



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE POBLACIONES DEL
GASTERÓPODO *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966, SEPARADAS
POR LA SIERRA DE SAN MARCOS Y PINOS EN CUATROCIÉNEGAS,
COAHUILA, MÉXICO.**

Tesis que presenta:

Biól. Diana Gabriela Cordero Torres

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y ECOLOGÍA

Gómez Palacio, Dgo

Enero de 2023



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE POBLACIONES DEL
GASTERÓPODO *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966, SEPARADAS
POR LA SIERRA DE SAN MARCOS Y PINOS EN CUATROCIÉNEGAS,
COAHUILA, MÉXICO.

Tesis que presenta:

Biól. Diana Gabriela Cordero Torres

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y ECOLOGÍA

Dirección Interna:

Dr. José Luis Estrada Rodríguez

Dr. Alexander Czaja

Dra. Verónica Ávila Rodríguez

Dirección Externa:

Dra. Hortencia Obregón Barboza
Gómez Palacio, Dgo

Dr. Murugan Gopal

Enero de 2023



**UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



La tesis “**VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y GENÉTICA DE POBLACIONES DEL GASTERÓPODO *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966, SEPARADAS POR LA SIERRA DE SAN MARCOS Y PINOS EN CUATROCIÉNEGAS, COAHUILA, MÉXICO**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biodiversidad y Ecología fue elaborada por la **Biól. Diana Gabriela Cordero Torres** y aprobada en enero de 2023 por el **Comité de Tesis** designado por el Núcleo Básico de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

Presidente:

Dr. José Luis Estrada Rodríguez

Secretario:

Dr. Alexander Czaja

Vocal:

Dra. Hortencia Obregón Barboza

Suplente:

Dra. Verónica Ávila Rodríguez

CRÉDITOS INSTITUCIONALES



CENTRO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S.C.



Área de Protección de Flora y Fauna
CUATROCIÉNEGAS



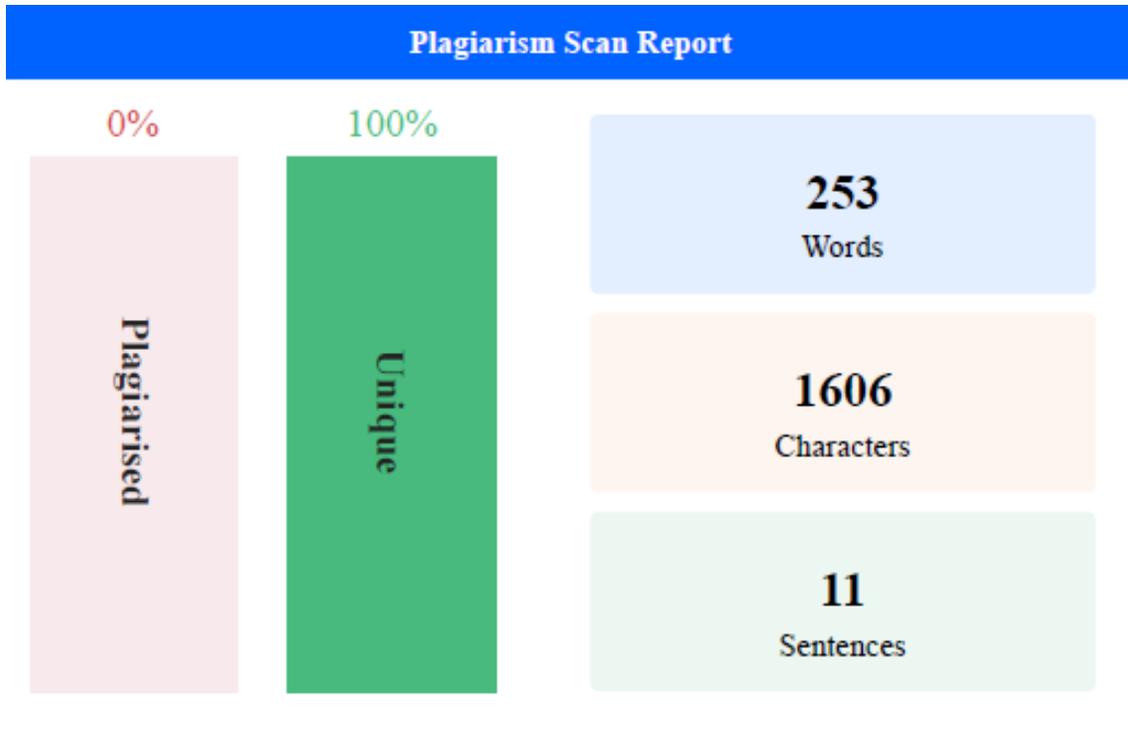
CONACYT
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

La tesis fue elaborada en el Laboratorio de Malacología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, y en el laboratorio de Biología Molecular de la misma facultad.

Durante la realización de este trabajo de investigación el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con No. de registro 1083187.

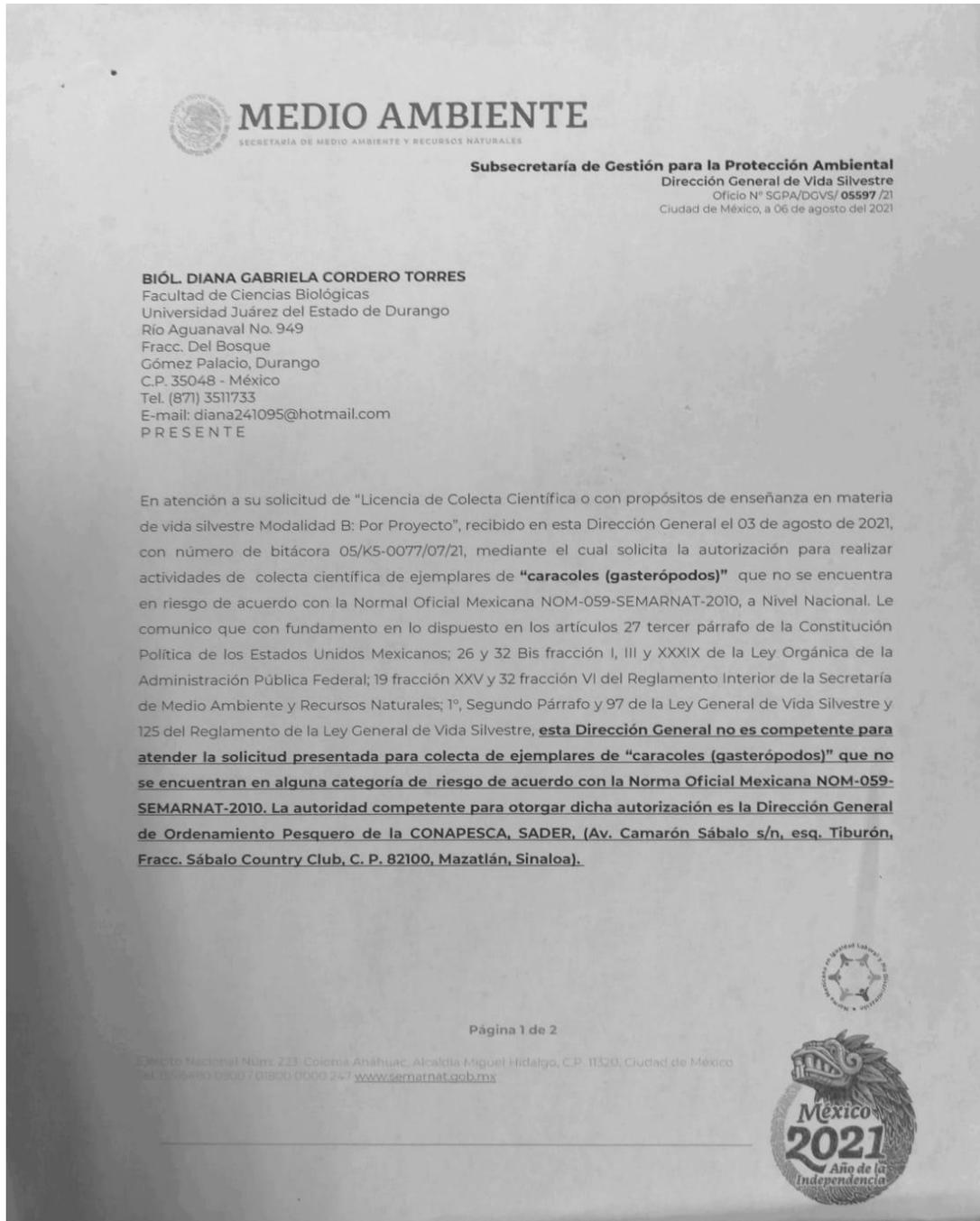
DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. Esta tesis es resultado de la investigación de la autora, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



PERMISO DE COLECTA

Se presentó la solicitud de permiso de colecta para los ejemplares aquí estudiados y esta fue la respuesta de SEMARNAT. En la literatura se menciona a la familia Hydrobiidae dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2019 pero al solicitar el permiso de colecta mencionan que no se encuentra dentro de la norma.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Juárez del Estado de Durango, la Facultad de Ciencias Biológicas, a la División de Estudios de Posgrado y a la comunidad que los conforma, quienes en su momento resolvieron dudas y apoyaron con lo necesario para poder terminar mis estudios de maestría y la presente tesis.

Al Dr. José Luis Estrada Rodríguez quien siempre ha brindado su confianza y apoyo incondicional en mi trabajo, por darme la oportunidad y alentarme a continuar en el camino de la investigación científica.

Al Dr. Alexander Czaja por siempre ayudarme en los trabajos de investigación que he realizado, ayudarme con la redacción y demás dudas que siempre aclara, por también confiar siempre en mi trabajo y apoyarme en todo lo que puede.

A la Dra. Hortencia Obregón Barboza y al Dr. Murugan Gopal por ser parte de este trabajo de tesis, por compartir sus conocimientos y trabajar conmigo en el laboratorio de manera presencial y virtual, siempre al pendiente de como iba avanzando el trabajo, porque a pesar de no obtener lo esperado, se adaptaron conmigo a los cambios que surgieron.

Al Dr. Alejandro Maeda, quien siempre ha brindado los consejos y ayuda para poder realizar el presente trabajo, por apoyar tanto en las clases dentro de la maestría y aún al terminarla, aportando ideas para la presentación de la tesis y confiando en que puedo continuar en este campo.

A la Dra. Verónica Ávila Rodríguez por apoyarme con todo lo relacionado a los análisis moleculares, con las dudas que fui presentando, y brindarme los medios para conocer las técnicas, los materiales y lo relacionado para trabajar en el laboratorio de Biología Molecular.

A los M.C. Eliel, M.C. Alma y M.C. Alondra del laboratorio de Biología Molecular así como también al Dr. Josafat, Arturo y la M. C. Perla quienes me apoyaron mientras estuve realizando las amplificaciones de mis muestras, brindando sus conocimientos y acompañandome en el laboratorio para aprender de ellos.

DEDICATORIA

A mi madre y padre, quienes han apoyado de manera incondicional mi formación profesional, aunque no la entiendan totalmente, por siempre creer en mí y en lo que puedo lograr. Por ser los dos un ejemplo de lo que es el trabajo duro, por ser personas que no se rinden y dejar eso como ejemplo para mí y mis hermanos. Por enseñarme a reinventarme, si una cosa no funciona se puede intentar otra para salir adelante.

A mis hermanos, por apoyarme, por confiar en mí y en que podré lograr cosas grandes, y siempre estar para festejar mis logros, aunque sea a la distancia.

A mis abuelos, Adrián y Peto, quienes, a pesar de ya no estar cerca de mí, siguen estando presentes en mi día a día.

A mi amigo del alma, Yahir, quien siempre me ha apoyado y confiado en las cosas que puedo lograr, siempre cuidándome y recordándome que está bien descansar. Festejando conmigo cuando las cosas salen bien y cuando no, también.

RESUMEN

Los gasterópodos de agua dulce son uno de los grupos más amenazados del mundo. Para organismos dulceacuícolas el aislamiento a largo plazo entre los drenajes y cuencas puede llevar a una divergencia genética considerable. El caracol de agua dulce *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966, es endémico de Cuatrociénegas, Coahuila. El objetivo del presente trabajo fue comparar la diversidad morfológica y genética entre las poblaciones del gasterópodo endémico *M. quadripaludium* de las pozas de los lados este y oeste de la Sierra de San Marcos y Pinos en Cuatrociénegas, Coahuila. Se estudiaron individuos de *M. quadripaludium* de seis sitios al este y oeste de la Sierra de San Marcos y Pinos. En el laboratorio de Malacología y Evolución de la FCB-UJED se realizó la identificación taxonómica y análisis morfométrico mediante un análisis MANOVA y discriminante. Se realizó la extracción de ADN en el laboratorio de biología molecular de la FCB-UJED con dos kits de la marca Qiagen y se probaron distintos ciclos térmicos para la amplificación de fragmentos del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) por PCR. Como resultados del análisis morfométrico la población que presentó diferencias significativas respecto a las otras fue la de poza La Becerra ($p < 0.05$) en todas las variables analizadas. En el caso del análisis molecular, a pesar de varios intentos, no se obtuvieron resultados positivos de las amplificaciones en *M. quadripaludium*. Para verificar la metodología de extracción y amplificación se usaron muestras del gasterópodo *Rabdotus* sp. como grupo externo, donde se logró la amplificación del gen COI y la secuenciación del fragmento. Los resultados del análisis MANOVA y discriminante indican que las poblaciones de ambos lados de la sierra pertenecen a la misma especie *M. quadripaludium*. Sin embargo, la existencia de diferencias morfométricas entre las agrupaciones del este y oeste de la sierra apuntan al inicio de una posible divergencia entre las metapoblaciones del caracol de Cuatrociénegas.

Palabras Clave: Gasterópodos, Diversidad genética, Cuatrociénegas, Desierto, Pozas de agua dulce.

ABSTRACT

Freshwater gastropods are one of the most threatened groups in the world. For freshwater organisms, long-term isolation between drainages can lead to considerable genetic divergence. The freshwater snail *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966, is endemic to Cuatrociénegas, Coahuila. The aim of this investigation was to compare the morphological and genetic diversity between the populations of the endemic gastropod *M. quadripaludium* on the east and west sides of the Sierra de San Marcos and Pinos in Cuatrociénegas, Coahuila. Individuals of *M. quadripaludium* were studied from six sites of east and west of the Sierra de San Marcos y Pinos. In the Malacology and Evolution laboratory of the FCB-UJED, taxonomic identification and morphometric analysis were carried out using a MANOVA and discriminant analysis. DNA extraction was performed in the FCB-UJED molecular biology laboratory with two Qiagen brand kits and different thermal cycles were tested for the amplification of fragments of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene by PCR. As results of the morphometric analysis, the population that presented significant differences with respect to the others was that of Poza La Becerra in all the variables analyzed ($p < 0.05$). In the case of molecular analysis, despite several attempts, no positive results were obtained from the amplifications in *M. quadripaludium*. To verify the extraction and amplification methodology, the gastropod *Rabdotus* sp. was used for the protocol as an external group, where the COI gene amplification and fragment sequencing were achieved. The results of the MANOVA and discriminant analysis indicate that the populations on both sides of the Sierra range belong to the same *M. quadripaludium* species. However, the existence of morphometric differences between the eastern and western groupings of the Sierra point to the beginning of a possible divergence between the metapopulations of the Cuatrociénegas snail.

Key words: Gastropods, Genetic diversity, Cuatrociénegas, Desert, Freshwater pools.

