ESTUDIOS MORFO-ANATÓMICOS Y MOLECULARES DE *MEGALOBULIMUS* SPP. (GASTROPODA PULMONATA) EN LA ARGENTINA, PRINCIPALMENTE DE LA PROVINCIA DE MISIONES

Tesis Doctoral

Autor: Lic. Ariel Aníbal Beltramino

Directora: Dra. Alejandra Rumi Macchi Zubiaurre
Codirector: Dr. Diego Eduardo Gutiérrez Gregoric

2016

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

"ESTUDIOS MORFO-ANATÓMICOS Y MOLECULARES DE *MEGALOBULIMUS* SPP. (GASTROPODA PULMONATA) EN LA ARGENTINA, PRINCIPALMENTE DE LA PROVINCIA DE MISIONES"

Autor:
Lic. en Genética
Ariel Aníbal Beltramino

Directora: Dra. Alejandra Rumi Macchi Zubiaurre
Codirector: Dr. Diego Eduardo Gutiérrez Gregoric

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de La Plata

Lugar de Trabajo:
División Zoología Invertebrados y Laboratorio de Genética Molecular
Museo de La Plata - Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional de La Plata

La Plata, 2016

El presente trabajo para optar al título de Doctor en Ciencias Naturales ha sido realizado en la División Zoología Invertebrados (DZI) y el Laboratorio de Genética Molecular (LGM) del Museo de La Plata (MLP), Facultad de Ciencias Naturales y Museo (FCNyM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), bajo la Dirección de la Dra. Alejandra Rumi Macchi Zubiaurre y la Codirección del Dr. Diego Eduardo Gutiérrez Gregoric.

Tesista: Lic. Ariel Aníbal Beltramino

Directora: Dra. Alejandra Rumi Macchi Zubiaurre

Codirector: Dr. Diego Eduardo Gutiérrez Gregoric

La presentación de esta tesis no constituye una publicación en el sentido del Artículo 8 del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ, 2009) y, por lo tanto, los actos nomenclaturales incluidos en ella carecen de disponibilidad hasta que sean publicados según los criterios del capítulo 4 del Código.

A mi familia…,

[sobre todo en esta etapa a los dos ángeles;
el que se tuvo que ir y el que llegó; María y Abril]

A todos ellos por enseñarme diferentes maneras de ver la vida,
que el cambio es una opción, y por sobre todas las cosas por amarme.

Gracias por ser baranda de mi camino, por ser pañuelo y columpio de mi existencia.

"¡¡¡vamos!!!... que venimos…"

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

Cuando se comienza, ni se piensa en el final. Cuando se transcurre, se cree que nunca llegará. Cuando se acerca, se desea que no llegue. Pero cuando llega, se hace inevitable no mirar hacia atrás. Solo entonces…, es evidente que uno no lo logro solo. ¡¡¡GRACIAS!!!

Agradezco:

A esas dos personas que siempre me inculcaron el trabajo y la honestidad, y que me enseñaron que si uno las combina con sacrificio y pasión, nada es imposible. Gracias Ma y Pa de mi corazón… gracias Ali y Aníbal.

A ese amigo de toda mi vida, mi compañero desde el minuto cero, el que lo compartió y comparte todo. ¡¡¡Gracias Julio!!!, que seamos hermanos es solo una casualidad. No te olvides que te elijo siempre, sin importar nada.

A Abril y la Tita; ¡¡¡Uds. son el amor y la inocencia de mi corazón!!!

A toda la flia: Silvia, Majo, Rosi, Víctor, Walter, Panqui, Juancho; y sobre todo al Mati.

Amílcar, Mariana y Álvaro por ser sostén siempre, cerca o lejos, ¡siempre están en mi corazón!

A Alejandra (Rumi) y Diego (Gutiérrez Gregoric) quienes me guiaron y aconsejaron durante el transcurso de este trabajo de tesis, siempre con gran entusiasmo y excelente predisposición.

A aquellos que han colaborado con esta tesis de diversas maneras y desinteresadamente: Dra. M. Gabriela Cuezzo, Lic. Alejandro Tablado, Dr. Eduardo Tambussi, Mgter. Carlos Kusmeluk, Federico Castía, Mgter. Rosana Bubillo, Dra. Jacqueline Caffetti, Lic. Sandra Martens, Dra. Juana Peso, Lic. Liliana Talavera Stefani, María José Molina, Lic. Elio Castillo, Lic. Gastón Barbero.

A Stella Martín e Inés César por estar incondicionalmente con su inmenso cariño.

A dos grandes amigos, que me han ayudado a implementar el cambio; sin Uds. probablemente esto no sería posible. Gracias Roberto (Vogler) y Sandra (Saffarano). ¡¡¡Mil mil gracias!!!

