis* (Dillon & Herman, 2009). Estas muestran un desplazamiento de la parte superior de la concha hacia la derecha respecto a su eje longitudinal, figura 5; característica las hace distinguibles de otras especies del género *Acroloxus* y *Ancylus*.

La longitud de las conchas de *F. fragilis* varía de 1,2 a 3,5 mm, y el tamaño máximo de *F. fragilis* alcanza los 3,7 mm. (Tokinova, 2012). Siendo esta una de las especies más pequeñas, cuya longitud total no supera los 4mm (Tryon, 1863) . Datos correspondientes a las medidas obtenidas en este estudio, ver figura 6.

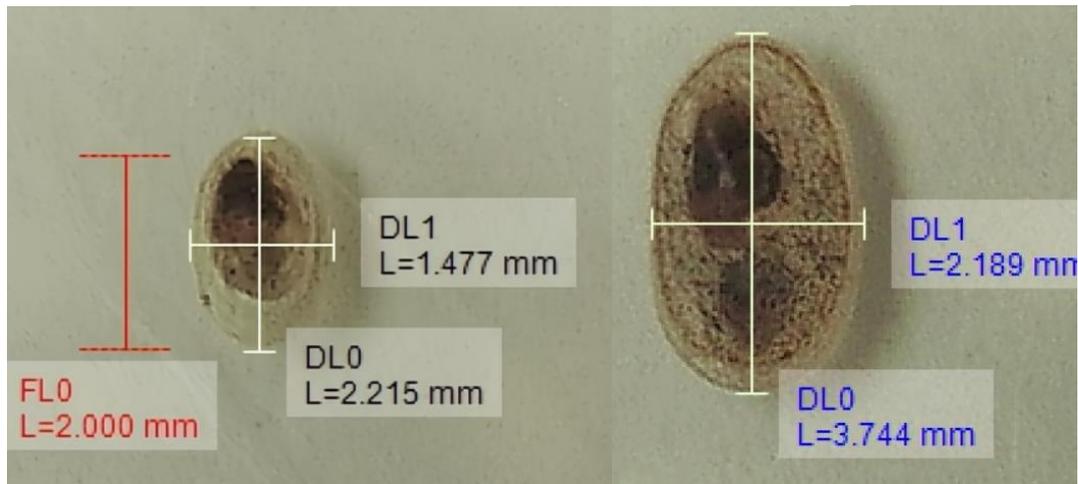
En el estudio, se tomaron 2 medidas de la concha en las muestras criadas en cultivo. La longitud estándar se tomó como la dimensión más larga de la concha, y el ancho fue la dimensión máxima perpendicular a la longitud en el plano del sustrato (McMahon, 2004).

Figura 5

Vista dorsal de las conchas de especímenes de estudio.



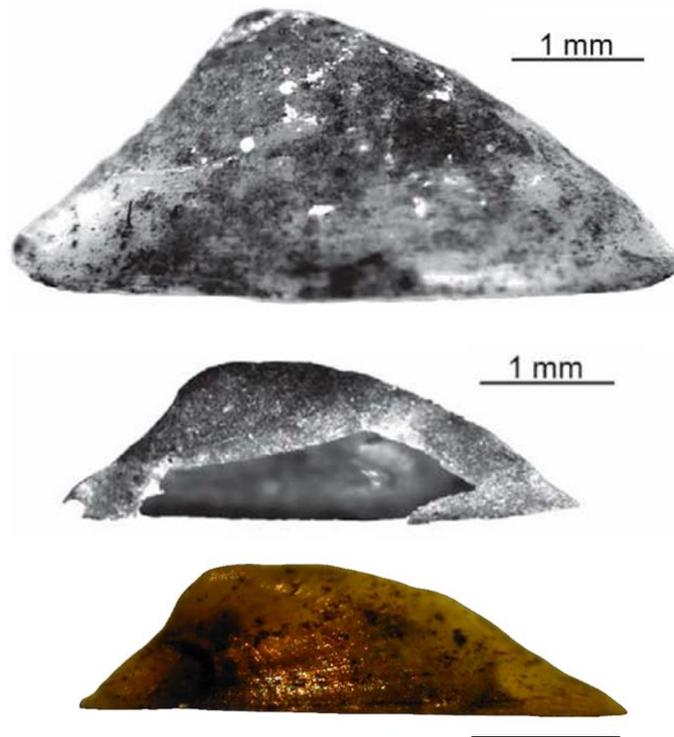
Nota. a-b Observación de ápice desplazado a la derecha respecto a eje longitudinal. Conchas translucidas c. Vista dorsal de la concha de *F. rivularis*. Extraída de la colección del proyecto “The Freshwater Gastropods of North America”, FWGNA, 2019.

Figura 6*Medidas conquiológicas de especímenes*

Notas. a. Especimen con dimensiones más pequeñas. B. Especimen con las medidas máximas dentro del estudio. DL1: Ancho. DL0: Longitud. FL0: Regla 2mm

Se consideran las descripciones del ápice de la concha como características claves en su identificación a nivel de especie. *F. fragilis* se describe con un ápice elevado, agudo a semiagudo, curvado hacia atrás, con aproximadamente 2/3 de la concha anterior a él (Tryon, 1863).

Los organismos estudiados presentan esas características, así como una excentricidad del ápice más pronunciada, con orientación hacia abajo y posterior a la cúspide de la concha; característica que ha permitido su distinción de *F. rivularis*. En la figura 7 se observan como los especímenes comparten rasgos distintivos del ápice con el holotipo de *F. fragilis*.

Figura 7*Vista lateral comparativa de especímenes*

Nota. a. Fotografía lateral de referencia de colección de museo del espécimen *F. rivularis* designada como sintipo. b. Fotografía lateral de referencia de colección de museo del espécimen *F. fragilis* designada como holotipo. c. Vista lateral de concha de especímenes colectados. Regla representa 1mm.

3.2 Discusión de detalles morfológicos

La familia de lapas de agua dulce Ancyliidae se encuentra entre los gasterópodos de agua dulce más omnipresentes, distribuidos en casi todos los continentes, excepto en la Antártida. Ocupando desde canales permanentes hasta arroyos rápidos y orillas de ríos y lago. Estos gasterópodos se caracterizan por sus conchas pateliformes, bajas y con amplias aperturas, diferenciándose de las conchas espirales de otros caracoles (Walther, 2008). Como especies pulmonadas, los ancilínidos tienen conchas ligeras y son hermafroditas, adaptaciones que les permiten colonizar una amplia gama de nichos acuáticos. Este grupo de lapas de agua dulce ha sido relativamente poco estudiado desde los trabajos clásicos de Paul

Basch. Esta falta de estudio ha sido atribuida a la incertidumbre taxonómica que persiste entre las especies de esta familia.

Ferrissia es el género más complejo dentro de la familia Ancyliidae y probablemente el que ha demostrado una mayor distribución, Según los estudios de (Basch, 1963) (Hubendick, 1967). Esta se encuentra en Europa, Asia, África, Australia , América del Norte, Central y del Sur. La forma y ubicación del ápice, la estructura de la microsculptura apical, la forma y elevación de la concha, y las cicatrices musculares, se han reportado como características morfológicas fundamentales para la identificación de especies dentro del género Ferrissia (Gómez et al., 2004). Sin embargo, el alto nivel de La variabilidad morfológica de las conchas de moluscos que han sido reportadas en habitats similares en diferentes reportes, destaca una alta plasticidad en la morfología de las conchas de Ferrissia. Esto se asocia las condiciones de su hábitat, debido a que estas ocasionan una impronta en la forma y el tamaño de sus conchas, es decir, determinan las variaciones eco fenotípicas (Dillon & Herman, 2009).