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	16
II.	JUSTIFICACIÓN.....	18
III.	OBJETIVOS.....	19
IV.	HIPÓTESIS.....	20
V.	ANTECEDENTES.....	21
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
VII.	RESULTADOS.....	36
VIII.	DISCUSIÓN.....	62
IX.	CONCLUSIONES.....	67
X.	RECOMENDACIONES.....	68
XI.	REFERENCIAS.....	69
XII.	ANEXOS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa con la ubicación de Cuatrociénegas, Coahuila.....	24
Figura 2. Mapa con la ubicación de las pozas muestreadas en el Valle de Cuatrociénegas.....	25
Figura 3. Parque Ilusión, Cuatrociénegas, Coahuila.....	26
Figura 4. Poza Mojarral, Cuatrociénegas, Coahuila.....	27
Figura 5. Poza Escobedo, Cuatrociénegas, Coahuila.....	28
Figura 6. Caracteres morfológicos de la concha de <i>Mexithauma quadripaludium</i> considerados para las mediciones.....	30
Figura 7. <i>Mexithauma quadripaludium</i> de Poza Mojarral. A. Vista frontal y B. Vista dorsal de la concha.....	36
Figura 8. Concha de <i>M. quadripaludium</i> de Parque Ilusión, Cuatrociénegas, Coahuila. Barra de escala 2mm.....	37
Figura 9. Protoconcha de <i>M. quadripaludium</i> de Parque Ilusión, Cuatrociénegas, Coahuila. Barra de escala 100um.....	37
Figura 10. Hembra de <i>M. quadripaludium</i> de Parque Ilusión aún con el opérculo adherido al pie.....	38
Figura 11. Conchas de crías de <i>M. quadripaludium</i> de la figura 10. Individuo A-B: SH= 0.9mm. Individuo C-D: SH= 0.6mm. Individuo E-F: SH= 0.7mm.....	39
Figura 12. Distribución de los datos de las pozas muestreadas, se muestran los centroides para cada poza.....	50
Figura 13. Gel de agarosa 1.5%, de <i>Rabdotus</i> sp.....	56
Figura 14. Gel de agarosa de amplificación de <i>Rabdotus</i> sp.....	59
Figura 15. Gel de agarosa de amplificación de <i>Rabdotus</i> sp.....	60
Figura 16. Gel de agarosa de la segunda amplificación de <i>M. quadripaludium</i>	76
Figura 17. Gel de agarosa de la tercera amplificación de <i>M. quadripaludium</i>	77

Figura 18. Gel de agarosa de la cuarta amplificación de *M. quadripaludium* con muestras diluidas.....78

Figura 19. Gel de agarosa de la quinta amplificación de *M. quadripaludium*.....80

Figura 20. Gel de agarosa de la última amplificación de *M. quadripaludium*.....82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Coordenadas geográficas de las pozas de Cuatrociénegas muestreadas.....	25
Tabla 2. Datos morfométricos de <i>Mexithauma quadripaludium</i> de Parque Ilusión.....	41
Tabla 3. Datos morfométricos de <i>Mexithauma quadripaludium</i> de Poza Mojarral...	42
Tabla 4. Datos morfométricos de <i>Mexithauma quadripaludium</i> de Poza Azul.....	43
Tabla 5. Datos morfométricos de <i>Mexithauma quadripaludium</i> de Poza La Becerra.....	44
Tabla 6. Datos morfométricos de <i>Mexithauma quadripaludium</i> de Poza Churince.....	45
Tabla 7. Pruebas multivariantes de las pozas (poblaciones) estudiadas.....	46
Tabla 8. Estadísticos descriptivos para cada una de las pozas estudiadas.....	47
Tabla 9. Prueba Post Hoc para las pozas analizadas.....	48
Tabla 10. Lecturas de concentración ng/μl de ADN y niveles de absorbancia 260/280 obtenidos de las extracciones con el kit DNeasy Spin-column.....	52
Tabla 11. Lecturas de concentración ng/μl de ADN y niveles de absorbancia 260/280 obtenidos de las extracciones con el kit Puregene.....	53
Tabla 12. Lecturas de concentración ng/μl de ADN y niveles de absorbancia 260/280 y 260/230 obtenidos de las extracciones con el kit DNeasy Spin-column en <i>Rabdotus</i> sp.....	54
Tabla 13. Lecturas de concentración ng/μl de ADN y niveles de absorbancia 260/280 y 260/230 obtenidos de las extracciones con el Kit Gentra Puregene en <i>Rabdotus</i> sp.....	55

Tabla 14. Primera amplificación de <i>M. quadripaludium</i> de Poza Mojarral y <i>Rabdotus</i> sp.....	56
Tabla 15. Se realizó la amplificación de 15 muestras de gasterópodos del género <i>Rabdotus</i> sp.....	58
Tabla 16. Segunda amplificación de <i>M. quadripaludium</i> de poza Parque Ilusión y <i>Rabdotus</i> sp.....	75
Tabla 17. Tercera amplificación de <i>M. quadripaludium</i> de Poza Mojarral y <i>Rabdotus</i> sp.....	76
Tabla 18. Amplificación con muestras diluidas de <i>M. quadripaludium</i> de Parque Ilusión.....	78
Tabla 19. Amplificaciones de <i>M. quadripaludium</i> y además se incluyen algunas muestras de <i>Rabdotus</i> sp. que no se había obtenido positivo.....	79
Tabla 20. Amplificaciones con algunas muestras diluidas y los tres conjuntos/mezclas de <i>M. quadripaludium</i>	81

I. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas desérticos comprenden casi el 50% del territorio de México (Rzedowski, 2006). Uno de los desiertos más importantes de América del Norte es el Desierto Chihuahuense, el cual cubre el 36% de las zonas áridas y semiáridas de América del Norte (Archer y Predick, 2008).

Dentro de este desierto, la Cuenca de Cuatrociénegas es considerada el humedal más importante de México (Souza *et al.*, 2011). Es uno de los 25 hotspots de biodiversidad al nivel mundial conocido internacionalmente por sus estromatolitos y especies asociadas a éstos. Cuatrociénegas cuenta con más especies endémicas que cualquier otro lugar en norte América (Stein *et al.*, 2000).

Los ambientes acuáticos de Cuatrociénegas se han visto alterados principalmente por las actividades de pastoreo, la expansión agrícola y la cesión de derechos de agua (WWF, 2012).

Para los organismos acuáticos, la fragmentación del hábitat puede acelerar la diferenciación de la población. Por lo tanto, es posible que diferentes drenajes no experimenten flujo de genes, dependiendo a su vez de las capacidades de dispersión del organismo. En el caso de los organismos de agua dulce el aislamiento a largo plazo entre los drenajes puede conducir a una divergencia considerable, los drenajes pueden diferir en la influencia de los procesos demográficos como los cuellos de botella y las expansiones de la población (Rogers y Harpending, 1992; Rogers, 1995; Harpending *et al.*, 1998).

Como resultado de la baja capacidad de dispersión activa, muchas especies de caracoles de agua dulce muestran en general una fuerte diferenciación genética entre poblaciones, incluso en distancias geográficas pequeñas (Hurtrez-Boussé *et al.*, 2010; Sinclair-Winters, 2014).

Los caracoles de agua dulce *Mexipyrgus carranzae* Taylor, 1966, *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966 y *Pyrgulopsis minckleyi* (Taylor, 1966), son endémicos del pequeño valle aislado de Cuatrociénegas en el Desierto Chihuahuense en

México (Minckley, 1969; Hershler, 1985; Johnson *et al.*, 2007). Estas especies coexisten en más de 200 manantiales, pozas, ríos y lagos de playa que existen en la cuenca de Cuatrociénegas (Hendrickson *et al.*, 2008).

El mantenimiento de la diversidad genética es un enfoque importante en la biología de la conservación. Primero, el cambio ambiental es un proceso continuo y la diversidad genética es un factor importante para que las poblaciones se adapten a tal cambio. En segundo lugar, la pérdida de diversidad genética a menudo se asocia con endogamia y reducción de la capacidad reproductiva. En consecuencia, la IUCN reconoce la necesidad de conservar la diversidad genética como una de las tres prioridades globales de conservación (Frankham *et al.*, 2002).

II. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, no se encuentra documentado la diferenciación morfológica de las poblaciones de *Mexithauma quadripaludium* entre las pozas ubicadas en el lado oeste y este de la Sierra de San Marcos y Pinos (SMYP), la cual divide la cuenca de Cuatrociénegas. En el caso de *Mexipyrgus carranzae*, Johnson (2005) muestreó 27 sitios en la cuenca alrededor de la sierra SMYP y encontró a partir de la variación de la secuencia del gen citocromo b de ADN mitocondrial, que existe una fuerte evidencia de aislamiento a largo plazo de tres regiones (poblaciones occidentales, poblaciones cercanas al Río Mesquites y poblaciones del sureste), lo que sugiere que estas regiones representan linajes evolutivamente distintos (Johnson, 2005). Así mismo, para el caracol *Pyrgulopsis minckleyi*, Moline y colaboradores (2004) realizaron un estudio de aloenzimas sobre la variación genética de este gasterópodo en la cuenca en 14 sitios alrededor de la Sierra de SMYP, en el cual encontraron que existe flujo genético heterogéneo entre las poblaciones, lo que indica que existen corredores y barreras contra la migración de caracoles en Cuatrociénegas (Moline *et al.*, 2004). Chaves-Campos *et al.*, (2011) presentaron evidencias moleculares (COI) de la existencia de diferenciación genética en individuos de poblaciones de *Mexithauma quadripaludium* en ambos lados de la Sierra de San Marcos, por lo que resulta importante realizar el presente estudio y establecer la probable congruencia entre la diferenciación morfológica y genética de sus poblaciones.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar la diversidad morfológica y genética de las poblaciones de la especie endémica *Mexithauma quadripaludium* separadas por la Sierra de San Marcos y Pinos del valle de Cuatrociénegas, Coahuila.

Objetivos particulares

1. Confirmar la identidad taxonómica de las poblaciones del gasterópodo *M. quadripaludium* de las pozas al lado este de la Sierra de SMyP en Cuatrociénegas.
2. Comparar la morfometría de las poblaciones de *M. quadripaludium* entre las pozas a ambos lados de la sierra mediante un análisis MANOVA.
3. Estimar la distancia genética de las poblaciones de *M. quadripaludium* del lado sureste de la Sierra de SMyP y comparar con las poblaciones del lado oeste de dicha Sierra en GenBank.
4. Realizar la extracción de ADN de *Rabdotus* sp. (grupo externo), amplificar el fragmento COI y secuenciar, para corroborar la metodología aplicada en *Mexithauma quadripaludium*.

IV. HIPÓTESIS

Ya que los gasterópodos presentan una baja capacidad de dispersión y la Sierra de San Marcos y Pinos funciona como barrera geográfica de las poblaciones del caracol endémico de Cuatrociénegas *Mexithauma quadripaludium* del lado oeste y sureste de dicha sierra, la distancia genética entre las poblaciones del gasterópodo separadas por esta barrera se espera sea significativa de nivel especie. Así mismo se espera que las poblaciones presenten diferencias morfométricas significativas entre las poblaciones que separa la sierra antes mencionada.

V. ANTECEDENTES

V.1. Gasterópodos de Cuatrociénegas

Los moluscos son un grupo conocido y diverso de animales invertebrados que incluye caracoles, mejillones, babosas, calamares y pulpos. Son abundantes en casi todos los hábitats marinos, de agua dulce y terrestres. Se han descrito aproximadamente 50,000 especies vivas y 60,000 especies fósiles. Los gasterópodos es el grupo más numeroso en especies de los moluscos (Harrold y Guralnick, 2010).

En América del Norte, los moluscos de agua dulce, especialmente los gasterópodos y los mejillones, son los más amenazados de toda la biota acuática, incluso más que los peces y los cangrejos de río (Lysne *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2013; Czaja *et al.*, 2020).

En Cuatrociénegas, *Mexithauma* es uno de los tres géneros de caracoles que se encuentran comúnmente en sustratos de travertino y rara vez se encuentra en sedimentos blandos o vegetación acuática (Taylor, 1966; Hershler, 1984). Se alimenta principalmente de superficies duras como bancos de roca o estromatolitos donde encuentra bacterias y algas como alimento (Elser *et al.*, 2005).

Mexithauma quadripaludium fue descrita por Taylor (1966) como un género nuevo y restringido a Cuatrociénegas perteneciendo a la familia Hydrobiidae (Taylor, 1966).

Wilke *et al.* (2001) comprobaron anatómicamente y molecularmente que Hydrobiidae y Cochliopidae son familias distintas, así que el género *Mexithauma* pertenece hoy a la familia Cochliopidae (Cazzaniga, 2011).

V.1.1. Estado de conservación de *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966.

Mexithauma quadripaludium se encuentra dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2019, dentro de la categoría de riesgo **en peligro de extinción** (SEMARNAT, 2019).

Por otra parte, en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN (International Union for Conservation of Nature) *Mexithauma quadripaludium* está en la lista, pero con un nombre anterior (*Mexipyrgus churinceanus* spp. *quadripaludium*) bajo la categoría de “vulnerable”, y en el portal de la IUCN aparece como última evaluación para esta especie el año 2000 (Mollusc Specialist Group, 2000).

V.2. Pozas de Cuatrociénegas

Varios estudios sobre especies acuáticas han demostrado que la migración entre las pozas (drenajes) de Cuatrociénegas es muy limitada, pero no dentro de un mismo drenaje, aunque aún no se han estimado los niveles específicos de diferenciación genética a nivel de población (Johnson, 2005; Carson y Dowling, 2006). El mayor aislamiento en términos de flujo genético ocurre entre los drenajes ubicados en el lado occidental y oriental de la Sierra de SMYP que disecciona la cuenca de Cuatrociénegas, y entre estos drenajes y el drenaje del Río Mesquites ubicado cerca de la punta del río (Johnson, 2005). Por lo tanto, estos sistemas podrían proporcionar linajes evolutivamente independientes entre comunidades replicadas naturalmente con diferentes grados de aislamiento genético (Chaves-Campos *et al.*, 2011).

V.3. Morfometría de conchas

En el caso de los gasterópodos, la morfometría de la concha es una herramienta útil y un primer paso en la identificación en taxonomía y estudios ecológicos (Mandahl-Barth, 1962; Abdel-Malek, 1958).

Ha sido útil para describir, identificar, caracterizar y reconocer variaciones morfológicas intraespecíficas (Wullschlegel y Jokela, 2002; Schniebs *et al.*, 2013).

Taylor (1966) y Taylor y Minckley (1966) observaron una aparente diversidad en el grado de diferenciación entre las especies locales de gasterópodos de las pozas de Cuatrociénegas. *Mexipyrgus carranzae* Taylor, 1966, una especie endémica restringida a grandes (>25 m²) manantiales (limnocrenas) y desagües de arroyos, es lo suficientemente variable y ha sido originalmente considerada como seis especies diferentes (Taylor, 1966). Posteriormente, estas especies fueron sinonimizadas a monotipia por Hershler (1985).

V.4. Diversidad genética

La diversidad genética se refleja en las diferencias entre los individuos de muchos caracteres, como por ejemplo el color de los ojos, la piel y el cabello en los humanos, el color y los patrones de bandas de las conchas de los caracoles, los colores de las flores en las plantas y las secuencias de proteínas y ADN (Frankham *et al.*, 2002).

La genética de poblaciones es importante especialmente en los manantiales del desierto, donde el ambiente árido limita la dispersión de los animales acuáticos y conduce a poblaciones aisladas (Moline *et al.*, 2004).

El flujo de genes puede aumentar o disminuir el grado y la tasa de adaptación local dependiendo de la heterogeneidad en el ambiente (Gandon y Nuismer, 2009).

La diversidad encontrada dentro de las especies es la base fundamental de la biodiversidad a niveles superiores. La variación genética puede detectarse a escala molecular estudiando directamente los cambios en la estructura del ADN, o indirectamente en las proteínas que codifican genes específicos (Moreno, 2000).

El uso de secuencias es uno de los métodos más utilizados (Martínez, 1997). A diferencia de las enzimas de restricción, con las que se hacen muestreos de partes del genoma, las secuencias analizan todas las unidades básicas de información de un organismo. En el caso de los gasterópodos, el gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial ha sido utilizado ampliamente para la delimitación de especies (Hershler *et al.*, 2007), diversidad (Collard *et al.*, 2013) y biogeografía (Hershler y Liu, 2008).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Área de estudio

El Valle de Cuatrociénegas se localiza en el corazón del Desierto Chihuahuense en México, en el centro del estado de Coahuila (figura 1), al norte y centro del municipio de Cuatrociénegas entre las coordenadas geográficas 26°45'00" y 27°00'00" latitud norte; 101°48'49" y 102°17'53" longitud oeste, con una altura aproximada de 740 msnm (De la Maza-Benignos, 2017).

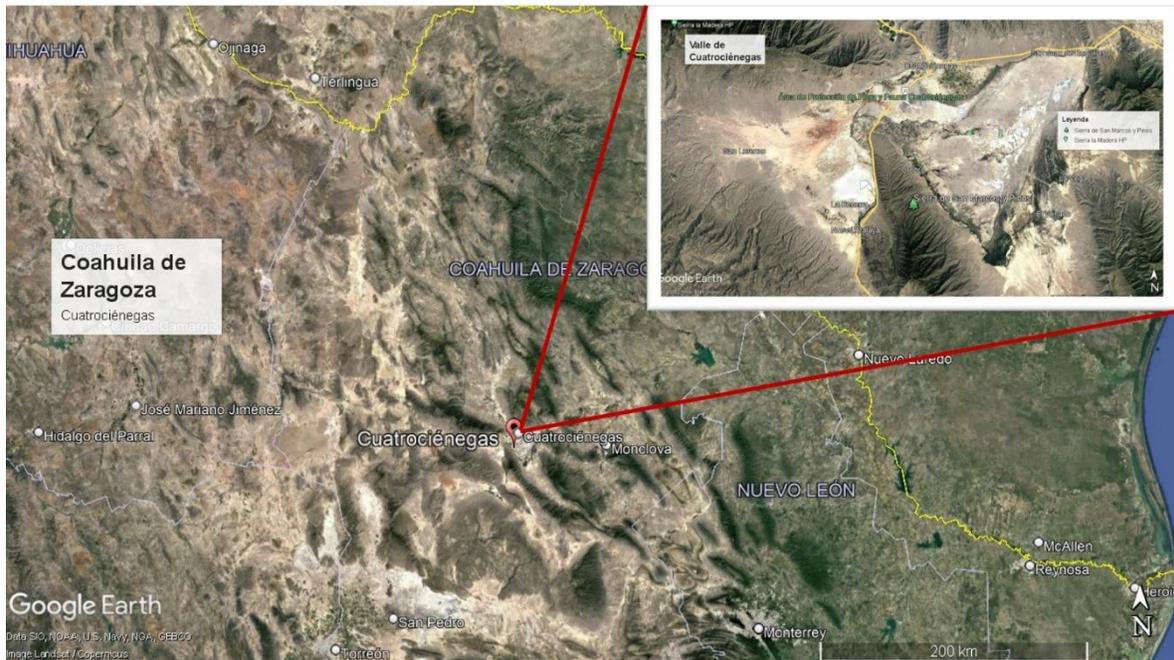


Figura 1. Mapa con la ubicación de Cuatrociénegas, Coahuila.