A los amigos de la infancia y de mis pagos (Morteros, Córdoba), que a pesar de tomar caminos diferentes, han sido parte de cada paso dado. Gringa (Lovera), Sandra (Giordano),

Damián (Molardo), Ale (Olivero), Gi (Mattaloni), Gabi (Peretti), Nati (Tonini), Vero (Franco), Lachi (Paira), Vani (Bergantiños), Seba (Lucero).

A esos amigos de la vida universitaria, que nunca dejaron de estar. Eli (Córdoba), Juanito (Walter Ferrari), San (Martens), Carito (Uribe), Jaqui (Caffetti), Erica (Garcia), Juampi (Fernández), Chiro (Klekailo), Marianito (Sede), Mati (Melendez), Majo (Molina); Rosana (Bubillo); Mario (Ledesma), Mabe (Zapata), Vicky (Camelino), Ceci (Percuoco), Neni (Valdez), Gladys (Acuña), Nora (Sosa), Loli (Castrillo), Gustavito (Büch), Eli (Corvino).

También a aquellas personas que he conocido en esta etapa, y que desinteresadamente han estado siempre compartiendo. Mari (Grossi), Diego (Gutiérrez), Santi (Torres), Marina (Quiroga), Santiago (Morawicki), Santiago (Genta), Lean (Sesto), Mike (Griffin).

A Juana (Peso) y Norma (Meichtry de Zaburlín), por todo su apoyo y confianza en etapas anteriores, ¡¡EN ESTA!!, y… ¡¡¡las que se vengan!!!

A la jefa de la División Zoología Invertebrados, Dra. Cristina Damborenea, y al jefe de Sección de Malacología, Dr. Gustavo Darrigran. Porque desde el minuto cero, y sin conocerme aún, me han hecho parte y actor de un grupo dinámico de trabajo, de sus visiones, de sus metas y sus logros. Agradezco sobre todo su confianza e inalterable predisposición brindada en todos estos años.

A todos los profesionales y compañeros que están o han estado en este periodo en la División Zoología Invertebrados del MLP, los cuales me han brindado siempre un saludo, un mate, un consejo o una palabra de aliento. Tanto aquel que me ofreció un ¡¡¡Buen Día!!!, como el que preparó un mate y dijo vení, tomate uno y contame como estás; TODOS fueron de mucho valor en lo personal. Por ello en particular les doy mis gracias a Mónica Tassara, Luis Pereira, Analía Díaz, Estela Lopretto, Lía Lunaschi, Mariana Adami, Francisco Brusa, Celina Digiani, Fabiana Drago, Lisandro Negrete, Romina Liberto, Florencia Colla, Regina Draghi, Hugo Merlo, Verónica Núñez, Stella Soria.

Deseo hacer explícito mí más profundo agradecimiento al jurado de esta tesis: Dra. Marina B. Chiappero (Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de Córdoba. CONICET), Dra. M. Gabriela Cuezzo (Instituto de Biodiversidad Neotropical del CONICET – Universidad Nacional de Tucumán) y Dr. Néstor J. Cazzaniga (Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur. CIC).

Reconocimientos:

A las autoridades de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la UNLP, en especial a todo el grupo humano de postgrado, por su calidad y calidez humana. Además al Museo de La Plata, y por su medio a su directora Dra. Silvia Ametrano, por hacer de esta mi nueva casa y poner a mi disposición todo a su alcance.

A Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y a CONICET por las becas otorgadas. Además, y por medio de mi directora, por financiar este trabajo de tesis.

A la Sociedades Brasileira de Malacologia (SBMa), y sobre todo a la Asociación Argentina de Malacología (ASAM) por permitirme que este objetivo personal y profesional trascienda a una pasión y compromiso por una disciplina, la Malacología.

A la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, no solo por permitirme optar por un título de grado, sino por hacerme sentir que esa continúa siendo mi casa.

SUMARIO

	Página
INTRODUCCIÓN GENERAL	**1**
OBJETIVOS	**7**
HIPÓTESIS	**8**
CAPÍTULO I: CONQUILIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN	**9**
CAPÍTULO II: ANATOMÍA	**63**
CAPITULO III: GENÉTICA	**126**
CONCLUSIONES	**161**
BIBLIOGRAFÍA	**166**

ÍNDICE ANALÍTICO

Página

ABREVIACIONES GRÁFICAS MÁS FRECUENTES ..... **xviii**
LISTADO DE ESPECIES MENCIONADAS EN ESTA TESIS ..... **xx**
RESUMEN ..... **xxii**
ABSTRACT ..... **xxiv**