La taxonómica y sistemática del género Ferrissia ha tenido una evolución a lo largo del tiempo, siendo así las especies clasificadas y reagrupadas debido a la comprensión de la plasticidad morfológica influenciada por factores ecológicos.

La clasificación inicial de Basch reconoció cinco especies en el género Ferrissia basadas principalmente en criterios morfológicos de las conchas, en la distribución de las especies y su ecología. *F. rivularis*, se describe que habitaba en piedras, en ambientes de agua corriente o loticos. De esa manera, esta especie parece estar adaptada a superficies duras y a condiciones de flujo constante. Mientras *F. fragilis*, se encontraba en vegetación y escombros orgánicos en aguas corrientes; pudiendo encontrarse en plantas de hojas anchas en ambientes lénticos o de agua estancada. *F. paralela*, estaba presente en plantas de hojas estrechas en

ambientes lénticos, y *F. walkeri*, Se encontraba en plantas de hojas anchas en ambientes lénticos, mientras que *F. mcneill* era endémica de Alabama.

Debido a la gran plasticidad ecotípica observada en las conchas, esta clasificación fue revisada para luego combinar las cinco especies descritas por Basch en solo dos especies. *F. parallela* fue subsumida bajo *F. rivularis*, y *F. Walker* y *F. mcneilli* fueron subsumidas bajo *F. fragilis*. Así mismo, otras especies reportadas alrededor del mismo tiempo, tales como *F. shimemkii*, y *F. hendersoni* fueron reconocidas como sinónimos menores de *F. fragilis* (Walther et al., 2010). Lo que refuerza la idea de que *F. fragilis* tiene una alta capacidad de adaptación a diferentes hábitats, desde zonas de flujo hasta ambientes estancados y regiones geográficas específicas.

Originalmente, *Ferrissia fragilis* fue descrita por Tryon en 1863, y al mismo tiempo, otros especímenes similares fueron identificados y nombrados en distintas localidades, como *Ferrissia californica* por Rowell (Tryon, 1863) (Rowell, 1863).

Sin embargo, gracias a la revisión filogenética realizada por Walther, se ha podido consolidar la calificación de varias especies dentro del género *Ferrissia*. De esa manera, se redujo la diversidad nominal a la presencia de dos especies principales de *Ferrissia* en norte América, *Ferrissia (Ferrissia) rivularis* y *Ferrissia (Kincaidilla) fragilis* (Walther et al., 2010).

Estas 2 únicas especies que se tomaron como base para las comparaciones morfológicas y taxonómicas. Basado en eso, se determinó a *Ferrissia californica* (Rowell), como sinónimo junior de *Ferrisia fragilis* (Tyron).

3.2 Análisis molecular

3.2.1 Extracción de ADN de especímenes

Se extrajo el ADN de 30 especímenes de lapas por el método de HOTSHOT. Inicialmente la visualización del ADN genómico extraído no fue posible para todas las muestras, indicando que se encontraban bajo el umbral de visualización.

Para determinar la concentración de ADN se realizaron cuantificaciones por medio del Nanodrop, usando el método de absorbancia tomando 10 muestras al azar, ver tabla

Las concentraciones del ADN extraído permitieron amplificar eficientemente la región folmer durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Tabla 2

Concentración (ng/uL) de ADN en las muestras obtenidas

Muestra extraída	Concentración ADN (ng/μL)	Relación A₂₆₀/A₂₈₀	Relación A₂₆₀/A₂₃₀
M1	23.9	1.55	0.55
M2	42.2	1.49	0.46
M3	2.5	1.62	1.31
M4	2.9	1.55	1.04
M5	4.5	1.55	0.93
M6	4.6	1.95	0.80
M7	2.1	1.47	2.96
M8	21.7	1.53	0.63
M9	36.6	1.52	0.55
M10	82.4	1.46	0.51

3.2.2 Amplificación de region COI

El gen de la subunidad 1 (COI) del citocromo oxidasa mitocondrial es uno de los marcadores más populares utilizados en sistemática molecular. Particularmente la región cerca del extremo 5' que utiliza el DNA Barcoding Consortium, la region Folmer con una extensión de ~650bp; conocida así porque está flanqueada por cebadores universales que se han empleado con éxito para varios taxones de metazoos (Folmer et al., 1994).

El fragmento COI (Cytochrome Oxidase I) es una región del ADN mitocondrial que se utiliza comúnmente en estudios de identificación de especies, especialmente en el código de barras de ADN (Hebert et al., 2003a)

Esta región es altamente conservada entre diferentes especies, es decir, que existen una alta tasa de sustitución permitiendo la identificación entre diferentes especies dentro del mismo género (Hebert et al., 2003b). De esa manera, se determinó a la region folmer como objetivo de amplificación. Los primers universales conocidos para la amplificación de una región de 710 pb de COI son los LCO1490: 5'-ggccaacaatacataaagatattgg-3' y HC02198: 5'-taaacttcagggtgaccaaataca-3 (Folmer et al., 1994). A partir de estos cebadores, en el estudio se usó una versión degenerada de este par de primers combinado con los pares de primers COI_f (fwhF2) y COI_r (fwhR2n), tabla 2. Se establecieron dos sets, organizados de la manera ilustrada en la figura 8.

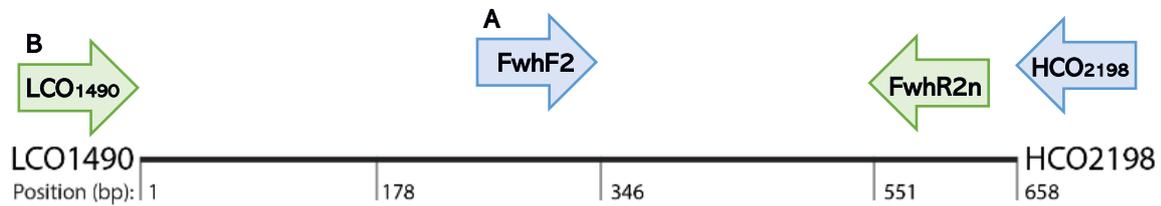
Tabla 3

Primers usados en el estudio para flanquear la región Folmer

Primers	Secuencia (5' – 3')	Basados en:
dgHCO	TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAAYCA	(Folmer et al., 1994)
dgLCO	GGTCAACAAATCATAAAGAYATYGG	
COI_f (fwhF2)	GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC	(Vamos et al., 2017)
COI_r (fwhR2n)	GTRATWGCHCCDGCTARWACWGG	

Figura 8

Ilustración de los segmentos de la región Folmer flanqueados por combinación de primers



Nota: Se observa que el set A) Forward: COIf (fwhF2), Reverse: HCO 2198 amplifica una región de 551bp, mientras que el set B) Forward: LCO 1490, Reverse: COIr(fwhr2n) amplifica una región de 312