La Cuenca de Cuatrociénegas fue declarada área protegida por el gobierno mexicano en 1994, y es considerada como un sitio de alta prioridad para la conservación debido a su gran cantidad de peces y caracoles endémicos (Contreras-Balderas, 1984; Williams *et al.*, 1989; Minckley, 1992).

Para el presente estudio se muestrearon tres pozas del sureste de la Sierra de SMyP (Parque Ilusión, poza Mojarral y poza Escobedo; figuras 3, 4 y 5) y para el análisis morfométrico se emplearon también datos de pozas muestreadas anteriormente en 2018 las cuales se muestran en el mapa de la figura 2.



Figura 2. Mapa con la ubicación de las pozas muestreadas en el Valle de Cuatrociénegas.

VI.2. Trabajo de campo

En el área de estudio se obtuvo el material malacológico de las pozas del este de la Sierra de SMyP, mediante el método de recolecta por búsqueda directa basándose en el hábitat de los gasterópodos descrito por Hershler (1984).

Fueron muestreadas las siguientes pozas (tabla 1):

Tabla 1. Coordenadas geográficas de las pozas de Cuatrociénegas muestreadas.

Sitio	Latitud Norte	Longitud Oeste	Fecha colecta	No. organismos
Parque Ilusión	26° 47' 17"	102° 00' 09"	Mayo 2021	52 (20 conchas)
Poza Mojarral	26° 55' 21"	102° 07' 12"	Mayo 2021	25 (20 conchas)
Poza Escobedo	23° 53' 29"	102° 05' 12"	Mayo 2021	0
Poza Azul	26° 55' 21.41"	102° 07' 20.84"	Mayo 2018	20
Poza La Becerra	26° 52' 42.98"	102° 08' 17.27"	Mayo 2018	20
Poza Churince	26° 50' 24.76"	102° 08' 02.40"	Mayo 2018	20

Para poder acceder a las pozas se solicitó permisos a los dueños de éstas, así como también se solicitó permiso de toma de muestras de sedimento de las pozas a la dirección del Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas.



Figura 3. Parque Ilusión, Cuatrociénegas, Coahuila. Esta poza tiene una apariencia más similar a un pantano que como normalmente se han visto otras pozas de Cuatrociénegas. Tiene gran cantidad de pastizal alrededor y dentro de ella, además de tener también a *Nymphaea ampla* conocida como flor de agua, una planta con la cual tienen afinidad algunos de los gasterópodos endémicos del valle.



Figura 4. Poza Mojarral, Cuatrociénegas, Coahuila. Esta poza también tiene la planta acuática *N. ampla* y pastizal alrededor de ella.



Figura 5. Poza Escobedo, Cuatrociénegas, Coahuila. En el caso de esta poza, no se encontraba la planta flor de agua, además cabe resaltar que en esa poza se encontró muy poca cantidad de conchas en comparación con las otras pozas muestreadas.

VI.2.1. Recolección del material.

Para el objetivo número uno y dos:

Se emplearon al menos dos botes de plástico con tapa por poza y debidamente etiquetados se llenaron con aproximadamente un kilo y medio de sedimento y agua. Los organismos fueron transportados hasta el Laboratorio de Malacología y Evolución de la Facultad de Ciencias Biológicas, UJED.

Para el objetivo número tres:

Se realizó la búsqueda directa de los gasterópodos basándose en el hábitat que describió Hershler (1984). Los caracoles frescos se lavaron con agua destilada y se colocaron directamente en un tubo de 5ml con alcohol absoluto para fijarse.

Para el objetivo número cuatro:

En el caso de los individuos de *Rabdotus* sp., siete de ellos fueron colectados y colocados en frascos con alcohol absoluto para fijarse, se encontraron por la carretera federal-30 Cuatrociénegas-San Pedro (26° 03'16.1" norte y 102° 42' 56.1" oeste) en agosto 2021. Cuatro individuos de las Playitas en Viesca, Coahuila fueron donados por parte del Centro de Estudios Ecológicos de la FCB-UJED.

VI.3. Preparación de muestras en laboratorio

Para el objetivo número uno:

Se empleó un microscopio estereoscopio (VanGuard) para la separación de los gasterópodos. El sedimento se colocó en una caja Petri y con ayuda de pinzas, se separaron los organismos, posteriormente fueron lavados con agua destilada. Cada muestra se etiquetó con los datos correspondientes (localidad, fecha, número de organismos).

Se realizó una documentación fotográfica de *M. quadripaludium* con un microscopio estereoscopio marca Zeiss Stemi305 con cámara integrada AxioCam ERc5s. Además, también se tomaron fotografías de la concha y protoconcha de *M. quadripaludium* para observar detalles con un microscopio electrónico de barrido (SEM) marca TESCAN MIRA3 del laboratorio de la compañía Peñoles en Torreón, Coahuila.

La identificación taxonómica se realizó con el apoyo de guías taxonómicas y bibliografía especializada, principalmente de Hershler (1985).

Para el objetivo número dos:

Para realizar los análisis morfométricos se tomaron 20 individuos por poza, siguiendo la metodología de Hershler y Hayek (1988) y para el lado oeste de la Sierra se tomó la misma cantidad de individuos de muestras tomadas anteriormente (mayo 2018) de tres pozas (Azul, Churince y La Becerra).

Se realizó la toma de fotografías con el mismo microscopio estereoscopio de las conchas obtenidas de las pozas antes mencionadas.

En cada fotografía se añadió una escala de diez milímetros para lograr realizar la medición de las conchas adecuadamente. Utilizando el programa Image – Pro Plus 6.0 se tomaron las medidas morfométricas siguientes: altura (SH) y anchura (SW) de la concha, longitud de la espiral (SL), altura (AH) y anchura (AW) de abertura, y altura (HBW) de la última vuelta (figura 6).

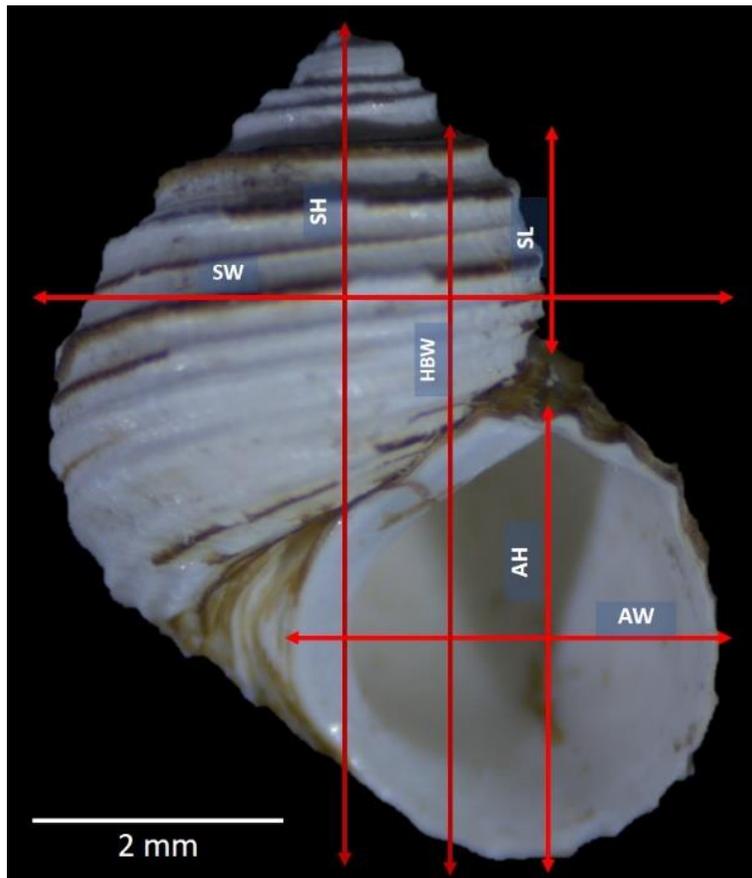


Figura 6.- Caracteres morfológicos de la concha de *Mexithauma quadripaludium* considerados para las mediciones. Donde: AH (aperture height): altura de la abertura (mm); AW (aperture width): anchura de la abertura (mm); HBW (height of body whorl): altura de la última vuelta (mm); SH (shell height): altura de la concha (mm); SL (Spiral lenght): longitud de la espiral; SW (shell width): anchura de la concha (mm).

Los datos fueron procesados en el programa SPSS Statistics versión 28.0, se realizó un Análisis Multivariante de la Varianza (MANOVA) y un análisis discriminante, se realizó la interpretación de resultados correspondiente.

Para el objetivo número tres:

La concha de cada individuo de *Mexithauma quadripaludium* se fragmentó con pinzas o fue quebrada totalmente con cuidado para retirar el cuerpo del animal de ella, esto con la finalidad de lograr una correcta fijación en alcohol para los análisis posteriores, ya que, al estar el animal contraído dentro de la concha y cerrada por el opérculo, el alcohol no logra fijar totalmente el cuerpo del animal. El material biológico fue conservado en alcohol absoluto para el análisis de ADN en tubos Eppendorf debidamente etiquetados con el nombre de la especie, el sitio de colecta y el número de muestra.

Para el objetivo número cuatro:

Los individuos de *Rabdotus* sp. son caracoles de mayor tamaño en comparación con *M. quadripaludium* por ello solo fue necesario cortar un fragmento del pie de cada individuo de aproximadamente 3mm x 3mm. El tejido se colocó en tubos Eppendorf etiquetados con los datos correspondientes y se conservó en alcohol absoluto.

VI.4. Análisis molecular

Se realizó la extracción de ADN de los gasterópodos (*M. quadripaludium* y *Rabdotus* sp.) con kits de la marca Qiagen y posteriormente en los procesos de amplificación se utilizaron iniciadores universales para el gen COI diseñados por Folmer *et al.* (1994).

VI.4.1. Extracción de ADN en ambas especies

En el caso de *Mexithauma quadripaludium* se extrajo el ADN genómico del animal entero sin concha y para *Rabdotus* sp., se utilizó solamente un fragmento del pie de 3mm x 3mm.

Protocolo con el kit Genra Puregene (Qiagen)

Para la lisis celular se agregaron 400 µl de solución lisis y 15 µl de proteinasa K (20mg/mL). Las muestras se maceraron con un pistilo y luego se incubaron en termoblock a 55 °C por 1 hr y 30 min hasta que el líquido se tornó transparente. Se agregaron 3 µl de solución de RNAsa, se mezcló bien invirtiendo las muestras y se

incubo a 37 °C por 40 min. Después se agregaron 100 µl de solución de precipitación de proteínas y se agitó con vortex por 20 segundos; las muestras se colocaron en el congelador por 4 minutos, posteriormente se centrifugaron a 21,000 g por 5 minutos.

El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo etiquetado. Para la precipitación del ADN total (ADNt) se agregaron 500 µl de isopropanol, 0.5 µl de glicógeno (20mg/mL) y se mezcló bien invirtiendo los tubos suavemente. Luego se centrifugaron a 21,000 g por 7 minutos y posteriormente se eliminó el líquido sin perder el pellet. Se agregaron 500 µl de etanol al 70%, se lavó bien el pellet, y centrifugado a 21,000 g por 7 minutos, Luego se vació el líquido sin perder el pellet de ADNt.

Las muestras (pellets) se dejaron a temperatura ambiente para su secado durante 15 minutos. Por último, los pellets de ADNt se rehidrataron con 30 µl de solución de hidratación.

Protocolo con el kit DNeasy spin-column (Qiagen)

Se agregaron 180 µl de Buffer ATL y 20 µl de proteinasa K. Las muestras se maceraron con un pistilo, se mezcló en vortex y se incubó a 56 °C durante 1 hr y 30 min hasta que el tejido estuvo completamente lisado. Durante la incubación se puede agitar el tubo para dispersar la muestra. Se agregaron 2 µl de RNasa por muestra, se mezcló suavemente en el vortex. Posteriormente se incubaron en termoblock las muestras a 37°C durante 40 minutos.

Se agitó suavemente en vortex y se añadieron 200 µl de Buffer AL a la muestra y se mezcló bien con ayuda del vortex. Luego se agregaron 200 µl de etanol (100 %) y se vuelve a mezclar bien con el vortex. Luego centrifugaron a 7454 g durante 1 min.

Posteriormente se colocó la columna giratoria DNeasy Mini en un tubo de recolección de 2 ml etiquetado (tanto la columna como el tubo de recolección) y se transfirió la mezcla (muestra) a la columna giratoria. Se centrifugaron a 6000 g durante 1 min y se desecharon el líquido que bajo al tubo de recolección.

Se volvió a colocar la columna giratoria DNeasy Mini en el tubo de recolección, luego se agregaron 500 µl de Buffer AW1 y se centrifugo durante 1 min a 6000 x g. Nuevamente se deshecho el líquido.

Se colocó la columna giratoria DNeasy Mini en el tubo de recolección, se agregaron 500 µl de Buffer AW2 y se centrifugo durante 3 min a 20 000 x g para secar la membrana DNeasy. Se deshecho el líquido.

La columna giratoria Dneasy Mini se colocó en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml o 2 ml y se agregaron 50 µl de Buffer AE directamente sobre la membrana Dneasy.

Se incubó a temperatura ambiente durante 1 a 2 min y luego se centrifugó durante 1 min a 6000 x g para eluir. Finalmente, el ADN se almacena en congelador.

Se cuantificó el ADN de cada muestra en el Nanodrop para identificar la cantidad y calidad del producto.

VI.4.2. Amplificaciones

Las muestras de ADN fueron sometidas a varios protocolos de amplificación con termocicladores del laboratorio de biología molecular de la FCB-UJED con el objetivo de amplificar fragmentos del gen COI con los iniciadores LCO-1490 – 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3', HCO-2198 -5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' diseñados por Folmer *et al.* (1994).

Para la preparación del mix de reacción de la PCR se agregaron los siguientes reactivos en un volumen de aproximadamente 25 µl: 13.4 µl – H₂O, 5 µl – GoTaq[®] Flexi Buffer, 2 µl – MgCl₂, 0.5 µl – dNTP's, 0.5 µl – iniciadores LCO-1490 y HCO-2198, 0.13 µl – GoTaq[®] DNA polymerase y 3 µl – templado de ADN.

Se aplicaron los siguientes ciclos térmicos.

Primer ciclo térmico:

1. Temperatura inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 92°C por 60 segundos, temperatura de anillamiento 55°C por 50 segundos y 72°C por 2 minutos, seguidos de 5 minutos a 72°C. 2. Con la temperatura inicial de 95°C se redujo el

número de ciclos de 40 a 35 de acuerdo a lo indicado en el protocolo de Chaves-Campos y colaboradores (2011).

Segundo ciclo térmico:

Temperatura inicial a 94°C por 3 min 30 segundos, seguido de 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 45°C por 1 min 30 segundos y 72°C por 1 min, continua con 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 min, seguidos de 7 minutos a 72°C.

Tercer ciclo térmico:

Temperatura inicial a 94°C por 3 min 30 segundos, seguido de 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 40°C por 1 min 30 segundos y 72°C por 50 segundos; seguidos 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 45°C por 1 min 30 segundos y 72°C por 50 segundos, posteriormente 25 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 50 segundos, finalmente 72°C por 7 minutos.

Se realizó cambio en el ciclo y quedo de la siguiente manera:

Temperatura inicial a 94°C por 3 min 30 segundos, seguido de 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, 40°C por 1 min 30 segundos y 72°C por 1 min, continua con 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 min, seguidos de 7 minutos a 72°C.

Finalmente se realizó una prueba intentando hacer conjuntos con las muestras que tuvieran poca concentración de ADN de *M. quadripaludium*, fueron agregados 1 µl de 5 muestras de *M. quadripaludium* en un tubo eppendorf, se realizaron 3 conjuntos correspondientes a 15 muestras del caracol de Cuatrociénegas.

La amplificación se realizó utilizando el segundo ciclo térmico antes descrito.

VI.4.2.1. Diluciones

Adicional a los distintos ciclos térmicos utilizados, se realizaron diluciones de las muestras de ADN que tenían concentraciones mayores de 100 ng para que al agregar 3 µl de ADN al mix de reacción, la concentración fuera uniforme a 75 ng/µl.

VI.4.3. Determinación de la distancia genética

Se buscó en el GenBank las secuencias depositadas de *M. quadripaludium* para realizar una base de datos.

Los productos amplificados de *Rabdotus* sp., se enviaron para su secuenciación a la empresa Macrogen (Estados Unidos). Las secuencias obtenidas se revisaron con ayuda de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) para observar las coincidencias con la base de datos de GenBank.