INTRODUCCIÓN GENERAL **1**

OBJETIVOS **7**

HIPÓTESIS **8**

CAPÍTULO I: CONQUILIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN **9**
I.1 INTRODUCCIÓN **9**
I.2 MATERIALES Y MÉTODOS **13**
I.2.1 MATERIAL DE ESTUDIO **13**
I.2.2 MORFOLOGÍA CUALITATIVA **16**
I.2.3 MORFOMETRÍA CLÁSICA **18**
I.2.4 MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA **21**
I.2.5 MAPEO DE LA DISTRIBUCIÓN **24**
I.3 RESULTADOS **25**
I.3.1 MORFOLOGÍA CUALITATIVA **25**
I.3.1.1 *Megalobulimus oblongus lorentzianus* (Doering, 1876) **25**
Sinonimia **25**
Localidad y Material Tipo **26**
Lotes Identificados **26**
Descripción **26**
I.3.1.2 *Megalobulimus oblongus musculus* (Bequaert, 1948) **29**
Sinonimia **29**
Localidad y Material Tipo **29**
Lotes Identificados **29**
Descripción **29**
I.3.1.3 *Megalobulimus sanctipauli* (Ihering y Pilsbry, 1900) **32**
Sinonimia **32**
Localidad y Material Tipo **32**

Lotes Identificados **33**
Descripción **33**
I.3.1.4 *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948) **35**
Sinonimia **35**
Localidad y Material Tipo **36**
Lotes Identificados **36**
Descripción **36**
I.3.2 MORFOMETRÍA CLÁSICA **38**
I.3.3 MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA **43**
I.3.4 MAPEO DE LA DISTRIBUCIÓN **49**
I.4 DISCUSIÓN **54**

CAPÍTULO II: ANATOMÍA **63**
II.1 INTRODUCCIÓN **63**
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS **66**
II.2.1 MATERIAL DE ESTUDIO Y ACONDICIONAMIENTO **66**
II.2.2 DISECCIÓN ANATÓMICA **67**
II.2.2.1 Procedimiento de Disección **67**
II.2.2.2 Abreviaturas **69**
II.3 RESULTADOS **71**
II.3.1 *Megalobulimus oblongus lorentzianus* **71**
II.3.1.1 Principales Caracteres Diagnósticos **71**
II.3.1.2 Morfología del Animal Vivo y Masa Visceral **71**
II.3.1.3 Complejo Paleal **75**
II.3.1.4 Sistema Digestivo **77**
Descripción de la Morfología Externa **77**
Descripción de la Morfología Interna **79**
II.3.1.5 Sistema Reproductor **84**
Descripción de la Morfología Externa **84**
Descripción de la Morfología Interna **88**
II.3.2 *Megalobulimus oblongus musculus* **91**
II.3.2.1 Principales Caracteres Diagnósticos **91**
II.3.2.2 Morfología del Animal Vivo y Masa Visceral **92**
II.3.2.3 Complejo Paleal **93**

II.3.2.4 Sistema Digestivo **94**
Descripción de la Morfología Externa **94**
Descripción de la Morfología Interna **94**
II.3.2.5 Sistema Reproductor **96**
Descripción de la Morfología Externa **96**
Descripción de la Morfología Interna **98**
II.3.3 *Megalobulimus sanctipauli* **100**
II.3.3.1 Principales Caracteres Diagnósticos **100**
II.3.3.2 Morfología del Animal Vivo y Masa Visceral **100**
II.3.3.3 Complejo Paleal **101**
II.3.3.4 Sistema Digestivo **103**
Descripción de la Morfología Externa **103**
Descripción de la Morfología Interna **103**
II.3.3.5 Sistema Reproductor **105**
Descripción de la Morfología Externa **105**
Descripción de la Morfología Interna **108**
II.3.4 *Megalobulimus abbreviatus* **110**
II.3.4.1 Principales Caracteres Diagnósticos **110**
II.3.4.2 Morfología del Animal Vivo y Masa Visceral **111**
II.3.4.3 Complejo Paleal **112**
II.3.4.4 Sistema Digestivo **113**
Descripción de la Morfología Externa **113**
Descripción de la Morfología Interna **113**
II.3.4.5 Sistema Reproductor **116**
Descripción de la Morfología Externa **116**
Descripción de la Morfología Interna **118**
II.4 DISCUSIÓN **120**

CAPITULO III: GENÉTICA **126**
III.1 INTRODUCCIÓN **126**
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS **129**
III.2.1 MATERIAL DE ESTUDIO Y ACONDICIONAMIENTO **129**
III.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL **131**
III.2.3 AMPLIFICACIÓN DE GENES MITOCONDRIALES **132**
III.2.4 PURIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN **135**