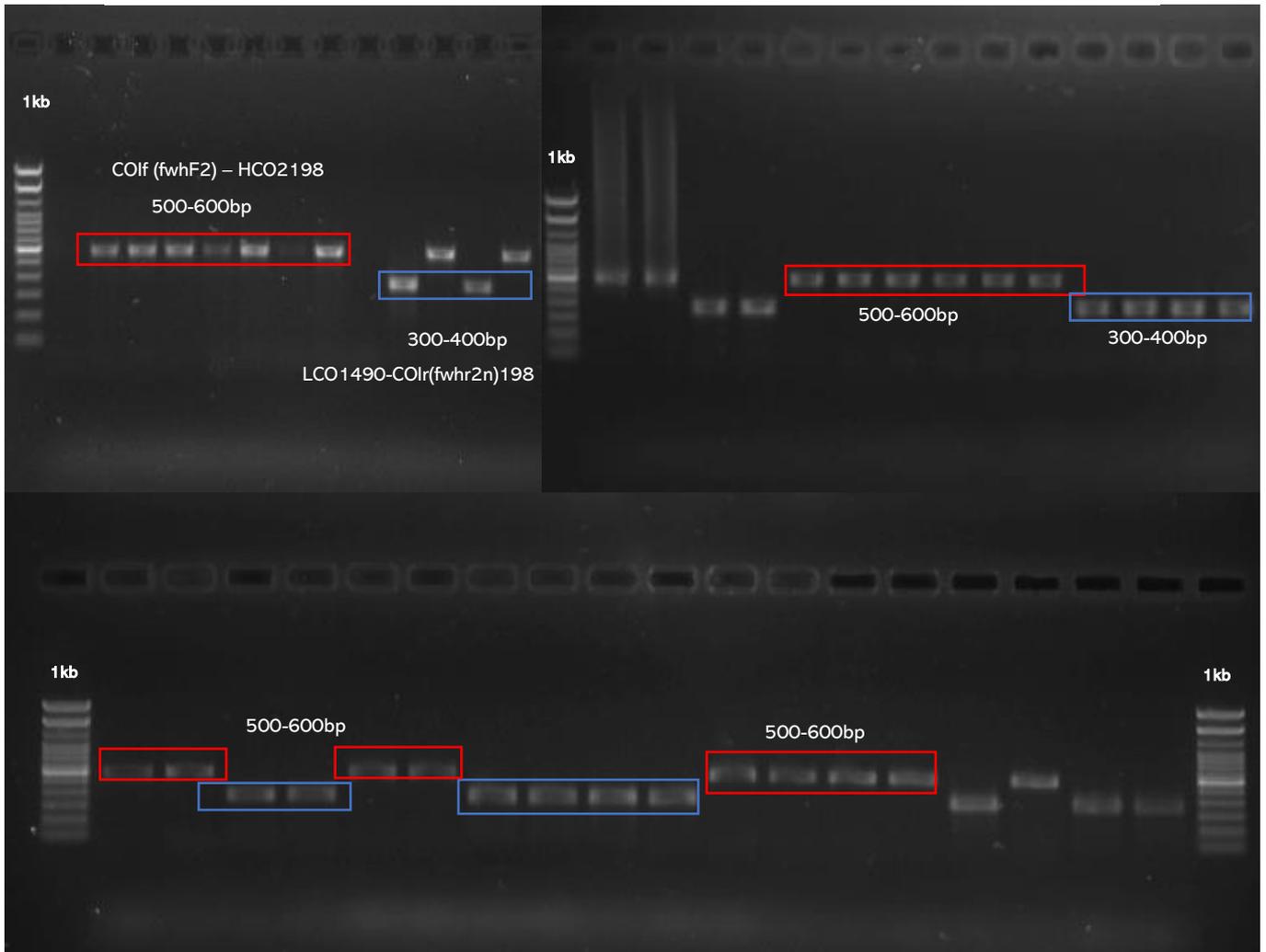
Las amplificaciones de estos fragmentos fueron observadas en gel de agarosa a una concentración del 2%. Obteniendo así 2 bandas para cada set de primers.

Las bandas de 550-600bp correspondieron a la mezcla del set A y las bandas de 300-350 bp correspondieron a la mezcla del segundo set de primers, ver figura 9.

Esta combinación se dio gracias a la efectividad que tienen los cebadores al amplificar regiones más cortas en estudios que dependen de ADN altamente degradado o mal conservado. Así mismo, se ha reportado que los cebadores que incorporan bases degeneradas en el extremo 3' presentan una mejor eficiencia en la amplificación en comparación con cebadores sin bases degeneradas (Elbrecht & Leese, 2017), lo que los hace ideal para este tipo de análisis.

Figura 9

Amplificación de fragmento de región COI, flanqueadas por el set de primers



3.3 Análisis bioinformático

Figura 10

Secuencias ensambladas de 28 especímenes de estudio en el software Ugene



Nota. Se obtuvieron secuencias de nucleótidos de ~650bp para la región mtCOI

Se realizó un alineamiento múltiple usando Mutiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE) de todas las secuencias de mtCOI obtenidas de los especímenes para determinar presencia de duplicados (Edgard, 2004). Todas las secuencias se presentaron idénticas, vea figura 10.

De esa manera se determinó que en la población muestreada solo se analizó una identidad genética. Los análisis filogenéticos se realizaron posteriormente con 2 genotipos obtenidos.

El alineamiento múltiple incluyendo las secuencias de estudio y las seleccionadas como outgroup fue limpiado y curado usando la herramienta **Gblocks** que está basado en la selección de bloques conservados para su uso en el análisis filogenético (Talavera & Castresana, 2007).

El método de inferencia seleccionado se basa en un enfoque de máxima verosimilitud (ML). Bajo este enfoque se logra identificar el árbol evolutivo que tiene la mayor probabilidad de haber generado los datos observados, dado un modelo de evolución previamente seleccionado. Este método evalúa diferentes árboles posibles y calcula la probabilidad de que las secuencias genéticas observadas hayan evolucionado de acuerdo con cada árbol bajo el modelo elegido, devolviendo el árbol con la máxima probabilidad (Yang & Rannala, 2012).

Se empleo el software de Análisis de genética evolutiva molecular, MEGA11 (Tamura et al., 2021) para determinar los modelos de sustitución de nucleótidos óptimos que se ajustan al método de Máxima Verosimilitud, vea figura 11. Los modelos que describen mejor el patrón de sustitución fueron (GTR) General Time Reversible y (HKY) Hasegawa-Kishino-Yano con distribuciones gamma G+ y asumiendo que una determinada fracción de sitios son evolutivamente invariables (+I), figura 11.

Este análisis de selección de modelos fue igualmente corroborado mediante el Smart Model Selection” (SMS) que está implementado en el entorno de PhyML (Lefort et al., 2017).

Figura 11

Análisis en MEGA del modelo evolutivo para inferencias por método de Maximun likelihood.