VII. RESULTADOS

Del objetivo número uno, la identificación taxonómica de los individuos de *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966, se realizó con el apoyo de guías taxonómicas y bibliografía especializada, principalmente de Hershler (1985). Así como también se obtuvieron fotografías principalmente de las conchas de *M. quadripaludium* (Figura 7).

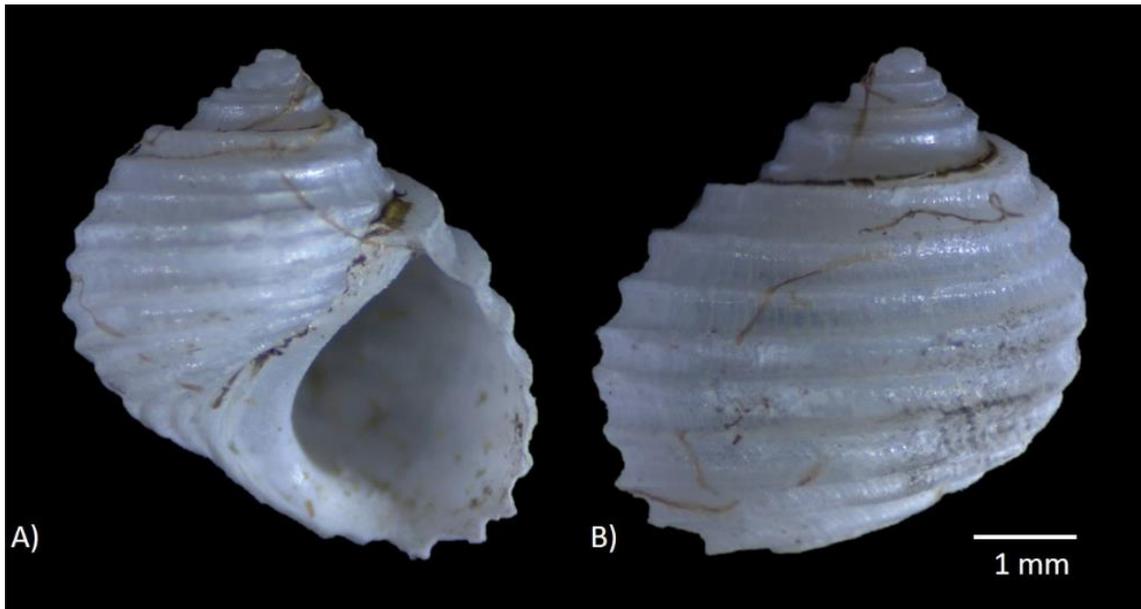


Figura 7.- *Mexithauma quadripaludium* de Poza Mojarral. A. Vista frontal y B. vista dorsal de la concha.

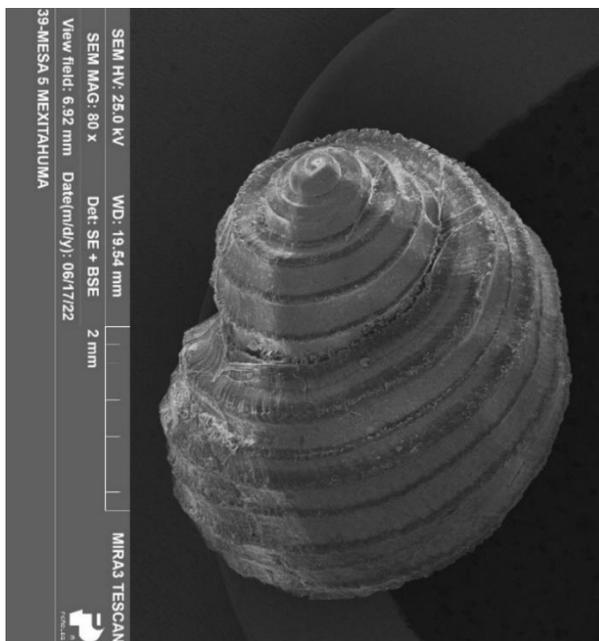


Figura 8.- Concha de *M. quadripaludium* de Parque Ilusión, Cuatrociénegas, Coahuila. Barra de escala 2 mm. Fotografía: Czaja, A.

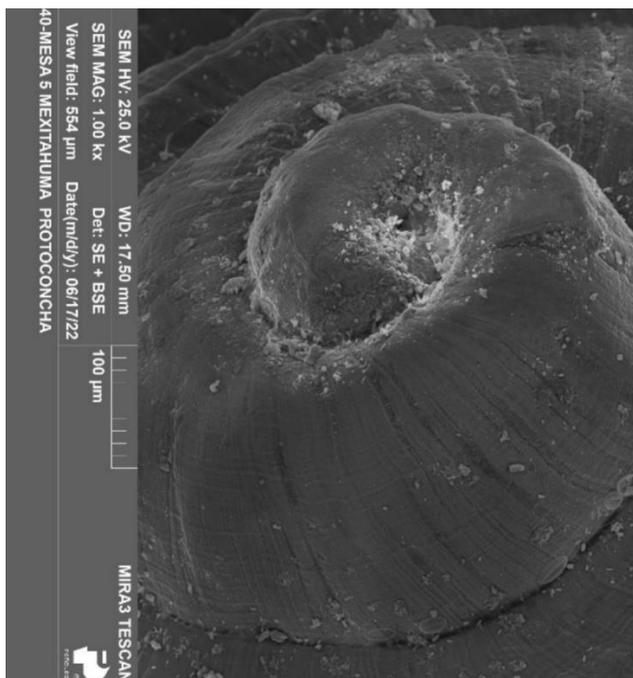


Figura 9.- Protoconcha de *M. quadripaludium* de Parque Ilusión, Cuatrociénegas, Coahuila. Barra de escala 100 micrómetros. Fotografía: Czaja, A.

Diagnosis

La **concha** de *M. quadripaludium* es globosa, en color blanco y con franjas en color oscuro, dichas franjas en los bordes son llamadas **periostraco**.

En la Figura 7 se aprecia aún una única línea del periostraco en ese individuo, ya que al morir el animal lo pierden.

Las Figuras 8 y 9 corresponden a fotografías tomadas con un microscopio electrónico de barrido en las que se pueden apreciar más detalles de la concha de este caracol: aún presenta el periostraco, así como también se alcanzan a distinguir en la protoconcha algunas diatomeas que están adheridas.

La **abertura** tiene forma elíptica, la parte de arriba es más estrecha que la de abajo. Mientras que el labio interno está muy engrosado, el labio externo es delgado tal como lo describió Hershler (1985).

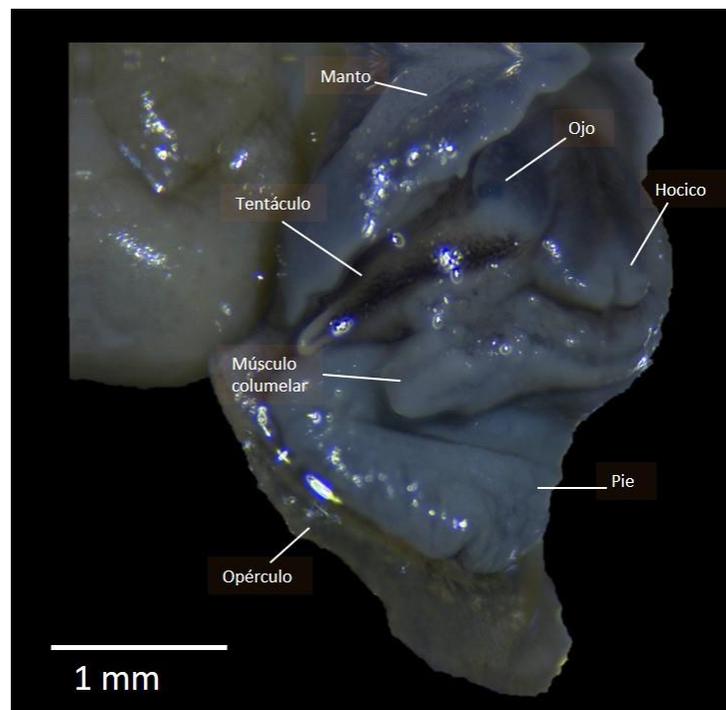


Figura 10.- Hembra de *M. quadripaludium* de Parque Ilusión aún con el opérculo adherido al pie.

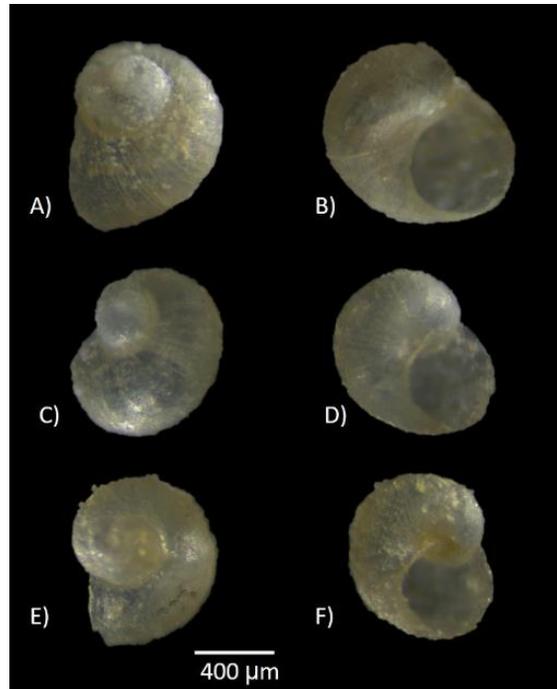


Figura 11. Conchas de crías de *M. quadripaludium* de la figura 10. Individuo A-B: SH= 0.9 mm. Individuo C-D: SH= 0.6 mm. Individuo E-F: SH= 0.7 mm.

El individuo mostrado en la Figura 10 resulto ser una hembra, ya que al estar realizando las fotografías y levantar el manto para descubrir la cabeza salieron unas **conchas pequeñas** (Figura 11), de aproximadamente 0.9mm, las conchas pequeñas son transparentes, no tienen el periostraco característico de las conchas de un ejemplar adulto lo cual indica que es algo que adquieren al crecer. Se encontraron 7 conchas de crías.

Detrás de la **cabeza** las hembras tienen la bolsa de cría como mostró Hershler en sus imágenes descriptivas (1985), y al haber encontrado las conchas pequeñas al levantar el manto que cubría la cabeza del animal se confirmó esta información.

El **hocico** del animal es pequeño, los tentáculos son alargados de aproximadamente 1 mm.

Los **tentáculos** tienen una franja de pigmento oscuro al centro, la franja va desde un poco más allá del ojo hasta la punta del tentáculo. En la Figura 10 se aprecia que el hocico por la parte dorsal, el manto y el cuello tienen una ligera capa de melanina/pigmento.

El **pie** es grande y engrosado (Hershler, 1985), al pie esta adherido el opérculo (Figura 10) el cual tiene forma circular/elíptica.

Para el objetivo número dos:

Para el análisis morfométrico, de las medidas obtenidas con el programa Image – Pro Plus 6.0 se realizó una base de datos en Excel en la cual se convirtieron los datos de pixeles a milímetros para cada poza.

En las siguientes tablas (2 a 6) se muestran los datos morfométricos obtenidos de cada individuo para las pozas del lado este y oeste de la sierra de San Marcos y Pinos.

Tabla 2. Datos morfométricos de *Mexithauma quadripaludium* de Parque Ilusión.

Individuo/C arácter	Altura concha (SH) mm	Anchura concha (SW) mm	Longitud espiral (SL) mm	Altura abertura (AH) mm	Ancho abertura (AW) mm	Altura última vuelta (HBW) mm
1	5.68	5.70	1.81	3.72	3.56	5.28
2	6.24	5.51	1.92	4.22	3.46	5.62
3	4.91	4.61	1.48	3.45	2.97	4.33
4	5.92	5.10	2.00	3.94	3.29	5.21
5	5.51	5.01	1.81	3.38	3.28	4.89
6	6.05	4.86	2.11	3.74	3.30	5.29
7	5.49	4.64	2.00	3.25	3.02	4.73
8	4.83	4.51	1.44	3.02	3.10	4.32
9	5.30	4.73	1.74	3.12	2.93	4.66
10	6.24	5.17	2.30	3.52	3.29	5.49
11	4.96	4.05	1.79	2.85	2.70	4.16
12	4.60	4.39	1.38	2.78	2.83	4.16
13	5.17	4.32	1.70	2.81	2.59	4.39
14	5.34	4.79	1.70	3.27	3.16	4.75
15	5.32	4.66	2.09	2.70	2.97	4.51
16	6.18	5.23	2.11	3.54	3.33	5.49
17	5.46	4.92	1.61	3.71	3.02	4.94
18	6.86	5.76	2.09	3.65	3.25	6.01
19	4.54	4.07	1.51	2.64	6.68	3.84
20	6.62	5.32	2.30	3.63	3.25	5.97

Tabla 3. Datos morfométricos de *Mexithauma quadripaludium* de Poza Mojarral.

Individuo/Carácter	Altura concha (SH) mm	Anchura concha (SW) mm	Longitud espiral (SL) mm	Altura abertura (AH) mm	Ancho abertura (AW) mm	Altura última vuelta (HBW) mm
1	5.82	5.19	1.98	3.35	3.42	5.12
2	5.57	4.93	1.54	3.82	3.18	4.87
3	5.21	4.51	1.67	3.27	3.18	4.41
4	6.09	5.04	1.86	3.50	3.23	5.35
5	6.51	5.40	2.38	3.67	3.27	5.61
6	5.63	4.81	1.86	3.33	3.10	4.89
7	4.93	4.68	1.41	2.97	2.85	4.38
8	6.45	5.94	1.86	3.92	3.71	5.95
9	6.72	5.38	2.34	3.82	3.37	6.01
10	5.71	4.91	1.73	3.37	3.06	5.14
11	6.22	5.67	2.02	3.48	3.46	5.54
12	4.76	4.36	1.41	3.18	2.97	4.15
13	5.33	4.87	1.50	3.29	3.12	4.81
14	5.44	4.41	1.73	3.23	2.89	4.72
15	5.80	5.00	1.90	3.48	3.12	5.14
16	4.74	4.41	1.18	3.14	2.87	4.26
17	4.87	4.26	1.41	3.25	2.87	4.30
18	5.23	4.49	1.48	3.25	3.01	4.76
19	6.32	4.98	2.34	3.50	3.06	5.50
20	6.60	5.38	2.47	3.65	3.39	5.82

Tabla 4. Datos morfométricos de *Mexithauma quadripaludium* de Poza Azul.

Individuo/C arácter	Altura concha (SH) mm	Anchura concha (SW) mm	Longitud espiral (SL) mm	Altura apertura (AH) mm	Ancho apertura (AW) mm	Altura última vuelta (HBW) mm
1	5.53	4.94	1.61	3.21	3.25	4.87
2	5.59	4.57	1.78	3.44	2.93	4.80
3	4.91	4.36	1.53	2.66	2.74	4.40
4	5.52	4.95	1.55	3.08	3.25	4.89
5	5.46	4.91	1.44	3.55	3.29	4.78
6	4.87	4.33	1.42	3.02	2.83	4.10
7	4.87	4.42	1.49	3.10	2.93	4.23
8	5.69	5.04	1.44	3.76	3.38	5.18
9	5.84	4.76	2.02	3.55	3.27	5.16
10	4.95	4.33	1.51	3.10	3.00	4.36
11	5.14	4.21	1.83	2.93	2.70	4.50
12	5.12	4.61	1.66	3.14	3.08	4.61
13	5.25	4.74	1.55	3.34	3.36	4.76
14	4.76	4.53	1.36	3.23	3.02	4.38
15	4.82	4.53	1.51	3.06	2.89	4.27
16	6.01	5.23	1.44	3.63	3.51	5.31
17	5.04	4.36	1.51	3.21	2.78	4.38
18	5.84	4.95	2.04	3.57	3.36	4.99
19	4.57	4.29	1.40	2.85	2.80	4.10
20	5.06	4.04	1.83	3.02	2.83	4.42

Tabla 5. Datos morfométricos de *Mexithauma quadripaludium* de Poza La B Herrera.

Individuo/Carácter	Altura concha (SH) mm	Anchura concha (SW) mm	Longitud espiral (SL) mm	Altura apertura (AH) mm	Ancho apertura (AW) mm	Altura última vuelta (HBW) mm
1	7.23	5.97	2.68	4.25	3.95	6.48
2	6.12	5.29	1.79	3.89	3.59	5.61
3	6.61	5.40	2.30	3.98	3.66	5.95
4	6.74	5.17	2.59	3.76	3.68	6.17
5	6.38	5.53	2.23	3.83	3.51	5.66
6	6.17	5.27	1.76	4.08	3.49	5.66
7	6.82	5.93	2.38	4.02	3.95	6.23
8	5.93	5.40	1.66	3.91	3.53	5.36
9	7.16	5.91	2.55	4.23	4.21	6.46
10	6.51	5.57	2.30	3.93	3.51	5.89
11	7.12	6.12	2.38	4.21	3.95	6.46
12	6.55	5.38	2.10	3.89	3.57	5.83
13	6.99	5.97	2.17	4.25	4.08	6.27
14	7.10	6.25	2.27	4.25	4.04	6.48
15	7.44	6.36	2.25	4.51	4.87	6.61
16	6.29	4.89	2.38	3.40	3.25	5.49
17	7.27	5.85	2.47	4.38	3.89	6.68
18	5.95	5.08	1.87	3.38	3.66	5.34
19	7.44	6.31	2.53	4.53	4.15	6.70
20	7.08	6.06	2.59	4.10	3.87	6.29

Tabla 6. Datos morfométricos de *Mexithauma quadripaludium* de Poza Churince.