III.2.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO **135**
III.2.5.1 Caracterización de la Variabilidad Genética **136**
III.2.5.2 Estimación de Distancias Genéticas **137**
III.2.5.3 Abordajes Filogenéticos **137**
Análisis de Distancia **138**
Análisis de Inferencia Bayesiana **138**
III.3 RESULTADOS **139**
III.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL **139**
III.3.2 AMPLIFICACIÓN DE GENES MITOCONDRIALES **140**
III.3.3 ANÁLISIS Y EDICIÓN DE SECUENCIAS **140**
III.3.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO **143**
III.3.4.1 Caracterización de la Variabilidad Genética **143**
III.3.4.2 Estimación de Distancias Genéticas **149**
III.3.4.3 Abordajes Filogenéticos **153**
III.4 DISCUSIÓN **156**
CONCLUSIONES **161**
BIBLIOGRAFÍA **166**

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Estructuras observadas en la descripción cualitativa de las conchas de *Megalobulimus*…. **17**

Figura 2. Variables continuas tomadas para cada espécimen de *Megalobulimus* ………………….. **19**

Figura 3. Estimación del número de vueltas de una concha de *Megalobulimus* …….….……........ **20**

Figura 4. Disposición de *landmarks* utilizados en el estudio de morfometría geométrica …….…… **22**

Figura 5. Concha adulta de *Megalobulimus oblongus lorentzianus* ……..…..…..…..…..………… **27**

Figura 6. Protoconcha de *Megalobulimus oblongus lorentzianus* ……..…..…..…..…..…………… **28**

Figura 7. Concha adulta de *Megalobulimus oblongus musculus* ……..…..…..…..…..……….…..... **30**

Figura 8. Protoconcha de *Megalobulimus oblongus musculus* ……..…..…..…..…..……………… **31**

Figura 9. Concha adulta de *Megalobulimus sanctipauli* ……..…..…..…..…..…………………….. **34**

Figura 10. Protoconcha de *Megalobulimus sanctipauli* …..…..…..…..…..…..…..…..…………… **35**

Figura 11. Concha adulta de *Megalobulimus abbreviatus*…..…..…..…..…..…..…..…..……........ **37**

Figura 12. Protoconcha de *Megalobulimus abbreviatus* …..…..…..…..…..…..…..…..…..……….. **38**

Figura 13. Morfometría clásica: representación de los dos componentes principales del ACP ……. **41**

Figura 14. Morfometría clásica: representación de las dos variables canónicas principales
del CVA ………………………………………………………………………………... **42**

Figura 15. Morfometría geométrica: representación de los dos componentes locales
principales de la forma (RW1 y RW2) …..…..…..…..…..…..…..…..…..………………….. **44**

Figura 16. Retículas de deformación de componentes locales de forma …..…..…..…..…………… **45**

Figura 17. Morfometría geométrica: representación de las dos variables canónicas
principales del CVA …..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…………. **46**

Figura 18. Retículas de deformación a lo largo de los dos ejes canónicos …..…..…..…..………… **48**

Figura 19. Distribución de entidades de *Megalobulimus* identificadas en la Argentina …..…..….... **52**

Figura 20. Distribución de las entidades de *Megalobulimus* identificadas para la provincia
de Misiones …..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…..…...……………... **53**

Figura 21. Animal vivo adulto de *Megalobulimus oblongus lorentzianus* …..…..…..…..…………. **72**

Figura 22. Región visceral de *Megalobulimus oblongus lorentzianus* …..…..…..…..………………... **74**

Figura 23. Complejo paleal de *Megalobulimus oblongus lorentzianus* …..…..…..…..…………….. **76**

Figura 24. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*, estructura externa …..…... **78**

Figura 25. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna del
esófago y estómago ……………………………………………………………………….. **80**

Figura 26. Rádula y arco mandibular de *Megalobulimus oblongus lorentzianus* ………………….... **81**

Figura 27. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna del estómago e intestino **83**

Figura 28. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna de la válvula prerrectal y pliegues intestinales pre y pos valvulares **84**

Figura 29. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*, estructura externa **86**

Figura 30. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; saco glandular anexo y epífalo **87**

Figura 31. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna del espermoviducto y porción femenina **90**

Figura 32. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna de la porción masculina **91**

Figura 33. Animal vivo adulto de *Megalobulimus oblongus musculus* **92**

Figura 34. Complejo paleal de *Megalobulimus oblongus musculus* **94**

Figura 35. Rádula y arco mandibular de *Megalobulimus oblongus musculus* **95**

Figura 36. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus musculus*; estructura interna de la válvula prerrectal y pliegues intestinales pre y pos valvulares **96**

Figura 37. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus musculus*, estructura externa **97**

Figura 38. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus musculus*; saco glandular anexo y epífalo **98**