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)
HKY+G	266	11566.044	9081.835	-4274.075	n/a	0.23	1.83	0.261	0.440	0.134	0.166	0.069	0.021	0.114	0.041	0.092
HKY+G+I	267	11568.434	9074.892	-4269.597	0.46	0.77	1.87	0.261	0.440	0.134	0.166	0.068	0.021	0.115	0.040	0.092
GTR+G+I	271	11573.286	9042.413	-4249.332	0.48	1.00	1.65	0.261	0.440	0.134	0.166	0.113	0.011	0.110	0.067	0.096
GTR+G	270	11574.680	9053.141	-4255.702	n/a	0.25	1.58	0.261	0.440	0.134	0.166	0.114	0.010	0.110	0.068	0.094
TN93+G	267	11575.890	9082.348	-4273.325	n/a	0.23	1.80	0.261	0.440	0.134	0.166	0.070	0.021	0.122	0.041	0.086
T92+G	264	11577.659	9112.115	-4291.228	n/a	0.23	1.78	0.350	0.350	0.150	0.150	0.056	0.024	0.102	0.056	0.102
TN93+G+I	268	11578.354	9075.480	-4268.885	0.46	0.77	1.85	0.261	0.440	0.134	0.166	0.068	0.021	0.119	0.040	0.090
T92+G+I	265	11580.512	9105.636	-4286.982	0.46	0.75	1.82	0.350	0.350	0.150	0.150	0.055	0.024	0.103	0.055	0.103
GTR+I	270	11630.955	9109.415	-4283.839	0.60	n/a	1.48	0.261	0.440	0.134	0.166	0.122	0.011	0.103	0.072	0.095
HKY+I	266	11634.796	9150.587	-4308.451	0.60	n/a	1.62	0.261	0.440	0.134	0.166	0.075	0.023	0.110	0.044	0.088
TN93+I	267	11645.915	9152.373	-4308.338	0.59	n/a	1.60	0.261	0.440	0.134	0.166	0.075	0.023	0.115	0.045	0.085

Nota. Se muestran los 11 modelos con menores puntuaciones del criterio de información bayesiano (BIC).

3.4 Análisis filogenético

Se seleccionó el modelo HKY85 para describir la evolución de las secuencias de ADN. En este modelo se aplican las siguientes suposiciones claves: Se distinguen diferentes tasas entre transiciones y transversiones, lo que es crucial ya que las transiciones suelen ser más probables que las transversiones debido a similitudes químicas entre las bases nucleotídicas. Se reconoce las frecuencias desiguales de los nucleótidos, permitiendo que las diferencias en la abundancia de A, T, C y G sean consideradas en el análisis. Operando bajo un proceso de Markov de tiempo continuo, el modelo asume que la probabilidad de cambio de un nucleótido solo depende del estado actual, lo que simplifica el cálculo al ignorar la historia de cambios anteriores. Así mismo, sigue un supuesto de estacionariedad que implica que las frecuencias de los nucleótidos se mantienen constantes a lo largo del tiempo, lo que es una aproximación útil para muchos conjuntos de datos evolutivos (Hasegawa et al., 1985) (1985)

El método bootstrap, que se basa en el remuestreo y las réplicas, es uno de los métodos más ampliamente usados para evaluar la solidez de las inferencias filogenéticas. En el estudio se usó la combinación del método de Bootstrap de Proporciones de Felsenstein

(FBP), conocido como el bootstrap tradicional, y el método de expectativa de Bootstrap de Transferencia (TBE), como metodología más reciente que proporciona una medida más robusta y menos sesgada de la confianza en las ramas de un árbol filogenético (Lemoine et al, 2018).

Sh-like ALRT entra en la categoría de Las pruebas más conservadoras, siendo esta extremadamente rápida y con la mayor potencia entre las pruebas no paramétricas. Su aplicación se ha reportado efectiva cuando el modelo evolutivo tiene violaciones graves, es decir que las suposiciones que se hace en cada modelo no se cumplan. Mientras que el método aBayes o *à la Bayes*, es capaz de satisfacer aproximadamente la interpretación probabilística en casos en los que los supuestos del modelo no se violan gravemente (Anisimova et al, 2011).

Estas suposiciones son la estacionariedad, la reversibilidad y la homogeneidad (SRH) de las tasas de sustitución. La estacionariedad asume que las frecuencias de los nucleótidos o aminoácidos se mantienen constantes a lo largo del tiempo. La reversibilidad presupone que el proceso evolutivo es no dirigido, con tasas de sustitución iguales en ambas direcciones entre nucleótidos o aminoácidos. La homogeneidad implica que las tasas de sustitución son constantes a lo largo del árbol filogenético o en cualquier parte de este (Naser et al, 2019)

La comparación de los árboles en la figura 12 muestra que mientras la estructura filogenética básica se mantiene, los diferentes métodos de soporte de ramas pueden influir en cómo se percibe la solidez de las relaciones entre las especies. Aunque la topología general es similar, los valores de soporte en los nodos clave varían, con el Árbol A mostrando valores generalmente más altos debido al uso del método aBayes, que tiende a proporcionar estimaciones de confianza más optimistas comparado con el método SH-like aLRT utilizado en el Árbol B, mientras que al usar bootstrap de 1000 réplicas, se ofrece una visión más conservadora de la robustez de las ramas. Este último soporte usado, es capaz de reflejar los

niveles de confianza de las ramas en términos más numéricos y posiblemente más realistas. El árbol B, proporciona un soporte bayesiano aproximado como método rápido, pero bastante confiable. Este árbol muestra que las relaciones entre las especies dentro las ramas que conectan clados mayores muestran altos valores de soporte, sugiriendo que las estructuras de clado más grandes son robustas bajo este análisis. Por ejemplo, la rama que une *A_lapicidus* con *A_tapirulus* y *Ancylus_sp* muestra un soporte de 0.991223, y la rama que conecta a *G_cf_radiata* con *G_radiata* tiene un valor de soporte de 0.999999, indicando una muy alta confianza en estas relaciones. El árbol A proporciona valores de soporte basados en una prueba de verosimilitud, con una naturaleza más conservadora frente a aBayes. Las ramas con valores más bajos en este árbol, como *A_scalariformis* con *Ancylus_sp* con un valor de 0.46, indican menos confianza en estas relaciones específicas. Sin embargo, las ramas que conectan grupos mayores como la que une *F_rivularis* y *F_parallela* con otros clados presentan soportes altos (0.98 y 0.901 respectivamente), lo que sugiere una estructura filogenética bien respaldada. Por otro lado, el árbol C con Bootstrap con 1000 replicaciones, ofrece una medida conservadora de soporte.

Los valores observados para *F_fragilis_GU391093-1* con *F_fragilis_DQ328265-1* y otras secuencias de *F_fragilis*, se presentan más bajos en subclados individuales, indicativos de relaciones más complejas y posiblemente menos resueltas dentro de este grupo. Estos valores indican que, aunque hay un reconocimiento filogenético entre las secuencias, algunas relaciones dentro de este clado pueden ser menos claras o consistentes en las replicaciones de Bootstrap.