Individuo (MQ)/Carácter	Altura concha (SH) mm	Anchura concha (SW) mm	Longitud espiral (SL) mm	Altura apertura (AH) mm	Ancho apertura (AW) mm	Altura última vuelta (HBW) mm
1	6.58	5.16	2.40	3.97	3.61	5.97
2	6.24	5.59	2.27	3.57	3.55	5.46
3	6.78	5.59	2.40	4.01	3.84	6.03
4	6.41	5.25	1.89	3.82	3.61	5.80
5	5.73	5.29	1.49	3.95	3.48	5.18
6	4.93	4.25	1.55	3.06	2.97	4.33
7	5.42	4.55	1.70	3.48	3.12	4.86
8	5.69	4.76	1.74	3.59	3.16	5.14
9	5.35	5.20	1.64	3.40	3.55	4.76
10	6.20	5.25	2.06	4.01	3.57	5.42
11	6.35	5.08	2.30	3.91	3.48	5.71
12	6.27	5.14	2.15	3.80	3.48	5.65
13	5.63	4.72	1.66	3.74	3.04	5.03
14	5.69	4.65	1.89	3.57	3.31	5.12
15	6.16	5.14	1.91	3.93	3.55	5.54
16	6.33	5.35	2.27	3.67	3.65	5.54
17	5.97	4.86	1.85	3.67	3.31	5.29
18	5.52	4.61	1.70	3.27	3.06	4.78
19	4.80	4.16	1.49	3.04	2.95	4.29
20	8.28	6.52	3.14	4.82	4.44	7.24

Análisis multivariante de la varianza (MANOVA)

Se obtuvo una M de Box de 0.06, lo que indica que las matrices de covarianza son iguales y los datos tienen una distribución normal multivariada.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de las pruebas multivariantes, en las cuales todas presentan una significancia menor a 0.05 indicando que existen diferencias significativas entre las poblaciones analizadas.

Tabla 7. Pruebas multivariantes de las pozas (poblaciones) estudiadas.

Efecto	Valor	F	gl de hipótesis	gl de error	Sig.	
Pozas (poblaciones)	Traza de Pillai	0.761	3.641	24.000	372.000	0.000
	Lambda de Wilks	0.367	4.365	24.000	315.183	0.000
	Traza de Hotelling	1.393	5.136	24.000	354.000	0.001
	Raíz mayor de Roy	1.138	17.642	6.000	93.000	0.001

En la Tabla 8 se muestran los estadísticos descriptivos para cada una de las pozas muestreadas, teniendo la media y desviación estándar para cada una de las variables.

Tabla 8. Estadísticos descriptivos. SH= Altura concha; SW= Anchura concha; SL= Longitud espiral; AH= Altura abertura; AW=Ancho abertura; HBW= Altura de la última vuelta.

Poza (n=20)	Estadísticos descriptivos	Variables					
		SH	SW	SL	AH	AW	HBW
Parque Ilusión	Media	5.5610	4.8675	1.8445	3.3470	3.2990	4.9020
	Desv. Estándar	0.6540	0.4895	0.2779	0.44361	0.83288	0.62353
		3	3	3			
Poza Mojarral	Media	5.6975	4.9310	1.8035	3.4235	3.1565	5.0365
	Desv. Estándar	0.6355	0.4614	0.3697	0.25052	0.22910	0.57819
		5	7	3			
Poza Azul	Media	5.2420	4.6050	1.5960	3.2225	3.0600	4.6245
	Desv. Estándar	0.4147	0.3210	0.2006	0.28635	0.25196	0.36504
		4	1	1			
Poza La Becerra	Media	6.7450	5.6855	2.2625	4.0390	3.8205	6.0810
	Desv. Estándar	0.4900	0.4400	0.2955	0.30990	0.35791	0.45004
		5	9	3			
Poza Churince	Media	6.0165	5.0560	1.9750	3.7140	3.4365	5.3570
	Desv. Estándar	0.7508	0.5275	0.4064	0.39184	0.34790	0.65848
		1	3	8			

De acuerdo a la prueba post hoc HSD Tukey la población que presenta una diferencia significativa respecto al resto es la de la poza La Becerra (4) en todas las variables analizadas con una significancia menor a 0.05 (Tabla 9).

Tabla 9. Prueba Post Hoc HSD Tukey para las pozas analizadas. SH= Altura concha; SW= Anchura concha; SL= Longitud espiral; AH= Altura abertura; AW=Ancho abertura; HBW= Altura de la última vuelta.

Variable	Prueba	Poza	Pozas	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
							Límite inferior	Límite superior
SH	HSD Tukey	La Becerra (4)	Parque Ilusión (1)	1.1840*	0.19013	0	0.6553	1.7127
			Mojarral (2)	1.0475*	0.19013	0	0.5188	1.5762
			Azul (3)	1.5030*	0.19013	0	0.9743	2.0317
			Churince (5)	0.7285*	0.19013	0.002	0.1998	1.2572
SW	HSD Tukey	La Becerra (4)	Parque Ilusión (1)	0.8180*	0.14336	0	0.4193	1.2167
			Mojarral (2)	0.7545*	0.14336	0	0.3558	1.1532
			Azul (3)	1.0805*	0.14336	0	0.6818	1.4792
			Churince (5)	0.6295*	0.14336	0	0.2308	1.0282
SL			Parque Ilusión (1)	0.4180*	0.10067	0.001	0.138	0.698

	Mojarral (2)	0.4590*	0.10067	0	0.179	0.739
	Azul (3)	0.6665*	0.10067	0	0.3865	0.9465
	Churince (5)	0.2875*	0.10067	0.041	0.0075	0.5675
	Parque Ilusión (1)	0.6920*	0.10873	0.0000	0.3896	0.9944
AH	Mojarral (2)	0.6155*	0.10873	0.0000	0.3131	0.9179
	Azul (3)	0.8165*	0.10873	0.0000	0.5141	1.1189
	Churince (5)	0.3250*	0.10873	0.029	0.0226	0.6274
	Parque Ilusión (1)	0.5215*	0.14552	0.005	0.1168	0.9262
AW	Mojarral (2)	0.6640*	0.14552	0.0000	0.2593	1.0687
	Azul (3)	0.7605*	0.14552	0.0000	0.3558	1.1652
	Churince (5)	0.384	0.14552	0.071	-0.0207	0.7887
	Parque Ilusión (1)	1.1790*	0.17277	0.000	0.6985	1.6595
BWH	Mojarral (2)	1.0445*	0.17277	0.000	0.564	1.525

Azul (3)	1.4565*	0.17277	0.000	0.976	1.937
Churince (5)	.7240*	0.17277	0.001	0.2435	1.2045

El análisis discriminante muestra la distribución de los datos con base en las funciones uno y dos, en el cual para la función uno las variables que muestran mayor diferencia significativa son la altura de la concha (SH; $p = 2.147$) y altura de la última vuelta (HBW; $p = 2.460$), en la función dos las variables con mayor diferencia significativa son anchura de la concha (SW; $p = 2.012$) y altura de la concha (SH; $p = 1.512$).

Se muestran los centroides para cada poza (Figura 12), comparando la distribución de los datos y los centroides de éstos con los resultados del análisis MANOVA, coincide en que la poza que presenta diferencia significativa respecto a las demás muestreadas es la poza La Becerra.

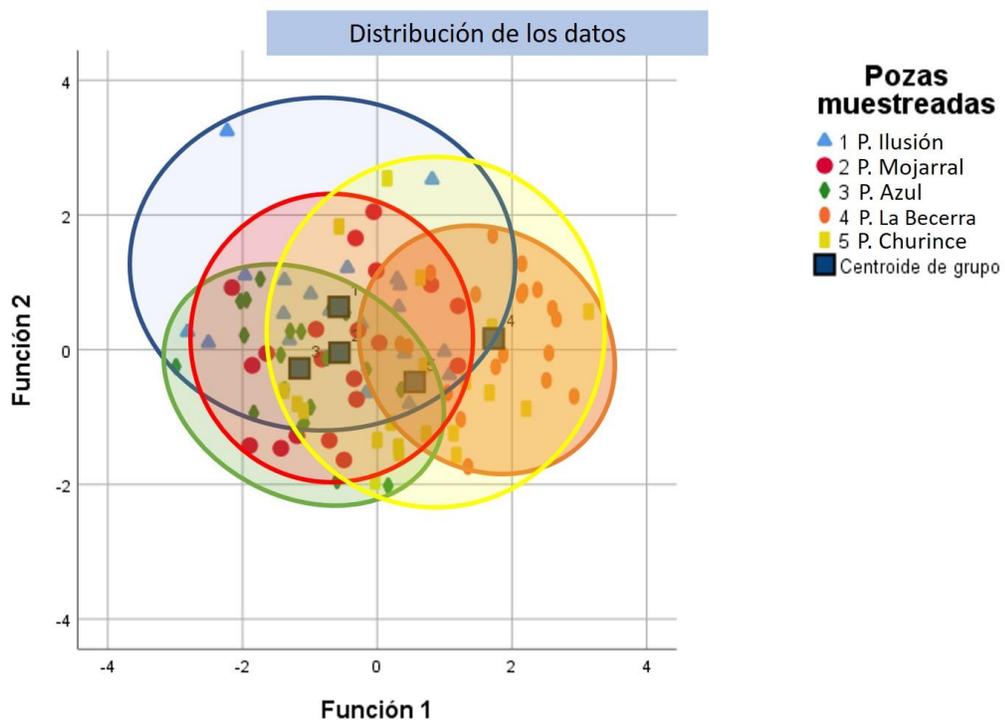


Figura 12. Distribución de los datos de las pozas muestreadas, se muestran los centroides para cada poza.

Para el objetivo número tres:

Además de las conchas vacías que fueron fotografiadas obtenidas de las muestras de sedimento, algunas conchas encontradas contaban con el animal dentro de ellas, éstas fueron limpiadas con agua destilada y colocados en tubos de plástico con alcohol absoluto.

Luego las conchas fueron quebradas con la finalidad de extraer el cuerpo del animal de ella.

El material biológico que se encontró en buenas condiciones fue fijado en alcohol absoluto para el análisis de ADN en tubos Eppendorf debidamente etiquetados, el material que se deshizo al quebrar las conchas fue desechado. Se obtuvo un total de 37 individuos: 32 de Parque Ilusión, cinco de Poza Mojarral y cero de Poza Escobedo.

Para el objetivo número cuatro:

De los individuos de *Rabdotus* sp., se obtuvieron muestras de 11 individuos, siete provenientes de San Pedro y cuatro de Viesca, en Coahuila. De cuatro individuos se realizó extracción con ambos kits, dos de San Pedro y dos de Viesca.

VII.1. Extracción de ADN de *Mexithauma quadripaludium*

Se realizó la extracción de ADN de los 37 individuos de *M. quadripaludium*, de los 32 individuos de Parque Ilusión, a 19 se les realizó la extracción de ADN con el kit Puregene, los 13 restantes el proceso fue con el kit DNeasy. Los cinco individuos de la Poza Mojarral de igual manera fueron tratados con el kit DNeasy (Tablas 10 y 11).

Tabla 10. Lecturas de concentración ng/μl de ADN y niveles de absorbancia 260/280 y 260/230 obtenidos de las extracciones con el kit DNeasy Spin-column.

Extracción de ADN total con kit DNeasy Spin-column			
Clave del individuo completo	Concentración ng/μl	260/280	260/230
DC-MQ-M01	13	1.5	0.34
DC-MQ-M02	78.1	1.77	1.46
DC-MQ-M03	38.6	1.81	0.8
DC-MQ-M04	54.3	1.84	1.81
DC-MQ-M05	58.7	1.83	1.39
DC-MQ-I05	10.3	1.82	0.26
DC-MQ-I08	12.6	1.58	0.38
DC-MQ-I09	14.7	1.49	0.68
DC-MQ-I11	60.5	1.31	0.55
DC-MQ-I12	14.4	2.1	0.65
DC-MQ-I13	11.4	1.99	1.06
DC-MQ-I14	6.9	2.11	0.85
DC-MQ-I16	66.1	1.73	1.18
DC-MQ-I17	66.9	1.85	1.93
DC-MQ-I20	66.2	1.8	1.03
DC-MQ-I21	169.8	1.8	1.52
DC-MQ-I22	115.1	1.8	1.53
DC-MQ-I23	187.2	1.78	1.52

DC= Diana Cordero. MQ= *Mexithauma quadripaludium*. M= Mojarral. I= Ilusión.

Tabla 11. Lecturas de concentración ng/μl de ADN y niveles de absorbancia 260/280 y 260/230 obtenidos de las extracciones con el kit Genra Puregene.

Extracción de ADN total con Kit Genra Puregene			
Clave del individuo completo	Concentración ng/μl	260/280	260/230
DC-MQ-I01	118.3	1.76	1.95
DC-MQ-I02	53.6	1.58	0.91
DC-MQ-I03	5.5	1.49	0.89
DC-MQ-I04	228.2	1.82	1.48
DC-MQ-I06	333.8	1.76	1.78
DC-MQ-I07	28.7	1.56	0.59
DC-MQ-I10	516.1	1.82	1.43
DC-MQ-I15	93.8	1.7	0.92
DC-MQ-I18	116.6	1.79	1.07
DC-MQ-I19	29.2	1.87	1
DC-MQ-I24	149	1.77	1.56
DC-MQ-I25	149.2	1.84	1.46
DC-MQ-I26	117.9	1.67	1.79
DC-MQ-I27	109.5	1.71	1.89
DC-MQ-I28	516.3	1.81	1.59
DC-MQ-I29	282.9	1.83	1.7
DC-MQ-I30	615.7	1.9	1.66
DC-MQ-I31	357	1.85	1.55
DC-MQ-I32	351.8	1.83	1.56

DC= Diana Cordero. MQ= *Mexithauma quadripaludium*. I= Ilusión.

Las secuencias depositadas en GenBank del gen COI de *M. quadripaludium* se encuentran del número de accesión GU321684 a GU321741 de localidades mayormente al oeste de la Sierra de San Marcos y Pinos (Tío Cándido, Los Remojos, Río Mesquites, Mojarral, Tierra Blanca y Juan Santos).

VII.1.1. Extracción de ADN de *Rabdotus* sp.

En *Rabdotus* sp., se obtuvo extracción de ADN genómico de 15 muestras (tablas 12 y 13), debido a que a dos individuos se realizó la extracción con ambos kits.

Las muestras de estos individuos se etiquetaron RV1-RV2 y RV3-RV4.

Tabla 12.- Lecturas de concentración ng/μl de ADN y niveles de absorbancia 260/280 y 260/230 obtenidos de las extracciones con el kit DNeasy Spin-column.

Extracción de ADN total en <i>Rabdotus</i> sp., con el kit DNeasy Spin-column.			
Clave del individuo	Concentración ng/μl	260/280	260/230
RV1	45.0	1.9	1.4
RV3	35.9	1.9	0.9
RP5	18.4	1.8	1.0
RP7	60.6	1.9	1.2

*RV= *Rabdotus* sp., de Viesca; RP= *Rabdotus* sp., de San Pedro

Tabla 13. Lecturas de concentración ng/μl de ADN y niveles de absorbancia 260/280 y 260/230 obtenidos de las extracciones con el Kit Genra Puregene.

Extracción de ADN total en <i>Rabdotus</i> sp., con Kit Genra Puregene			
Clave del individuo	Concentración ng/μl	260/280	260/230
RV2	102.8	1.8	1.3
RV4	182.8	1.9	1.7
3RV3	249.2	1.8	1.2
4RV4	481.7	1.8	1.3
1SPCC	278.8	1.8	1.7
2SPCC	292.8	1.7	1.2
RP6	59.9	1.2	0.8
RP8	246.6	1.8	1.1
5SPCC	97.0	1.7	0.4
6SPCC	46.6	1.2	0.3
7SPCC	34.9	1.2	0.3

VII.2. Amplificaciones en *Mexithauma quadripaludium*

En el caso de *M. quadripaludium* **no** se obtuvieron resultados positivos de todas las amplificaciones con los ciclos térmicos que se menciona en la metodología que fueron utilizados (Tabla 14, Figura 13; ver Anexo 1).

Tabla 14. Primera amplificación de *M. quadripaludium* de Poza Mojarral y *Rabdotus* sp.