Figura 39. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus musculus*; estructura interna del espermoviducto, porción femenina y masculina **99**

Figura 40. Animal vivo adulto de *Megalobulimus sanctipauli* **101**

Figura 41. Complejo paleal de *Megalobulimus sanctipauli* **102**

Figura 42. Rádula y arco mandibular de *Megalobulimus sanctipauli* **104**

Figura 43. Sistema digestivo de *Megalobulimus sanctipauli*; estructura interna de la válvula prerrectal y pliegues intestinales pre y pos valvulares **105**

Figura 44. Sistema reproductor de *Megalobulimus sanctipauli*, estructura externa **106**

Figura 45. Sistema reproductor de *Megalobulimus sanctipauli*; saco glandular anexo y epífalo **107**

Figura 46. Sistema reproductor de *Megalobulimus sanctipauli*; estructura interna del espermoviducto y porción femenina **109**

Figura 47. Sistema reproductor de *Megalobulimus sanctipauli*; estructura interna de la porción masculina **110**

Figura 48. Animal vivo adulto de *Megalobulimus abbreviatus* **111**

Figura 49. Complejo paleal de *Megalobulimus abbreviatus* **113**

Figura 50. Rádula y arco mandibular de *Megalobulimus abbreviatus* …… **115**

Figura 51. Sistema digestivo de *Megalobulimus abbreviatus*; estructura interna de la válvula prerrectal y pliegues intestinales pre y pos valvulares …….... **115**

Figura 52. Sistema reproductor de *Megalobulimus abbreviatus*, estructura externa …….. **117**

Figura 53. Sistema reproductor de *Megalobulimus abbreviatus*; saco glandular anexo y epífalo …. **118**

Figura 54. Sistema reproductor de *Megalobulimus abbreviatus*; estructura interna del espermoviducto, porción femenina y masculina …….. **119**

Figura 55. ADN genómico total de ejemplares de *Megalobulimus* …… **139**

Figura 56. Amplificación parcial de los genes mitocondriales COI, Cyt *b* y 16S ARNr …… **140**

Figura 57. Electroferogramas obtenidos para los marcadores mitocondriales COI, Cyt *b* y 16S ARNr …….. **141**

Figura 58. Reconstrucción filogenética mediante el método de distancia y el algoritmo *Neighbour Joining* (NJ) ……..... **154**

Figura 59. Reconstrucción filogenética mediante el método de Inferencia Bayesiana (IB) …….. **155**

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla I. Material empleado en la ejecución de la presente tesis doctoral ……... **14**

Tabla II. Descripción de la posición de los *landmarks* en la concha …….. **22**

Tabla III. Conchas seleccionadas para el análisis de morfometría clásica y geométrica …… **39**

Tabla IV. Resumen de las ocho variables obtenidas a partir de las conchas de las cuatro entidades …..... **40**

Tabla V. Aporte de cada variable a los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) del ACP (Morfometría Clásica) ……..……..……... **41**

Tabla VI. Aporte de cada variable a los dos primeros ejes canónicos (CV1 y CV2) (Morfometría Clásica) ……..……..……..…… **42**

Tabla VII. Asignación de individuos a las cuatro entidades identificadas a partir del CVA (Morfometría Clásica) ……..……..…….. **43**

Tabla VIII. Asignación de individuos a las cuatro entidades identificadas a partir del CVA (Morfometría Geométrica) ……..…….……..... **49**

Tabla IX. Georreferenciación de los lotes analizados ……..……..…. **50**

Tabla X. Material empleado en el análisis anatómico ……..…….. **68**

Tabla XI. Material empleado en el análisis genético ……..…… **129**

Tabla XII. Cebadores utilizados para la amplificación de las regiones parciales de los genes 16S ARNr, COI y Cyt *b* ……..……..……..……. **133**

Tabla XIII. Composición de la mezcla de reacción utilizada en la amplificación del 16S ARNr, COI y Cyt *b* ……..……..……... **134**

Tabla XIV. Detalle de los perfiles térmicos (PT) optimizados y empleados en la amplificación del 16S ARNr, COI y Cyt *b* ……..……..……..... **134**

Tabla XV. Secuencias obtenidas para los individuos de cada entidad y números de accesos a la región parcial de cada marcador en GenBank ……..……. **142**

Tabla XVI. Secuencias obtenidas para el grupo externo y números de accesos a la región parcial de cada marcador en GenBank ……..……..…… **143**

Tabla XVII. Principales estadísticos que resumen la diversidad genética de cada marcador mitocondrial en cada entidad de *Megalobulimus* ……..……... **144**

Tabla XVIII. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. o. lorentzianus* ……..…….. **145**

Tabla XIX. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. o. musculus* ……..…….. **145**