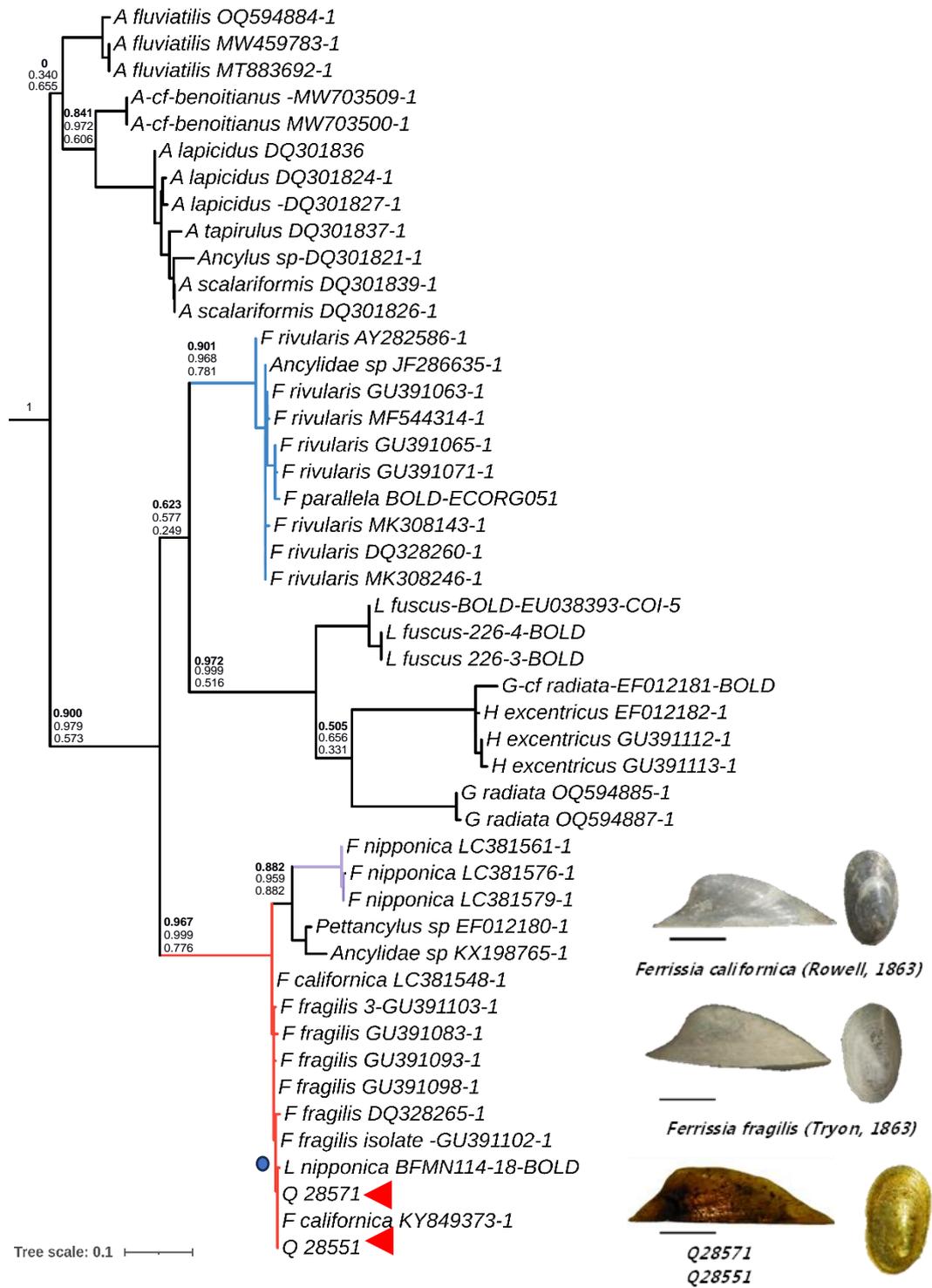
Nota. Se probaron 3 métodos de soporte de ramas para determinar la robustez del árbol filogenético: A. SH-like ALRT, B. aBayes, y C. Bootstrap (FBP+TBE). Los árboles presentan topologías similares con distintos métodos de soporte. En el Bootstrap de 1000, los valores se presentaron en frecuencias (1, indica que el 100% de las veces la rama se generó en esa posición).

3.5 Discusión de relaciones filogenéticas construidas

Mediante la generación del árbol filogenético de la región COI secuenciada de los organismos, se logró determinar una agrupación en un clado con especies de lapas del género *Ferrissia* para los especímenes de estudio (Q27571 Y Q28551), vea figura 13.

Un estudio de la ocurrencia de lapas invasoras en Japón de Vecchioni, indica que *Ferrissia nipponica* (Kuroda, 1949) ha sido reportada únicamente en Japón (Vecchioni et al., 2018). Si bien la evidencia genética confirma la presencia de una especie invasora, no es seguro si las especies reportadas como nativas, *Ferrissia nipponica* y *Ferrissia japonica* (HABE & Burch, 1965) son realmente distintas de *Ferrissia californica*. Esta ambigüedad surge de la falta de datos moleculares de las especies en estas localidades, lo que deja abierta la posibilidad de que estas especies puedan ser sinónimas de *F. californica*, y consecuentemente de *F. fragilis*, como se ha observado en casos similares en Europa y los EE. UU (Walther et al., 2006b) (Marrone et al., 2011). Para resolver esto, fue necesaria una caracterización molecular más profunda de las especies nativas japonesas de *Ferrissia*. El análisis realizado por el equipo de Takumi en el mismo año, fue capaz de dar luces. En el estudio, con posterior evidencia molecular, se revela que las 3 especies *F. nipponica*, *F. japonica* y *Gundlachia japonica* que han sido tradicionalmente consideradas nativas de Japón son en realidad *F. californica* no nativa, introducidas desde América del Norte (Takumi, et al, 2018).

Árbol filogenético basado en las secuencias de la región COI



Nota. Los tres valores en las ramas principales representan los valores de soporte, SH-like ALRT, aBayes, y Bootstrap, de arriba para abajo. Para cada secuencia minada se proporcionan los números de acceso de GenBank e ID en BOLD. Las secuencias de los especímenes de estudio están señaladas con marcas rojas en el árbol dentro del clado que agrupa a *F. californica*, *F. fragilis* y *F. californica*.

El espécimen de *Laevapex nipponica* (Kuroda, 1947) usado en la construcción el árbol filogenético y agrupado en el mismo clado con otras especies de *Ferrissia* en este estudio, sugiere un caso similar. Los únicos registros del espécimen se han generado en Japón, siendo depositados únicamente en BOLD systems con el identificador BFMN114. BOLD ha agrupado a este espécimen en el mismo Barcode Index Number (BIN), un sistema que genera unidades taxonómicas operacionales (OTUs) que corresponden estrechamente a especies. Esto es significativo, ya que el BIN es un sistema que genera unidades taxonómicas operacionales que están muy vinculadas a la identidad de las especies. El hecho de que *Laevapex nipponica* esté agrupado en el mismo BIN que otras *Ferrissia* podría indicar que hay una relación genética cercana entre estos taxones, lo que sugiere la necesidad de una revisión taxonómica para determinar si realmente son especies distintas o si se trata de un caso de sinonimia no resuelto.

Este espécimen está incluido dentro del clado de *F. californica*, y *F. fragilis*, considerando que se trata de una clasificación incorrecta realizada, y más bien pertenece al género *Ferrissia* analizado en este estudio. De esa manera, y gracias al análisis molecular realizado se infiere que los especímenes de estudios pertenecen a poblaciones de *F. fragilis* (= *F. californica*).