Carril en gel	Muestra
1	M01 (<i>M. quadripaludium</i>)
2	M02 (<i>M. quadripaludium</i>)
3	M03 (<i>M. quadripaludium</i>)
4	M04 (<i>M. quadripaludium</i>)
5	1SPCC (<i>Rabdotus</i> sp.)
6	2SPCC (<i>Rabdotus</i> sp.)
7	RV1 (<i>Rabdotus</i> sp.)
8	Muestra de insecto como control positivo
9	Control negativo
10	Marcador de peso molecular

***M**= Individuo de poza Mojarral; **SP**= *Rabdotus* de San Pedro; **RV**= *Rabdotus* de Viesca

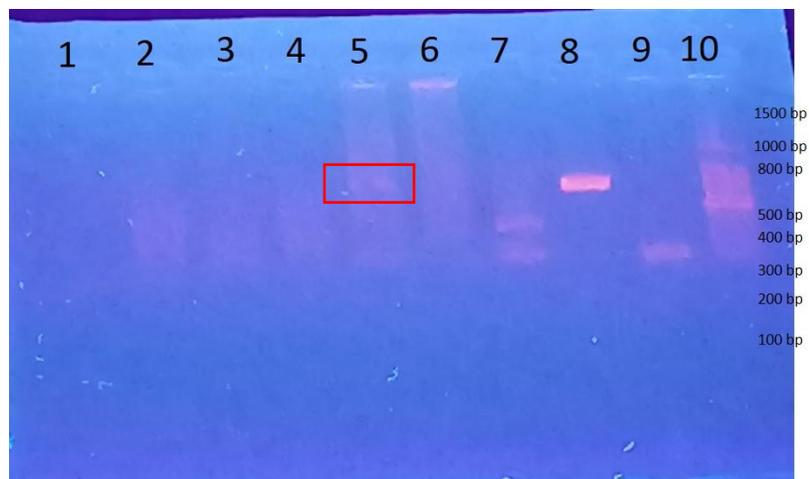


Figura 13. Gel de agarosa 1.5%, en el carril #5 apenas se alcanza a notar una banda que corresponde a una muestra de *Rabdotus* sp.

De las amplificaciones que se realizaron a los conjuntos de ADN que se crearon tampoco se obtuvieron resultados positivos (ver anexo 1, Figura 20).

VII.2.1. Diluciones de ADN en *M. quadripaludium* y *Rabdotus* sp.

Las muestras fueron amplificadas con aproximadamente 75 ng de ADN, al hacer las diluciones se obtuvieron submuestras en las cuales en 1 ul hay 25 ng de ADN, por ello a la mezcla de reacción para PCR se agregaron 3 ul de ADN.

Luego de las diluciones, se intentó 3 veces más el ciclo térmico #2 con muestras diluidas que no habían sido amplificadas antes y las que ya se habían intentado también, pero tampoco hubo resultados positivos para *M. quadripaludium*.

VII.3. Amplificaciones en *Rabdotus* sp.

Se utilizaron los mismos iniciadores y ciclos térmicos que con el caracol de lodo como parte de la experimentación, obteniendo en este caso resultados positivos para al menos 9 individuos (ciclo #2, 8 individuos y con un ciclo diferente 1 individuo; tabla 15, figura 14 y 15). Estos resultados positivos funcionaron como controles en las amplificaciones de *M. quadripaludium*.

Tabla 15. Se realizó la amplificación de 15 muestras de gasterópodos del género *Rabdotus* sp. con las siguientes concentraciones obtenidas con Nanodrop.

Carril en gel	Muestra	Concentración ng/ul del templado	260/280	Cantidad de ADN añadido al mix de PCR
1	Marcador de peso molecular	-	-	
2	Control positivo muestra de insecto	-	-	
3	Control negativo	-	-	
4	RV1	45	1.91	2 ul
5	RV2	103	1.82	3 ul
6	RV3	35.9	1.93	2 ul
7	RV4	182.8	1.89	3 ul (diluida)
8	3RV3	249.2	1.76	3 ul (diluida)
9	4RV4	481.7	1.79	3 ul (diluida)
10	1SPCC	278.8	1.83	3 ul (diluida)
11	Marcador de peso molecular	-	-	
12	Control positivo muestra de insecto	-	-	
13	2SPCC	292.8	1.74	3 ul (diluida)
14	RP5	18.4	1.84	4.0 ul
15	RP6	59.9	1.22	1.25 ul

16	RP7	60.6	1.86	1.25 ul
17	RP8	246.6	1.78	3 ul (diluida)
18	5SPCC**	97	1.73	0.8 ul
19	6SPCC	46	1.19	2 ul
20	7SPCC	34.9	1.16	2 ul

*Se hizo un cambio en la cantidad de ADN en el mix de reacción, de acuerdo a la concentración de ng/ul de cada muestra, para al final tener una concentración de 75 ng de ADN en cada reacción correspondiente a cada muestra. En las muestras que se diluyeron se agregaron 3ul de ADN a la reacción. **La banda de la muestra 5SPCC es visible en el gel de la figura 15.

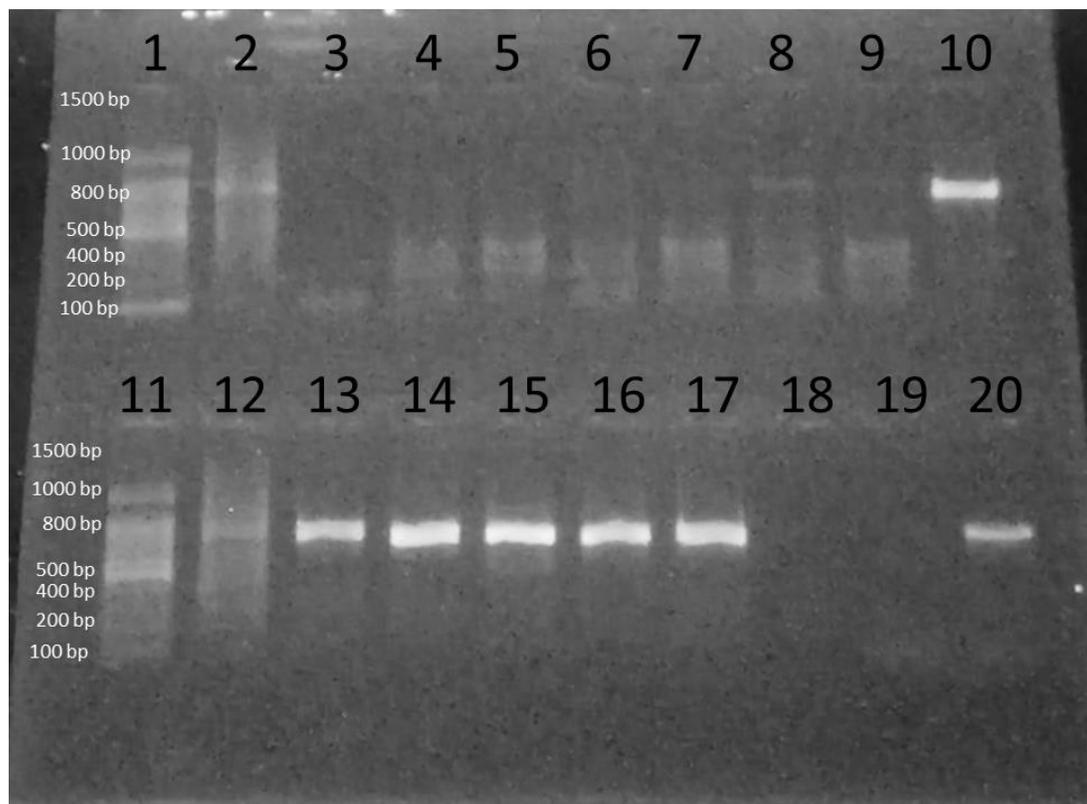


Figura 14. Gel de agarosa de amplificación de *Rabdotus* sp., en el cual se ven 10 bandas: carril 7 no se alcanza a percibir en la fotografía, pero en vivo se veía algo tenue, carril 8 y 9 si se perciben un poco más, y las bandas más brillantes en los carriles 13, 14, 15, 16, 17 y 20.

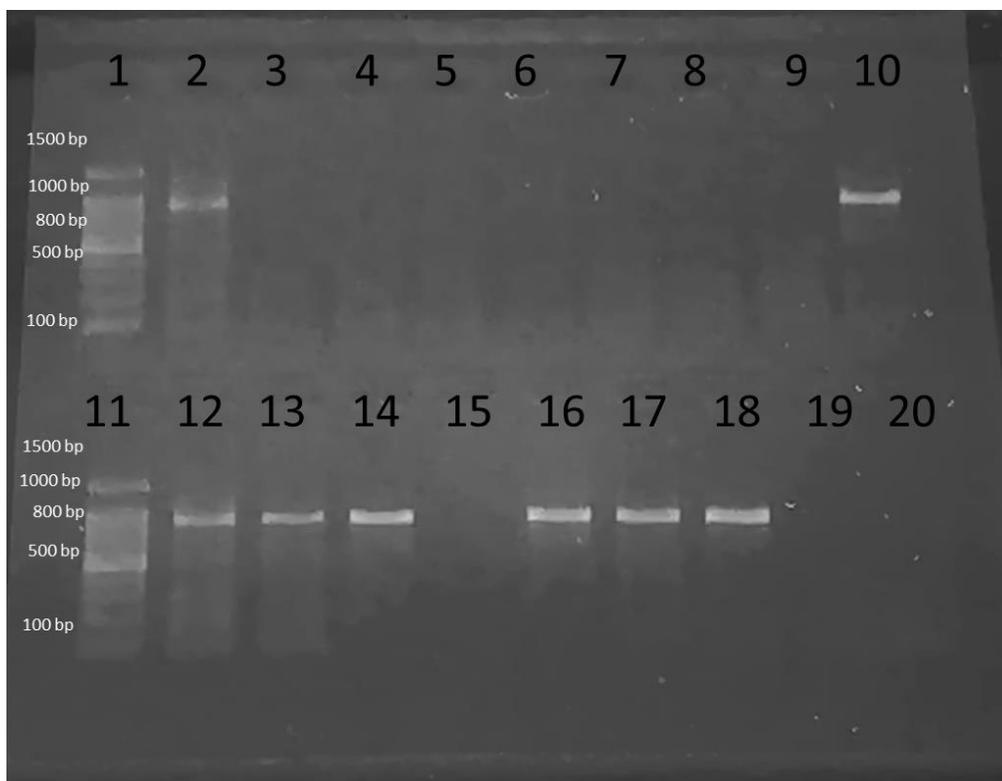


Figura 15. Gel de agarosa de amplificación de *Rabdotus* sp., en el que se ven 6 bandas: en comparación con el gel anterior, coinciden las muestras de los carriles 10, 13, 14, 16 y 17, en este segundo gel se obtuvo una banda en el carril 18 que en el primer gel con el primer ciclo PCR-1 no se amplificó esa muestra, la cual es la **5SPCC**.

Para la segunda amplificación de las muestras de *Rabdotus* que se muestra en la figura 15 se aplicó el siguiente ciclo térmico por indicaciones del Dr. Murugan: Temperatura inicial a 94°C por 3 minutos 30 segundos; seguido de 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de anillamiento 45°C por 1 minuto 30 segundos y 72°C por 50 segundos; luego **30 ciclos** a 94°C por 30 segundos, temperatura de anillamiento 50°C por 30 segundos y 72°C por 50 segundos, y finalmente 72°C por 7 minutos.

Cabe resaltar que los resultados positivos fueron después de haber realizado diluciones en el ADN de las muestras que tenían concentraciones mayores a 100 ng/ul, esto para que las concentraciones resultaran en 25 ng/ul en ambas especies

y al mix de PCR agregar la cantidad necesaria para tener 75 ng de ADN, recalando que esto solo funciona para las muestras de *Rabdotus* sp.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1. Caracterización taxonómica (objetivo número uno)

El caracol de lodo, *Mexithauma quadripaludium* Taylor, 1966, es una de las especies endémicas del Valle de Cuatrociénegas y es considerado como uno de los tres grandes gasterópodos de la cuenca.

El nombre se deriva de México; y la palabra griega thauma, taumático, maravilla o prodigio: de ahí, maravilloso molusco mexicano (Taylor, 1966: 205).

Tal como lo describen Taylor (1966) y Hershler (1985) la concha de *M. quadripaludium* es de forma globosa, en un tono blanco, la concha presenta cordones espirales y, entre estos, se encuentra el periostraco.

Este caracol se distingue fácilmente de las demás especies de gasterópodos endémicos de Cuatrociénegas por la forma de su concha como adulto, caso contrario ocurriría si se encontraran conchas de las crías de *M. quadripaludium* ($\pm 900 \mu\text{m}$) ya que estas conchas pequeñas consisten en la protoconcha y al menos una vuelta, son lisas (sin cordones espirales), transparentes o blanquecinas, no son globosas sino planas y no presentan periostraco (Figura 11). En conchas de un mayor tamaño ($\geq 2 \text{ mm}$) ya presentan los cordones espirales, el periostraco en color oscuro y son de forma globosa.

VIII.2 Análisis morfométrico (objetivo número dos)

Anteriormente, Hershler y Hayek (1988) encontraron que existe diferenciación en el tamaño de las conchas entre las poblaciones de *Mexipyrgus carranzae* y *Pyrgulopsis minckleyi*, pero mencionan que *Mexithauma quadripaludium* es menos variable en los sitios que muestrearon para ese trabajo, los cuales fueron pozas que se encontraban hacia el norte y punta de la sierra de San Marcos y Pinos.

Para el presente estudio, de las poblaciones que fueron analizadas de *Mexithauma quadripaludium* a los lados este y oeste de la sierra de SMyP mediante el análisis multivariante de la varianza (MANOVA) y el análisis discriminante se sabe ahora que la población de la poza La Becerra presenta diferencias significativas (<0.05)

respecto a las demás pozas muestreadas en todas las variables analizadas (SH, SW, SL, AH, AW, HBW).

Aunque la poza Parque Ilusión se encuentre geográficamente más al sur y más alejada de las demás pozas, existe menos diferenciación en las variables morfológicas de la concha de *M. quadripaludium* respecto a las demás pozas (Mojarral, Azul y Churince) que la encontrada para la poza La Becerra.

En la Figura 12 del análisis discriminante se puede observar la cercanía de los centroides de las pozas P. Ilusión, Mojarral y Azul, la poza Churince se aleja de éstas tres, pero de la misma manera el centroide de la poza La Becerra esta más alejado de las cuatro pozas.

Este análisis muestra las variables que tienen más peso para diferenciar a las poblaciones, las cuales son la altura de la concha, anchura de la concha y altura de la última vuelta. Por ello se realizó el análisis MANOVA para determinar la diferencia significativa entre las poblaciones de las pozas, encontrando que para la población de la poza La Becerra todas las variables presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) y no solo las tres de mayor peso que muestra el análisis discriminante, por ello el centroide de esta población está más alejado a las demás tal como se muestra en la Figura 12.

Estas diferencias significativas muestran que existe una diferencia morfométrica entre las conchas de las poblaciones del caracol de lodo, los individuos de la poza La Becerra presentan un mayor tamaño en la concha.

De acuerdo con Chaves-Campos *et al.* (2011), la población de Churince presentó una diferenciación genética de las poblaciones del Mojarral de 0.91 a 0.93 (pair-wise F_{st}) lo que sugiere la existencia de congruencia de la diferenciación morfológica con la diferenciación genética entre poblaciones de *Mexithauma quadripaludium* localizadas en ambos lados de la Sierra de San Marcos.

Aunque existe esta diferenciación claramente no es suficiente evidencia para afirmar que se trata de especies diferentes. Lo que se puede mencionar es que, si está ocurriendo una ligera diferenciación a nivel fenotípico entre las poblaciones de los lados este y oeste de la sierra de San Marcos y Pinos, la cual podría estar

influenciada por diversos factores tales como el impacto antropogénico de la poza, la depredación por peces, la composición química de las pozas, entre otros factores.

VIII.3. Análisis molecular en *Mexithauma quadripaludium* (objetivo número tres)

Como se menciona previamente, el flujo genético de las poblaciones de *M. quadripaludium* de las pozas a los lados este y oeste de la sierra de SMyP ha sido documentado en las especies *M. carranzae* y *Pyrgulopsis minckleyi* por Johnson (2005) y Moline y colaboradores (2004) respectivamente, quienes en sus estudios si encontraron algunas diferencias que los llevaron a sugerir que existe aislamiento en tres regiones: occidentales, cercanas al Río Mesquites y sureste (Johnson, 2005); además de corredores y barreras contra la migración (Moline *et al.*, 2004) como lo son las sierras que rodean al valle, en este caso la sierra de San Marcos y Pinos. Las regiones que menciona Johnson (2005), en este caso corresponderían la región de poblaciones occidentales a las pozas La Becerra y Churince, las poblaciones cercanas al Río Mesquites a la poza Azul, Mojarral y Escobedo, y como poblaciones del sureste a la poza Parque Ilusión. Chaves-Campos *et al.* (2011) presentaron evidencias moleculares (COI) de la existencia de diferenciación genética en individuos poblaciones de *Mexithauma quadripaludium* en ambos lados de la Sierra de San Marcos.