Tabla XX. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. sanctipauli* ……..…… **146**

Tabla XXI. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. o. oblongus* ……..…….. **146**

Tabla XXII. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. abbreviatus* ……..……. **147**

Tabla XXIII. Composición de secuencia para los haplotipos de los marcadores 16S ARNr, COI y Cyt *b* de las entidades de *Megalobulimus* abordadas ……..…….. **148**

Tabla XXIV. Matriz de Distancia Genética (DG) basada en el marcador 16S ARNr ……..….. **150**

Tabla XXV. Matriz de Distancia Genética (DG) basada en el marcador COI ……..…….. **151**

Tabla XXVI. Matriz de Distancia Genética (DG) basada en el marcador Cyt *b* ……..…….. **152**

ABREVIACIONES GRÁFICAS MÁS FRECUENTES

- **5.8S ARNr**: gen ribosomal nuclear 5.8S
- **16S ARNr**: gen ribosomal mitocondrial 16S

- **π**: diversidad nucleotídica
- **°C**: grados centígrados (Celsius)
- **µM**: micromolar
- **µl**: microlitro

- **A°**: arroyo
- **A**: adenina (base nitrogenada)
- **AA**: ancho de la abertura
- **ACP**: Análisis de Componentes Principales
- **ADN**: ácido desoxirribonucleico
- **AE**: ancho de la espira
- **AF**: ancho en vista frontal
- **AL**: ancho en vista lateral

- **bret**: bromuro de etidio

- **C**: citosina (base nitrogenada)
- **c/ PB**: con partes blandas
- **Cap.**: capítulo
- **cm**: centímetro
- **cm^3**: centímetro cúbico
- **COI**: Citocromo Oxidasa subunidad I
- **CP**: componente principal
- **CS**: *centroid size*
- **c.s.p.**: cantidad suficiente para
- **CTAB**: bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- **CV**: eje canónico derivado del CVA
- **CVA**: Análisis Canónico de la Varianza (del Inglés: *Canonical Variates Analysis*)
- **Cyt *b***: Citocromo *b*

- **DG**: Distancia Genética
- **dNTPs**: desoxirribonucleótidos trifosfato
- **DS**: desviación estándar
- **DZI-MLP-Ma**: Colección Malacológica de la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata

- **EDTA**: ácido etildiaminotetraacético
- ***e.g.***: por ejemplo (del Latín: *exempli gratia*)

- **Fig.**: figura
- **Figs.**: figuras
- **IFML-Moll**: Colección Malacológica del Instituto Fundación Miguel Lillo - Tucumán

- ***g***: constante de gravitación universal
- **G**: guanina (base nitrogenada)
- **GPA**: Análisis Generalizado de Procrustes (del Inglés: *Generalized Procrustes Analysis*)
- **gr**: gramos

- **h**: número de haplotipos
- **H**: haplotipo
- **hs**: horas
- **H_D**: diversidad haplotípica

- **IB**: Inferencia Bayesiana
- **ID**: identificación
- ***i.e.***: es decir (del Latín: *id est*)
- **Inte.**: internacional

- **K2P**: Kimura dos Parámetros
- **Kb**: kilobase
- **km**: kilómetro

- **LA**: longitud de la abertura
- **LE**: longitud de la espira
- **LGM-DZI-MLP**: Laboratorio de Genética Molecular del Museo de La Plata, a través de la División Zoología Invertebrados

- **LM**: *landmarks*
- **LT**: longitud total

- **M**: molar
- **MANOVA**: Análisis multivariado de la varianza (del Inglés: *Multivariate Analysis of Variance*).
- **MC**: morfometría clásica
- **MG**: morfometría geométrica
- **mg/ml**: miligramo / mililitro
- **Cl_2Mg**: cloruro de magnesio
- **min**: minuto
- **ml**: mililitro
- **MLP-Ma**: Colección Malacológica del Museo de La Plata
- **mm**: milímetro
- **mM**: milimolar

- **N°**: número
- **N**: cantidad de individuos
- **NaCl**: cloruro de sodio
- **ng**: nanogramo
- **ng/µl**: nanogramo / microlitro
- **NJ**: *Neighbour Joining*
- **NV**: número de vueltas

- **ON**: *overnight* (en Español: durante la noche)

- **p.**: página
- **pb**: pares de bases
- **PCR**: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del Inglés, *Polymerase Chain Reaction*)
- **pH**: medida de acidez o alcalinidad de una disolución
- **p/v**: peso / volumen
- **pp.**: páginas
- **Pl.**: placa
- **Pls.**: placas
- **Prov.**: provincial

- **QV**: valor de calidad (del Inglés: *Quality Value*)