Capítulo 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

El protocolo modificado de extracción de ADN resultó efectivo, logrando concentraciones suficientes para la amplificación mediante PCR, incluso en muestras con concentraciones de ADN relativamente bajas. Esto demuestra que, aunque no fue posible visualizar el ADN directamente, su calidad y cantidad eran adecuadas para el análisis molecular con micro moluscos pese las dificultades impuestas por la baja cantidad de biomasa en las muestras colectadas.

Los datos de secuenciación analizados mediante herramientas bioinformáticas permitieron una identificación molecular precisa de los especímenes, confirmando su pertenencia al género *Ferrissia*. Esto respalda el uso de técnicas moleculares para la identificación de especies y proporciona una base sólida para futuros estudios en la región.

Los resultados del análisis morfológico y molecular permitieron identificar los especímenes estudiados como pertenecientes al género *Ferrissia*, con características compatibles con *F. fragilis*. Los resultados muestran que el análisis molecular, basado en la amplificación de la región COI, proporciona un nivel de precisión que respalda los análisis morfológicos previos, validando la identidad de los especímenes. Es esa manera, la combinación de métodos moleculares y morfológicos proporcionó una identificación más precisa que los estudios morfológicos tradicionales.

Las comparaciones con otros estudios y el análisis filogenético utilizando métodos de máxima verosimilitud reveló una estructura evolutiva coherente con agrupaciones clave entre las especies de *Ferrissia* a nivel global. Los especímenes locales mostraron una alta similitud genética con poblaciones descritas en otras regiones, lo que sugiere una relación genética

estrecha y una amplia distribución del grupo. De igual manera, el análisis realizado subraya la importancia de estudios filogenéticos detallados para entender las relaciones evolutivas y las dinámicas de especiación, proporcionando una base para investigaciones futuras en la diversificación de especies y sus respuestas adaptativas a los cambios ambientales.

4.2 Recomendaciones

Se recomienda continuar mejorando las técnicas de extracción de ADN, en especial para aquellos organismos con poca biomasa. Esto podría aumentar aún más el rendimiento del ADN y facilitar estudios moleculares futuros en especies de micro moluscos de difícil recolección.

Las características ecológicas destacadas de estas especies muestran adaptaciones a diferentes tipos de hábitats, desde aguas corrientes con superficies duras hasta ambientes lénticos con vegetación variada. Esto sugiere que, aunque la morfología de la concha es importante, la ecología también juega un papel crucial en la diferenciación y clasificación de las especies dentro del género. Por ese motivo, se recomienda la incorporación de estudios ecológicos adicionales que evalúen el papel de los moluscos dentro del ecosistema acuático del BPP, incluyendo su impacto en el ciclo de nutrientes y su interacción con otras especies.

La mayoría de los modelos filogenéticos hacen suposiciones simplificadoras para que los cálculos sean factibles y la interpretación sea directa. Cuando estas suposiciones no se cumplen, pero no se tienen en cuenta, los árboles filogenéticos resultantes pueden ser engañosos o incorrectos. Esto puede afectar análisis posteriores, como reconstrucciones de estados ancestrales o estimaciones de tiempos de divergencia. Por lo tanto, es crucial considerar la naturaleza de los datos y posiblemente emplear modelos o métodos más complejos que puedan manejar dichas violaciones cuando sean probablemente significativas.

La elección del método de soporte de ramas debe considerar el contexto específico del estudio, donde los métodos más conservadores, tales como Sh-like aLRT y Bootstrap tradicional pueden ser preferibles en situaciones que demandan una alta certeza en la estructura filogenética, como en la conservación de especies o en estudios de coevolución, donde se requiere una evaluación más rigurosa de la estabilidad de las ramas filogenéticas.

Bibliografía

- Abell, R., Thieme, M. L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., Coad, B., Mandrak, N., Balderas, S. C., Bussing, W., Stiassny, M. L. J., Skelton, P., Allen, G. R., Unmack, P., Naseka, A., Ng, R., Sindorf, N., Robertson, J., Armijo, E., ... Petry, P. (2008). Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *BioScience*, 58(5), 403–414. <https://doi.org/10.1641/B580507>
- Annabelle Cuttelod, Mary Seddon, & Eike Neubert. (2011). *European red list of non-marine molluscs*. Publications Office of the European Union. <https://data.europa.eu/doi/10.2779/84538>
- Aranishi, F., & Okimoto, T. (2006). A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle. *Journal of Applied Genetics*, 47(3), 251–254. <https://doi.org/10.1007/BF03194632>
- Balian, E. V., Lévêque, C., Segers, H., & Martens, K. (Eds.). (2008). *Freshwater Animal Diversity Assessment*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7>
- Basch, P. (1959). *The anatomy of Laevapex fuscus, a freshwater limpet (Gastropoda: Pulmonata)*. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-anatomy-of-Laevapex-fuscus%2C-a-freshwater-limpet-Basch/e7dd19745d05aac09031cb39afdea7b378c4c48b>
- Basch, P. F. (1963). *A review of the recent freshwater Limpet snails of North America: (Mollusca: Pulmonata)*. Museum of Comparative Zoology.
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2010). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 38(Database issue), D46–D51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1024>

- Böhm, M., Dewhurst-Richman, N. I., Seddon, M., Ledger, S. E. H., Albrecht, C., Allen, D., Bogan, A. E., Cordeiro, J., Cummings, K. S., Cuttelod, A., Darrigran, G., Darwall, W., Fehér, Z., Gibson, C., Graf, D. L., Köhler, F., Lopes-Lima, M., Pastorino, G., Perez, K. E., ... Collen, B. (2021). The conservation status of the world's freshwater molluscs. *Hydrobiologia*, 848(12–13), 3231–3254. <https://doi.org/10.1007/s10750-020-04385-w>
- Breure, A., Roosen, M., & Ablett, J. (2022). Land and freshwater molluscs of mainland Ecuador: An illustrated checklist. *Iberus*, 40, 1–290.
- Cadena Cazar, M., & Yanez Rojas, A. (2009). *Evaluación del potencial turístico-recreativo del lago de la ESPOL*. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/1814>
- Celi, J. E., & Villamarín, F. (2020). Freshwater ecosystems of Mainland Ecuador: Diversity, issues and perspectives. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 32, e106. <https://doi.org/10.1590/s2179-975x3220>
- Chakraborty, S., Saha, A., & Neelavar Ananthram, A. (2020). Comparison of DNA extraction methods for non-marine molluscs: Is modified CTAB DNA extraction method more efficient than DNA extraction kits? *3 Biotech*, 10(2), 69. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2051-7>
- Collen, B., Whitton, F., Dyer, E. E., Baillie, J. E. M., Cumberlidge, N., Darwall, W. R. T., Pollock, C., Richman, N. I., Soulsby, A.-M., & Böhm, M. (2014). Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. *Global Ecology and Biogeography*, 23(1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/geb.12096>
- Dillon, R. T., & Herman, J. J. (2009). Genetics, Shell Morphology, and Life History of the Freshwater Pulmonate Limpets *Ferrissia rivularis* and *Ferrissia fragilis*. *Journal of Freshwater Ecology*, 24(2), 261–271. <https://doi.org/10.1080/02705060.2009.9664291>
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A.