En el presente estudio no se obtuvo amplificación de las muestras de ADN de *Mexithauma quadripaludium*, se desconoce el factor exacto que haya influido para lograr obtener una amplificación ya que, así como se obtuvieron muestras con bajas concentraciones de ADN también hubo muestras que tuvieron altas concentraciones, para estas últimas se hicieron diluciones que en el caso de *M. quadripaludium* no funcionaron.

Galindo y colaboradores (2014) mencionan que la extracción de tejidos en caracoles para análisis moleculares presenta dificultades debido a la capacidad del animal vivo de retraer y/o sellar la concha con el opérculo, resultando en una fijación inadecuada de los tejidos cuando el animal es sumergido en etanol (Galindo *et al.*, 2014). Geiger y colaboradores (2007) mencionan como método para evitar que el

animal se fije incorrectamente realizar una perforación en la concha para permitir la penetración del alcohol (Geiger *et al.*, 2007).

Mexithauma quadripaludium tiene opérculo, y en el momento de la recolecta del material biológico los individuos fueron solamente lavados con agua destilada y luego se colocaron directamente en alcohol absoluto, en ese momento no se realizó una perforación en la concha de los caracoles hasta semanas después que se realizó la separación de los individuos, las conchas fueron no solo perforadas sino que se quebraron para lograr sacar el animal completo de ellas, y solo se conservaron los que tenían mejor aspecto (no en descomposición).

Ahora al no haber obtenido resultados positivos en las amplificaciones se sugiere que probablemente una causa pudiera ser que la fijación del material biológico fue incorrecta.

La perforación de las conchas o en el caso de lograr sacar al animal completo de las conchas es metodología que se debe realizar en el momento que se está recolectando el material biológico y no semanas después.

Fukuda y colaboradores (2008) mencionan un método japonés llamado “*niku-nuki*” que consiste en hervir a los gasterópodos vivos. Esto desnaturaliza y desactiva proteínas que fragmentan el ADN, elimina la mucosidad en el caracol (mucopolisacáridos) que obstruye una exitosa amplificación por PCR. Pero en caracoles muertos no funciona ya que el músculo columelar y los aductores no se pueden separar con calor (Fukuda *et al.*, 2008).

El método *niku-nuki* por lo mencionado en la literatura es muy útil en el caso de los análisis moleculares en gasterópodos, probablemente en el presente trabajo las muestras de *M. quadripaludium* contenían mucopolisacáridos y otras proteínas que no se eliminaron en el proceso de extracción de ADN y por ello no se obtuvieron amplificaciones exitosas en este caracol.

Al comenzar los protocolos de amplificaciones, el primer ciclo térmico que se utilizó fue el mencionado por Chaves-Campos y colaboradores (2011), para este estudio no fue posible amplificar las muestras de los gasterópodos con el ciclo que mencionan en su trabajo.

Posteriormente se intentó con otros ciclos térmicos, se realizaron cambios en el número de ciclos o grados de temperatura sin obtener amplificación, además de que también se realizaron las diluciones de ADN.

VIII.4 Análisis molecular en *Rabdotus* sp. (objetivo número cuatro)

En el caracol *Rabdotus* sp., se logró amplificar el fragmento del gen COI, aunque también hubo algunas dificultades al comienzo. Posteriormente se realizó cambio en la cantidad añadida al mix de reacción para el PCR, agregando entonces la cantidad de ADN que correspondiera para que el mix de reacción contuviera 75 ng de ADN aproximadamente. Al realizar este proceso fue entonces que se obtuvieron amplificaciones de las muestras de *Rabdotus* sp., aunque no de todos los individuos que se extrajo ADN (9 de 11). Esto indica que los métodos moleculares utilizados en este estudio requieren algunos cambios para lograr la amplificación de las muestras de *M. quadripaludium*.

IX. CONCLUSIONES

El resultado final de los análisis morfométricos (MANOVA y Discriminante) muestran que existe una diferenciación significativa entre las poblaciones de *Mexithauma quadripaludium* a los lados de la sierra de San Marcos y Pinos.

En el análisis discriminante con los centroides se observa la distribución de los datos, dejando ver que las poblaciones de las pozas parque Ilusión, Mojarral y Azul son cercanas, la de poza Churince se aleja de estas y la de poza La Becerra se encuentra más lejana.

Esto se contrasta con los resultados del análisis MANOVA, con el cual se sabe ahora que la población de *M. quadripaludium* de la poza La Becerra tiene diferencias significativas respecto a las otras poblaciones en todas las variables analizadas para el presente trabajo (altura y anchura de la concha, longitud de la espiral, altura y anchura de la abertura y ancho de la última espiral).

En cuanto al análisis molecular, en *M. quadripaludium* no funcionó ninguno de los ciclos térmicos que se utilizaron ni los cambios en la concentración de ADN que se realizaron para las reacciones del PCR. Como se mencionó previamente, se desconoce el factor exacto que influyó en el proceso de amplificación para no obtener los fragmentos del gen COI de las muestras de *M. quadripaludium*, ya que en la especie *Rabdotus* sp., que se usó como un control si se logró amplificar utilizando la misma metodología que para el caracol de Cuatrociénegas

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con los estudios genéticos para las poblaciones de *Mexithauma quadripaludium*, en dicho caso podrían muestrearse más pozas alrededor de la sierra de San Marcos y Pinos para tener un tamaño más amplio de muestra.

De la misma manera, se recomienda evaluar el estado general de las pozas ya que las especies endémicas de gasterópodos de Cuatrociénegas se encuentran dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2019 bajo la categoría en peligro de extinción.

Para la fijación de las muestras, en el caso de gasterópodos con opérculo realizar una perforación en la concha para lograr que el alcohol penetre totalmente al momento de colectarlo en campo.

De ser posible, emplear el método *niku-nuki* ya que los autores mencionan que es un método con el cual se evitan las dificultades comunes en las amplificaciones de las muestras y se logra realizar la amplificación del gen de interés.

XI. REFERENCIAS

- Abdel-Malek, E. 1958. Distribution of the intermediate hosts of bilharziasis in relation to hydrography; with special reference to the Nile Basin and the Sudan. *Bull. World Health Organization.*, 18: 691-734.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Archer S. R. y K. I. Predick. 2008. Climate change and ecosystems of the southwestern United States. *Rangelands*, 30: 23–28.
- Carson, E. W. y T. E. Dowling. 2006. Influence of hydrogeographic history and hybridization on the distribution of genetic variation in the pupfishes *Cyprinodon atorus* and *C. bifasciatus*. *Molecular Ecology*, 15: 667–679.
- Cazzaniga, N. 2011. El género *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) en América del Sur. *Amici Molluscarum*. Recuperado el 17 de junio, 2021 de https://www.researchgate.net/publication/286776351_El_genero_Heleobia_Caenogastropoda_Cochliopidae_en_America_del_Sur
- Chaves-Campos, J., S. G. Johnson y C. D. Hulsey. 2011. Spatial Geographic Mosaic in an Aquatic Predator-Prey Network. *PLoS ONE* 6(7): e22472. Doi: 10.1371/journal.pone.0022472.
- Collard, G. A., M. A. Valladares y M. A. Méndez. 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. *Zool. Stud.* 52, 50 (2013). <https://doi.org/10.1186/1810-522X-52-50>.
- Contreras-Balderas, S. 1984. Environmental Impacts in Cuatro Ciénegas, México: A Commentary. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 85-88.
- Czaja, A., I. G. Meza-Sánchez, J. L. Estrada-Rodríguez, U. Romero-Méndez, J. Sáenz-Mata, V. Ávila-Rodríguez, J. L. Becerra-López, J. R. Estrada-Arellano, G. F. Cardoza-Martínez, D. R. Aguillón-Gutiérrez, D. G. Cordero-Torres y A. P. Covich. 2020. The freshwater snails (Mollusca: Gastropoda) of Mexico:

- updated checklist, endemism hotspots, threats and conservation status. *Revista Mexicana de biodiversidad*, 91.
- De la Maza Benignos, M. 2017. Cuatro Ciénegas y su estado de conservación a través de sus peces. Monterrey, N. L., Fuerza Gráfica, 164: 20.
- Elser, J. J., J. H. Schampel, M. Kyle, J. Watts, E. W. Carson, T. E. Dowling, C. Tang y P. D. Roopnarine. 2005. Response of grazing snails to phosphorus enrichment of modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology*, 50(11), 1826-1835.
- Frankham, R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Nueva York.
- Folmer, M. B., W. Hoeh, R. Lutz y R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5: 294-299.
- Fukuda, H., T. Haga, y Y. Tatara. 2008. Niku-nuku: a useful method for anatomical and DNA studies on shell-bearing molluscs. *Zoosymposia*, 1(1), 15-38.
- Galindo, L. A., N. Puillandre, E. E. Strong y P. Bouchet. 2014. Using microwaves to prepare gastropods for DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 14(4), 700-705.
- Gandon, S. y S. L. Nuismer. 2009. Interactions between genetic drift, gene flow, and selection mosaics drive parasite local adaptation. *American Naturalist*, 173: 212–224.
- Geiger D. L., B. A. Marshall, W. F. Ponder, T. Sasaki y A. Warén. 2007. Techniques for collecting, handling, preparing, storing and examining small molluscan specimens. *Molluscan Research*, 27, 1–50
- Harpending, H. C., M. A. Batzer, M. Gervens, L. B. Jorde, A. R. Rogers y S. T. Sherry. 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95, 1961–1967.
- Harrold, M. N. y R. P. Guralnick. 2010. A Field Guide to the Freshwater Mollusks of Colorado, 2nd Edition, *Colorado Division of Wildlife*, 6060 Broadway, Denver, CO, 80216 <http://wildlife.state.co.us/WildlifeSpecies/Profiles/Mollusks>.

- Hershler, R. 1984. The hydrobiid snails (Gastropoda: Rissoacea) of the Cuatro Ciénegas basin: Systematic relationships and ecology of a unique fauna. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 19: 61–76.
- Hershler, R. 1985. Systematic revision of the Hydrobiidae (Gastropoda, Rissoacea) of the Cuatro Ciénegas basin, Coahuila, Mexico. *Malacologia* 26: 31–123.
- Hershler, R. y H. P. Liu. 2008. Ancient vicariance and recent dispersal of springsnails (Hydrobiidae: Pyrgulopsis) in the Death Valley system, California-Nevada. *The Geological Society of America*. Special Paper 439. 91-101.
- Hershler, R., H. P. Liu, T. J. Freesty E. J. Johannes. 2007. Extensive diversification of pebblesnails (Lithoglyphidae: *Fluminicola*) in the upper Sacramento River basin, northwestern USA. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 149: 371–422.
- Hendrickson, D. A., J. C. Marks, A. B. Moline, E. Dinger y A. E. Cohen. (2008). Combining Ecological Research and Conservation: A Case Study in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. In: Stevens LE, J MM, eds. Aridland springs in North America: ecology and conservation. *Tucson Arizona: The University of Arizona Press*.
- Hurtrez-Bousse`s, S., J. E. Hurtrez, H. Turpin, C. Durand, P. Durand, T. De Meeu`s, C. Meunier y F. Renaud. 2010. Hydrographic network structure and population genetic differentiation in a vector of fasciolosis, *Galba truncatula*. *Infection Genetics and Evolution*, 10: 178–183.
- Johnson, S. G. 2005. Age, phylogeography and population structure of the microendemic banded spring snail, *Mexipyrgus churinceanus*. *Molecular Ecology* 14: 2299–2311.
- Johnson, P. D., A. E. Bogan, K. M. Brown, N. M. Burkhead, J. R. Cordeiro, J. T. Garner, et al. 2013. Conservation status of freshwater gastropods of Canada and the United States: *Fisheries*, 38, 247–282. <https://doi.org/10.1080/03632415.2013.785396>
- Johnson, S. G., C. D. Hulsey y F. J. García de León. 2007. Spatial mosaic evolution of snail defensive traits. *BMC Evolutionary Biology* 7: 50.

- Kumar S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz y K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547-1549.
- Lysne, S. J., K. E. Perez, K. M. Brown, R. L. Minton y J. D. Sides. 2008. A review of freshwater gastropod conservation: challenges and opportunities. *Journal of the North American Benthological Society*, 27, 463–470. <https://doi.org/10.1899/07-061.1>
- Mandahl-Barth, G., 1962. Key to the identification of east and central African freshwater snails of medical and veterinary importance. *Bulletin World Health Organization*, 27: 135-150.
- Martínez, M. 1997. Sistemática molecular: comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60: 123-136.
- Minckley, W. L. 1969. Environments of the Bolsón of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Science Series University of Texas at El Paso, 2:1–65.
- Minckley, W. L. 1992. Three Decades Near Cuatrociénegas, México: Photographic Documentation and a Plea for Area Conservation. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*, 89-118.
- Moreno, C. E. 2000. Manual de métodos para medir la biodiversidad: Universidad Veracruzana. Xalapa: Textos Universitarios.
- Moline, A. B., S. M. Shuster, D. A. Hendrickson, y J. C. Marks. 2004. Genetic variation in a desert aquatic snail (*Nymphophilus minckleyi*) from Cuatrociénegas, Coahuila, Mexico. *Hydrobiologia*, 522(1), 179-192.
- Mollusc Specialist Group. 2000. *Mexipyrghus churinceanus* ssp. *quadripaludium*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2000: e.T13279A3452368. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2000.RLTS.T13279A3452368.en>.
Downloaded on 03 October 2021.
- Schniebs, K., P. Gloer, M. V. Vinarski y K. Hundsdoerfer, 2013. Intraspecific morphological and genetic variability in the European freshwater snail *Radix labiata* (Rossmassler, 1835) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae). *Contributions to Zoology*, 82: 55-68.

- SEMARNAT. 2019. Modificación del Anexo normativo III. Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo publicada el 30 de diciembre de 2010. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. *Diario Oficial de la Federación*, 32-134.
- Stein, B. A., J. S. Adams y L. S. Kutner, L. S. 2000. Precious Heritage: The Status of Biodiversity in the United States. *Oxford University Press*
- Rogers, A. R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608–615.
- Rogers, A. R. y H. C. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 1181–1184.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. Limusa, Mexico City.
- Sinclair-Winters, C. M. 2014. Upstream or downstream? Population structure of the land snail *Ventridens ligera* (Say, 1821) in the Potomac River drainage basin. *Journal of Molluscan Studies*, 80: 280–285.
- Souza, V., J. L. Siefert, A. E. Escalante, J. J. Elser y L. E. Eguiarte. 2011. The Cuatrociénegas Basin in Coahuila, Mexico: an Astrobiological Precambrian Park. *Astrobiology*, 12: 641–647.
- Taylor, D. W. 1966. A remarkable snail fauna from Coahuila, Mexico. *The Veliger*, 9: 152–228.
- Taylor, D. W., y W. L. Mincley, 1966. New world for biologists. *Pacific Discovery*, 19:18-22.
- Williams, J. E., J. E. Johnson, D. A. Hendrickson, S. Contreras-Balderas, J. D. Williams, M. Navarro-Mendoza, y J. E. Deacon. 1989. Fishes of North America Endangered, Threatened, or of Special Concern: 1989. *Fisheries*, 2-20.

- Wilke, T., G. M. Davis, A. Falniowski, F. Giusti, M. Bodon y M. Szarowska. 2001. Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships. *Proceedings of the Academy of natural Sciences of Philadelphia*, 151(1), 1-21.
- Wulschleger, E. B. y J. Jokela. 2002. Morphological plasticity and divergence in life-history traits between two closely related freshwater snails, *Lymnaea ovata* and *Lymnaea peregra*. *Journal of Molluscan Studies*, 68: 1-5.
- WWF. 2012. Desierto Chihuahuense. WWF. Obtenido de: https://www.wwf.org.mx/que_hacemos/programas/desierto_chihuahuense/

XII. ANEXOS

Anexo 1.

Se muestran las tablas y figuras de las amplificaciones para *Mexithauma quadripaludium* y *Rabdotus* sp.

Tabla 16. Segunda amplificación de *M. quadripaludium* de Poza parque Ilusión y *Rabdotus* sp.

Carril en gel	Muestra
1	I-01 (<i>M. quadripaludium</i>)
2	I-04 (<i>M. quadripaludium</i>)
3	RV2 (<i>Rabdotus</i> sp.)
4	RV4 (<i>Rabdotus</i> sp.)
5	1SPCC (<i>Rabdotus</i> sp.)
6	PCR-1SPCC (<i>Rabdotus</i> sp., re amplificación)
7	Muestra de insecto como control positivo
8	Marcador de peso molecular

I= Individuo de parque Ilusión; RV= *Rabdotus* de Viesca; SP= *Rabdotus* de San Pedro.