- **RP**: ruta provincial
- **RN**: ruta nacional
- **RW**: *relative warp*
- **RWs**: *relative warps*
- **RWA**: *Relative Warps Analysis*

- ***S***: número de sitios segregantes
- **spp.**: especies
- ***s.s.***: en sentido estricto (del Latín: ***s**ensu **s**tricto*)

- **T**: timina (base nitrogenada)
- **TEA**: tamaño esperado
- **TPS**: *Thin Plate Splines*
- **Tris/HCL**: tris(hidroximetil)aminometano / ácido clorhídrico

- **U**: unidades
- **UV**: ultra violeta

- **v/v**: volumen / volumen
- **V/cm**: voltios / centímetro
- **vp**: vuelta de la protoconcha

LISTADO DE ESPECIES MENCIONADAS EN ESTA TESIS

Acanthina monodon (Pallas, 1774)

Anthinus albolabiatus (Jaeckel, 1927)

Austroborus dorbignyi (Doering, 1876)

Bostryx stelzneri (Dohrn, 1875)

Bulimulus bonariensis bonariensis (Rafinesque, 1833)

Bulimulus bonariensis sporadicus (d´Orbigny, 1835)

Cipangopaludina chinensis (Gray, 1834)

Cornu aspersum (Müller, 1774)

Notodiscus hookeri (Reeve, 1854)

Megalobulimus auritus (Sowerby, 1838)

Megalobulimus bronni (Pfeiffer, 1847)

Megalobulimus capillaceus (Pfeiffer, 1855)

Megalobulimus florezi Borda y Ramírez, 2013

Megalobulimus grandis (Martens, 1885)

Megalobulimus abbreviatus (Bequaert, 1948)

Megalobulimus foreli (Bequaert, 1948)

Megalobulimus granulosus (Rang, 1831)

Megalobulimus paranaguensis (Pilsbry e Ihering, 1900)

Megalobulimus gummatus (Hidalgo, 1870)

Megalobulimus intertextus (Pilsbry, 1895)

Megalobulimus jaguarunensis Fontenelle, Cavallari y Simone, 2014

Megalobulimus leucostoma leucostoma (Sowerby, 1835)

Megalobulimus leucostoma lacunosus (d´Orbigny, 1835)

Megalobulimus leucostoma weyrauchi (Bequaert, 1949)

Megalobulimus lichtensteini (Alberts, 1854)

Megalobulimus lopesi Leme, 1989

Megalobulimus maximus huascari (Tschudi, 1852)

Megalobulimus maximus maximus (Sowerby, 1825)

Megalobulimus mogianensis Simone y Leme, 1998

Megalobulimus oblongus elongatus (Bequaert, 1948)

Megalobulimus oblongus haemastomus (Scopoli, 1786)

Megalobulimus oblongus lorentzianus (Doering, 1876)

Megalobulimus oblongus musculus (Bequaert, 1948)

Megalobulimus oblongus oblongus (Müller, 1774)

Megalobulimus ovatus (Müller, 1774)

Megalobulimus parafragilior Leme y Indrusiak, 1990

Megalobulimus parodizi (Klappenbach y Olazarri, 1965)

Megalobulimus popelairianus popelairianus (Nyst, 1845)

Megalobulimus popelairianus thammianus (Martens, 1876)

Megalobulimus proclivis (Martens, 1888)

Megalobulimus riopretensis Simone y Leme, 1998

Megalobulimus sanctipauli sanctipauli (Ihering y Pilsbry, 1900)

Megalobulimus sanctipauli eyerdami (Bequaert, 1948)

Megalobulimus sanctipauli pygmaeus (Bequaert, 1948)

Megalobulimus separabilis (Fulton, 1903)

Placostylus ambagiosus Suter, 1906

Placostylus bollonsi Suter, 1908,

Placostylus hongii Lesson, 1830

Plagiodontes daedaleus (Deshayes, 1851)

Plagiodontes strobelii (Doering, 1877)

Physa acuta Draparnaud, 1805

Stenophysa marmorata (Guilding, 1828)