- (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(2), 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment. *Frontiers in Environmental Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00011>
- Faghihinia, M., Xu, Y., Liu, D., & Wu, N. (2021). Freshwater biodiversity at different habitats: Research hotspots with persistent and emerging themes. *Ecological Indicators*, 129, 107926. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107926>
- Folmer, O., Black, M., Wr, H., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Gómez, M. I., dos Santos, S. B., & Roldán, G. (2004). ANCYLIDAE FROM THE DEPARTMENT OF ANTIOQUIA — COLOMBIA, WITH NEW RECORDS (PULMONATA, BASOMMATOPHORA) / Ancyliidae de Antioquia-Colombia, nuevos registros (Pulmonata, Basommatophora). *Caldasia*, 26(2), 439–443. <https://www.jstor.org/stable/23641845>
- Gozlan, R., Karimov, B., Zadereev, E., Kuznetsova, D., & Brucet, S. (2019). Status, trends, and future dynamics of freshwater ecosystems in Europe and Central Asia. *Inland Waters*, 9, 1–17. <https://doi.org/10.1080/20442041.2018.1510271>
- Graf, D. (2007). Palearctic freshwater mussel (Mollusca: Bivalvia: Unionoida) diversity and the Comparative Method as a species concept. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 156, 71–88. [https://doi.org/10.1635/0097-3157\(2007\)156\[71:PFMMBU\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1635/0097-3157(2007)156[71:PFMMBU]2.0.CO;2)

- Graterol, L. A., Cabrera, G. A. P., Chacín, L. D. C., & Ruiz, R. F. (2020). Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN genómico en babosas plagas (mollusca: Gasterópoda). *REVISTA CIENTÍFICA ECOCIENCIA*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.21855/ecociencia.74.380>
- Green, P. A., Vörösmarty, C. J., Harrison, I., Farrell, T., Sáenz, L., & Fekete, B. M. (2015). Freshwater ecosystem services supporting humans: Pivoting from water crisis to water solutions. *Global Environmental Change*, 34, 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2015.06.007>
- HABE, T., & Burch, J. B. (1965). A new species of freshwater limpet, genus *Ferrissia*, from Japan. *Venus (Japanese Journal of Malacology)*, 24(1), 1–7. https://www.jstage.jst.go.jp/article/venusjjm/24/1/24_KJ00004340188/_article/-char/ja/
- Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2). <https://doi.org/10.1007/BF02101694>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. Biological Sciences*, 270 Suppl 1(Suppl 1), S96-99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Ho, L., & Goethals, P. (2020). Research hotspots and current challenges of lakes and reservoirs: A bibliometric analysis. *Scientometrics*, 124(1), 603–631. <https://doi.org/10.1007/s11192-020-03453-1>

- Horvath, Z. (2016). Transforming Our World—New Agenda and Goals for Sustainable Development. *Hungarian Yearbook of International Law and European Law*, 2016, 167.
<https://heinonline.org/HOL/Page?handle=hein.journals/huyiel2016&id=185&div=&collection=>
- Howard, J. K., & Cuffey, K. M. (2006). The functional role of native freshwater mussels in the fluvial benthic environment. *Freshwater Biology*, 51(3), 460–474.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2005.01507.x>
- Hubendick, B. (1964). *Studies on Ancyliidae: The subgroups*. [Wettergren & Kerber].
- Hubendick, B. (1967). *Studies on Ancyliidae.: The Australian, Pacific and Neotropical formgroups*. Almqvist & Wiksell.
- IPBES. (2018). *IPBES Guide on the production of assessments*.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.7568075>
- Khehra, N., Padda, I. S., & Swift, C. J. (2024). Polymerase Chain Reaction (PCR). In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>
- Köhler, F., Seddon, M., Bogan, A., Do, V., Sri-Aroon, P., & Allen, D. (2012). Chapter 4. The status and distribution of freshwater molluscs in the Indo-Burma region. In *The Status and Distribution of Freshwater Biodiversity in Indo-Burma* (pp. 67–88).
- Kruckenhauser, L., Duda, M., Bartel, D., Sattmann, H., Harl, J., Kirchner, S., & Haring, E. (2014). Paraphyly and budding speciation in the hairy snail (Pulmonata, Hygromiidae). *Zoologica Scripta*, 43(3), 273–288. <https://doi.org/10.1111/zsc.12046>
- Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., & Tamura, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 299–306. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>

- Kummu, M., de Moel, H., Ward, P. J., & Varis, O. (2011). How close do we live to water? A global analysis of population distance to freshwater bodies. *PloS One*, *6*(6), e20578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020578>
- Kuroda, H. S. (1949). *Protancylus (Laevapex) nipponicus*. 2.
- Lacerda, L., Richau, C., Amaral, C., Silva, D., Carvalho, E., & Santos, S. (2015). *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863): A freshwater snail cryptic invader in Brazil revealed by morphological and molecular data. *Aquatic Invasions*, *10*, 157–168. <https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.2.04>
- Lefort, V., Longueville, J.-E., & Gascuel, O. (2017). SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(9), 2422–2424. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx149>
- Luiza-Andrade, A., Montag, L. F. de A., & Juen, L. (2017). Functional diversity in studies of aquatic macroinvertebrates community. *Scientometrics*, *111*(3), 1643–1656. <https://doi.org/10.1007/s11192-017-2315-0>
- 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. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0321:TGDONM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0321:TGDONM]2.0.CO;2)
- Mansur, M. C. D., Pereira, D., Bergonci, P. E. A., Pimpão, D. M., Barradas, J. R. de S., & Sabaj, M. H. (2019). Morphological assessment of *Rheodreissena* (Bivalvia: Veneroidea: Dreissenidae) with an updated diagnosis of the genus, descriptions of two new species, redescription of *R. lopesi*, and the first account of larval brooding in New World dreissenids. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, *166*(1), 1–45. <https://doi.org/10.1635/053.166.0112>

- Marrone, F., Lo Brutto, S., & Arculeo, M. (2011). Cryptic invasion in Southern Europe: The case of *Ferrissia fragilis* (Pulmonata: Ancyliidae) Mediterranean populations. *Biologia*, 66, 484–490. <https://doi.org/10.2478/s11756-011-0044-z>
- McMahon, R. (2004). A 15-year study of interannual shell-shape variation in a population of freshwater limpets (Pulmonata: Basommatophora: Ancyliidae). *American Malacological Bulletin*, 19, 101–109.
- Molluscabase. (2020). *Molluscabase*. <https://www.molluscabase.org/>
- Montero-Pau, J., Gómez, A., & Muñoz, J. (2008). Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. *Limnology and Oceanography: Methods*, 6(6), 218–222. <https://doi.org/10.4319/lom.2008.6.218>
- Pereira, D., Mansur, M. C. D., Duarte, L. D. S., de Oliveira, A. S., Pimpão, D. M., Callil, C. T., Ituarte, C., Parada, E., Peredo, S., Darrigran, G., Scarabino, F., Clavijo, C., Lara, G., Miyahira, I. C., Rodriguez, M. T. R., & Lasso, C. (2014). Bivalve distribution in hydrographic regions in South America: Historical overview and conservation. *Hydrobiologia*, 735(1), 15–44. <https://doi.org/10.1007/s10750-013-1639-x>
- Popa, O., Murariu, D., & Popa, L. (2006). *Comparison of four DNA extraction methods from invasive freshwater bivalve species (Mollusca, Bivalvia) in Romanian fauna. L.*
- RATNASINGHAM, S., & HEBERT, P. D. N. (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x>
- Régnier, C., Achaz, G., Lambert, A., Cowie, R. H., Bouchet, P., & Fontaine, B. (2015). Mass extinction in poorly known taxa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(25), 7761–7766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502350112>