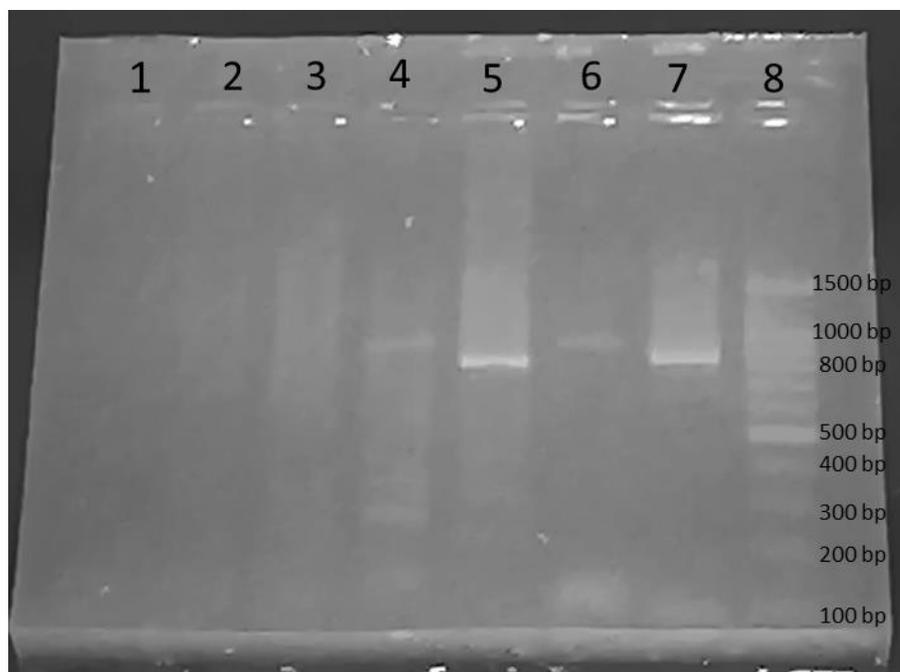


Figura 16. Gel de agarosa de la segunda amplificación de *M. quadripaludium*. En el carril 1 no se ve nada, en el 2 y 3 se alcanza a percibir barrido, 4 y 6 parecieran bandas del mismo tamaño, en el 5 se encuentra una banda definida, así como en el 7 (en dicho carril es la muestra del control positivo).

Tercera amplificación

Tabla 17. Tercera amplificación de *M. quadripaludium* de Poza Mojarral y *Rabdotus* sp.

Carril en gel	Muestra
1	Marcador de peso molecular (Promega)
2	N-T1 control positivo
3	Control negativo
4	M-03 (<i>M. quadripaludium</i>)
5	I-18 (<i>M. quadripaludium</i>)
6	I-25 (<i>M. quadripaludium</i>)

7	2SPCC (<i>Rabdotus</i> sp.)
---	------------------------------

8	5SPCC (<i>Rabdotus</i> sp.)
---	------------------------------

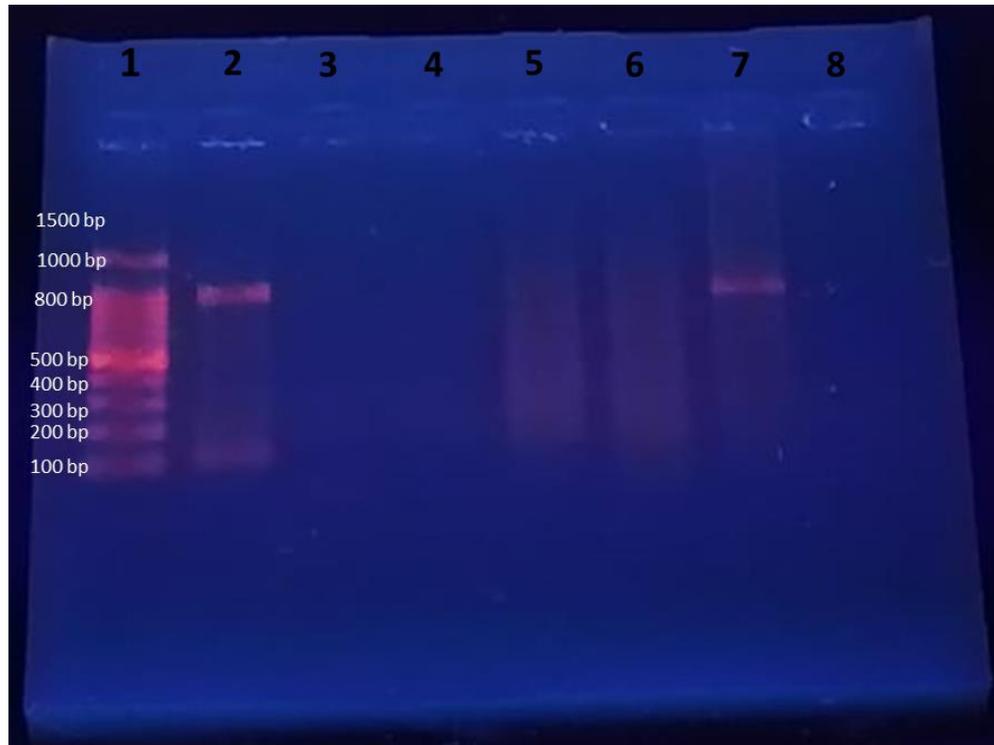


Figura 17. Gel de agarosa de la tercera amplificación de *M. quadripaludium*. En el carril 3 y 4 no se ve nada, en el 5 y 6 se ve solo barrido, en el 7 si hay una banda tenue, y en el 8 tampoco se ve nada. Además, parece que el marcador de peso molecular no se desplego bien.

Amplificaciones con muestras diluidas

Tabla 18. Amplificación con muestras diluidas de *M. quadripaludium* de Parque Ilusión.

Carril en gel	Muestra
1	Marcador de peso molecular (MPM)
2	Control positivo
3	Control negativo
4	I-04
5	I-06
6	I-10
7	I-18
8	I-21

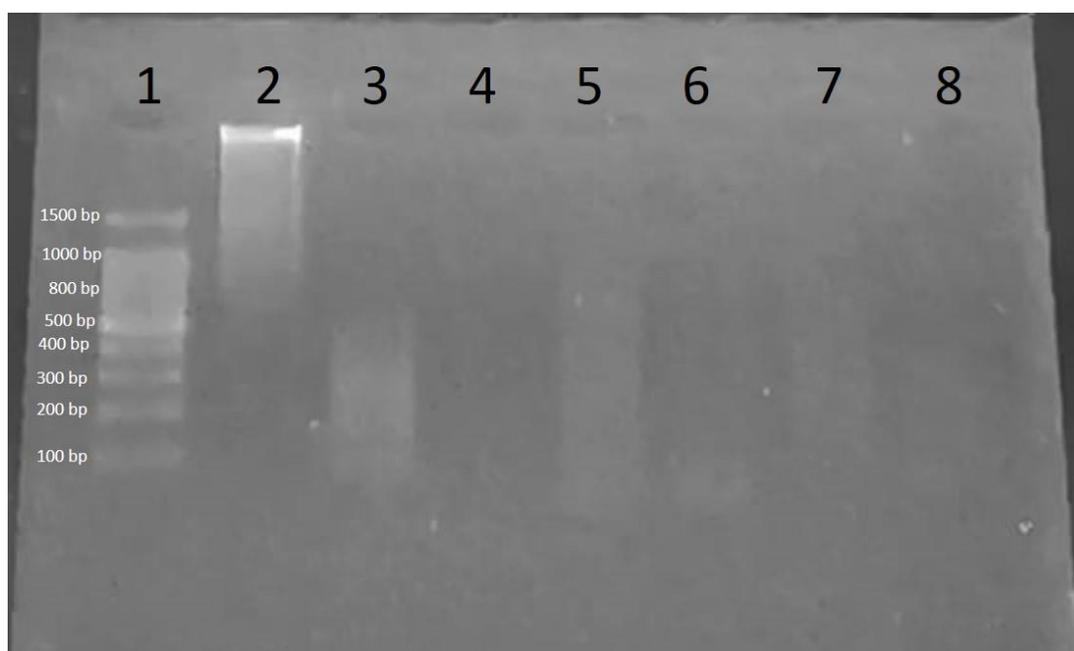


Figura 18. Gel de agarosa de la cuarta amplificación de *M. quadripaludium* con muestras diluidas. En el gel de agarosa solo se ve el marcador de peso molecular

en el carril 1, en el carril 2 el control positivo se quedó en el pocillo y en los demás carriles no se amplificó ninguna de las muestras.

Amplificación del 17 de mayo.

Tabla 19. Amplificaciones de *M. quadripaludium* y además se incluyen algunas muestras de *Rabdotus* sp. que no se había obtenido positivo.

Carril en gel	Muestra
1	Marcador de peso molecular (MPM)
2	Control positivo
3	Control negativo
4	RV1
5	RV2
6	RV3
7	6SP
8	I-01
9	I-04
10	I-17
11	MPM
12	I-20
13	I-21
14	I-22
15	I-23
16	I-25
17	I-29
18	I-30

19	I-31
20	I-32

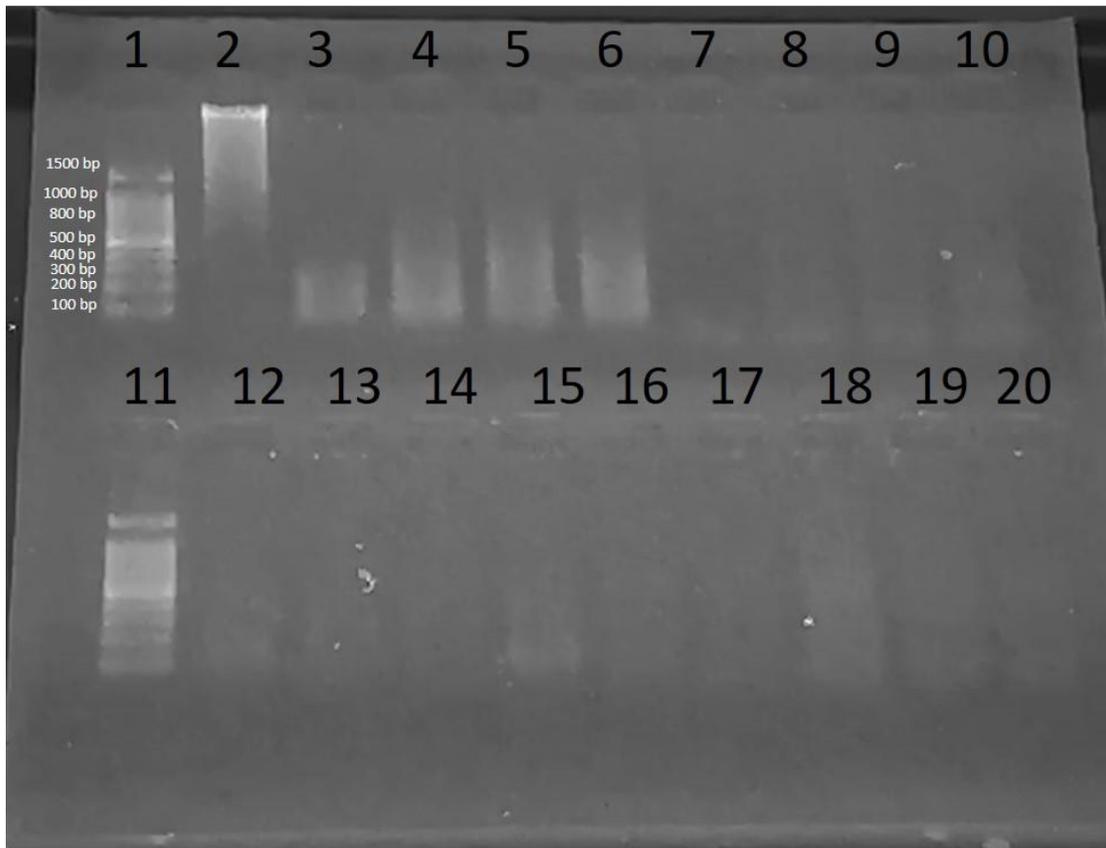


Figura 19. Gel de agarosa de la quinta amplificación de *M. quadripaludium*. En el caso de este gel doble, se ve el marcador de peso molecular en los carriles 1 y 11, el control positivo quedó igual que en la amplificación anterior, y en las demás muestras no hubo amplificación para *M. quadripaludium*. En el caso de *Rabdotus*, de los carriles 4 al 7 solo se ve barrido.

Tabla 20. Amplificaciones con algunas muestras diluidas y los tres conjuntos/mezclas de *M. quadripaludium*.

Carril en gel	Muestra
1	Marcador de peso molecular
2	Control positivo muestra de <i>Rabdotus</i> sp.
3	Control negativo
4	M-04 (diluida)
5	M-05 (diluida)
6	I-02 (diluida)
7	I-25 (diluida)
8	I-30 (diluida)
9	Marcador de peso molecular
10	Control positivo muestra de <i>Rabdotus</i> sp.
11	Control negativo
12	T1 conjunto
13	T2 conjunto
14	T3 conjunto
15	I-18 (diluida)
16	I-19 (diluida)

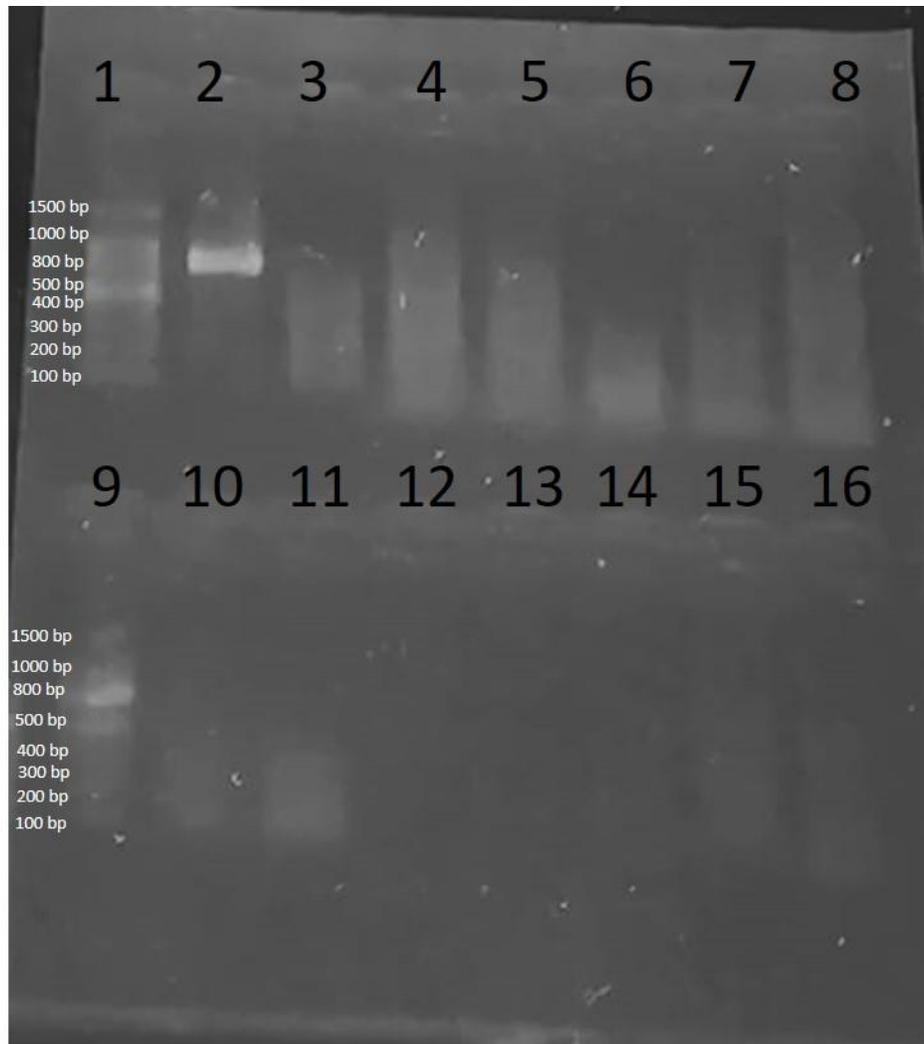


Figura 20. Gel de agarosa de la última amplificación de *M. quadripaludium*. En el gel de agarosa se ve solo una banda que corresponde al control positivo, pero solo en la parte de arriba. Abajo en el carril 10 no se ve y eso es debido a un error en el pipeteo ya que en el carril 9 donde está el MPM también se añadió el control positivo y es por eso que se ve marcada la banda de 800bp. Del carril 12 al 14 corresponden a las muestras de los conjuntos de muestras y tampoco hubo amplificación.

El ciclo de PCR fue el siguiente para las muestras del carril 1 al 8:

Temperatura inicial a 94°C por 3 minutos 30 segundos; seguido de 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de anillamiento 40°C por 1 minuto 30 segundos y 72°C por 1 minuto; luego 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de

anillamiento 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, y finalmente 72°C por 7 minutos.

El ciclo de PCR fue el siguiente para las muestras del carril 9 al 16:

Temperatura inicial a 94°C por 3 minutos 30 segundos; seguido de 5 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de anillamiento 43°C por 1 minuto 30 segundos y 72°C por 1 minuto; luego 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, temperatura de anillamiento 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, y finalmente 72°C por 7 minutos.

Anteriormente en la temperatura de anillamiento en el paso de 5 ciclos se estaba colocando 45°C, el Dr. Murugan sugirió que se hicieran esos dos cambios (40 y 43°C) en esa temperatura.