- Reid, A., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., Smol, J. P., Taylor, W. W., Tockner, K., Vermaire, J. C., Dudgeon, D., & Cooke, S. J. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 94(3), 849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Reid, W., Mooney, H., Cropper, A., Capistrano, D., Carpenter, S., & Chopra, K. (2005). *Millennium Ecosystem Assessment. Ecosystems and human well-being: Synthesis*.
- Rose, R., Golosova, O., Sukhomlinov, D., Tiunov, A., & Prospero, M. (2019). Flexible design of multiple metagenomics classification pipelines with UGENE. *Bioinformatics*, 35(11), 1963–1965. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-abstract/35/11/1963/5144668>
- Rowell, J. (1863). Description of a new California mollusk, discovered by Rev. Joseph Rowell, at Marysville, in the waters of Feather River. *Proceedings of the California Academy of Sciences, Series, 1*(3), 21–22.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Seddon, M., Appleton, C., Van Damme, D., & Graf, D. (2011). *Freshwater molluscs of Africa: Diversity, distribution, and conservation*. (pp. 92–119).
- Simone, L. R. L. de. (2006). *Land and freshwater molluscs of Brazil: An illustrated inventory on the Brazilian malacofauna, including neighbor regions of the South America, respect to the terrestrial and freshwater ecosystems*. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo.

- Sofi, M. Y., Shafi, A., & Masoodi, K. (2022). *BioEdit in bioinformatics* (pp. 231–236).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91128-3.00022-7>
- Stringer, C. A., & Prendergast, A. L. (2023). Freshwater mollusc sclerochronology: Trends, challenges, and future directions. *Earth-Science Reviews*, 247, 104621.
<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2023.104621>
- Strong, E. E., Gargominy, O., Ponder, W. F., & Bouchet, P. (2008). Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), 149–166.
<https://doi.org/10.1007/s10750-007-9012-6>
- Sweeney, P. J., & Walker, J. M. (1993). Proteinase K (EC 3.4.21.14). In M. M. Burrell (Ed.), *Enzymes of Molecular Biology* (pp. 305–311). Humana Press.
<https://doi.org/10.1385/0-89603-234-5:305>
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Systematic Biology*, 56(4), 564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tockner, K. (2021). Freshwaters: Global Distribution, Biodiversity, Ecosystem Services, and Human Pressures. In J. J. Bogardi, J. Gupta, K. D. W. Nandalal, L. Salamé, R. R. P. van Nooijen, N. Kumar, T. Tingsanchali, A. Bhaduri, & A. G. Kolechkina (Eds.), *Handbook of Water Resources Management: Discourses, Concepts and Examples* (pp. 489–501). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60147-8_16

- Tokinova, R. (2012). The first finding of the North American freshwater limpets *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) (Mollusca, Gastropoda) in the Middle Volga basin. *Russian Journal of Biological Invasions*, 3. <https://doi.org/10.1134/S2075111712010134>
- Tryon, Geo. W. Jr. (1863). Descriptions of Two New Species of Fresh Water Mollusca, from Panama. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 15, 146–146. <https://www.jstor.org/stable/4059762>
- Vamos, E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 1, e14625. <https://doi.org/10.3897/mbmg.1.14625>
- Vaughn, C. C. (2018). Ecosystem services provided by freshwater mussels. *Hydrobiologia*, 810(1), 15–27. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3139-x>
- Vaughn, C. C., & Hakenkamp, C. C. (2001). The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*, 46(11), 1431–1446. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2001.00771.x>
- Vaughn, S., & Jackson, C. (2022). Evaluating Methods of Preserving Aquatic Invertebrates for Microbiome Analysis. *Microorganisms*, 10, 811. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040811>
- Vecchioni, L., Marrone, F., Arculeo, M., & Meyer-Rochow, V. (2018). On the Occurrence of the Invasive Freshwater Limpet *Ferrissia californica* (Mollusca: Gastropoda: Planorbidae) in Japan. *Zoological Science*, 35, 149–152. <https://doi.org/10.2108/zs170149>
- Vera Morales, M., Naranjo Morán, J., Calle Delgado, M., & Pino Acosta, A. (2021). Evaluación ecológica rápida para un ciclismo de montaña responsable en el bosque seco tropical, Guayaquil, Ecuador. *Ecuadorian Science Journal*, 5(Extra 3), 1–11. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8266818>

- Volkmer-Ribeiro, C., Mansur, M. C. D., Pereira, D., Tiemann, J. S., Cummings, K. S., & Sabaj, M. H. (2019). Sponge and mollusk associations in a benthic filter-feeding assemblage in the middle and lower Xingu River, Brazil. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 166(1), 1–24. <https://doi.org/10.1635/053.166.0113>
- Walther, A. (2008). *A Systematic Study of North American Freshwater Limpets (Gastropoda: Hygrophila: Ancyliidae)*.
- Walther, A. C., Burch, J. B., & Foighil, D. Ó. (2010). Molecular Phylogenetic Revision of the Freshwater Limpet Genus *Ferrissia* (Planorbidae: Ancylinae) in North America Yields Two Species: *Ferrissia* (*Ferrissia*) *Rivularis* and *Ferrissia* (*Kincaidilla*) *Fragilis*. *Malacologia*, 53(1), 25–45. <https://doi.org/10.4002/040.053.0102>
- Walther, A. C., Lee, T., Burch, J. B., & Foighil, D. Ó. (2006a). E Pluribus Unum: A phylogenetic and phylogeographic reassessment of *Laevapex* (Pulmonata: Ancyliidae), a North American genus of freshwater limpets. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(2), 501–516. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.03.019>
- Walther, A. C., Lee, T., Burch, J. B., & Ó Foighil, D. (2006b). Confirmation that the North American ancyliid *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) is a cryptic invader of European and East Asian freshwater ecosystems. *Journal of Molluscan Studies*, 72(3), 318–321. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyl009>
- Wu, H., Guan, Q., Lu, X., & Batzer, D. P. (2017). Snail (Mollusca: Gastropoda) assemblages as indicators of ecological condition in freshwater wetlands of Northeastern China. *Ecological Indicators*, 75, 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.12.042>
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>

- Zhang, Y., Xu, S., Sun, C., Dumont, H., & Han, B.-P. (2021). A new set of highly efficient primers for COI amplification in rotifers. *Mitochondrial DNA Part B*, 6(2), 636–640. <https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1878951>
- Zieritz, A., Bogan, A. E., Froufe, E., Klishko, O., Kondo, T., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Lee, J. H., Lopes-Lima, M., Pfeiffer, J. M., Sousa, R., Van Do, T., Vikhrev, I., & Zanatta, D. T. (2018). Diversity, biogeography and conservation of freshwater mussels (Bivalvia: Unionida) in East and Southeast Asia. *Hydrobiologia*, 810(1), 29–44. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3104-8>