RESUMEN

Los gasterópodos del género *Megalobulimus* Miller, 1878 son endémicos de Sudamérica y forman parte de los pulmonados terrestres más grandes del mundo. La mayoría de sus especies y subespecies fueron descriptas originalmente sobre la base de caracteres conquiliológicos, siendo en la actualidad la única información disponible para la delimitación de un gran número de ellas. Sin embargo, muchas de las entidades de *Megalobulimus* presentan superposición de caracteres conquiliológicos que dificulta su identificación. En relación con otros abordajes, *e.g.* anatómicos y genéticos, si bien los antecedentes son escasos, los mismos han permitido complementar las diagnosis taxonómicas de algunas entidades. Para la Argentina, las únicas menciones de estos megamoluscos provienen de listados o catálogos de la malacofauna terrestre, de los cuales se desprende que *Megalobulimus* podría estar representado por cuatro especies (y cinco subespecies). Sin embargo, no hay claridad suficiente sobre cuales entidades y regiones geográficas son ocupadas por estos moluscos en nuestro país. Más aún, prácticamente todas ellas disponen de criterios conquiliológicos como único elemento para su identificación y diagnosis. La presente contribución tiene como objetivo general efectuar un análisis taxonómico enfocado en especies argentinas de *Megalobulimus*, principalmente de la provincia de Misiones, a los efectos de dilucidar su situación sistemática, que actualmente es confusa, produciendo información morfo-anatómica y genética que permita mejorar la descripción y diferenciación de las entidades, como así también, redefinir los caracteres diagnósticos de las mismas. A partir del material analizado, el abordaje conquiliológico cualitativo, principalmente basado en la protoconcha, y complementado con morfometría clásica y geométrica, permitió identificar a *Megalobulimus oblongus lorentzianus*, *M. o. musculus* y *M. sanctipauli*. Estas correspondieron a entidades cuya distribución para la Argentina era esperada. Complementariamente, a partir del material identificado se pudo confirmar y redefinir sus áreas de ocupación. No obstante, una parte del material analizado, mayormente procedente de Misiones, no condijo con las especies o subespecies mencionadas para el territorio nacional, el cual fue identificado como *M. abbreviatus*, informada hasta la fecha solo para el sur de Brasil. A partir del análisis de las partes blandas de estas cuatro entidades, que consistió en la caracterización del complejo paleal, sistema digestivo y reproductor, fue posible evidenciar diferencias para un conjunto de caracteres

anatómicos que complementaron las diagnosis. Algunas de las estructuras principalmente informativas fueron los vasos accesorios del pericardio, vasos adrectales transversales del surco uretral, el riñón, el tabique pulmonar, el plexo epirrenal, el tiflosol intestinal, los pliegues del intestino prevalvular (p1 – p5), la válvula prerrectal, la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca, el saco anexo del oviducto, el oviducto, la vagina, el conducto deferente, el pene y el número de flagelos en la inserción del conducto deferente y el epífalo. Asimismo, se amplificaron y secuenciaron tres marcadores mitocondriales para los individuos de estas entidades. Dos de ellos correspondieron a genes codificantes para proteínas mitocondriales, "Citocromo Oxidasa subunidad I" (COI) y "Citocromo *b*" (Cyt *b*), mientras que el tercero corresponde a una región no codificante para proteínas, el "gen ribosomal mitocondrial 16S" (16S ARNr). El análisis de la evidencia molecular, mediante la estimación de índices de diversidad genética, distancias intra e interespecificas y reconstrucciones filogenéticas permitió respaldar la interpretación dada a los resultados conquiliológicos y anatómicos. Finalmente, la información obtenida en este estudio se suma a los pocos abordajes taxonómicos integrativos existentes en la literatura para entidades del género. Sobre la base de la evidencia conquiliológica, anatómica, genética y de distribución obtenida para las cuatro entidades de *Megalobulimus*, fue posible redefinir sus caracteres diagnósticos, así como evaluar el estatus subespecífico de *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*. Esto, no solo resulta de utilidad para futuros estudios de esta malacofauna en la Argentina, sino también constituye una línea de base para futuras comparaciones con aquellas entidades cuyos abordajes taxonómicos están aún pendientes.

ABSTRACT

Gastropods of the genus *Megalobulimus* Miller, 1878 are endemic to South America and are among the world´s largest land pulmonates. Most of its species and subspecies were originally described based on conchological characters, which is currently the only information available for most of them. However, conchological characters of many *Megalobulimus* widely overlap, thus hampering identification. Relative to other approaches, *e.g.* anatomy and genetics, although few studies are available, they have allowed to complement the taxonomic diagnosis of some entities. For Argentina, the only mentions of these megamolluscs come from lists or catalogs of terrestrial malacofauna, which indicate that *Megalobulimus* may be represented by four species (and five subspecies). However, it is not clear which entities and geographical regions are occupied by these mollusks in our country. Moreover, virtually for all of them the only criteria for identification and diagnosis rely on conchological features. The goal of present contribution is to perform a taxonomic analysis focused on species of *Megalobulimus* from Argentina, mainly from the province of Misiones, aimed to elucidate their systematic situation which is currently confusing, producing morpho-anatomical and genetic information for improving the description and differentiation of the entities, as well as for redefining their diagnostic characters. From the analyzed material, the conchological qualitative approach, mainly based on protoconchs and complemented by classic and geometric morphometrics, allowed the identification of *Megalobulimus oblongus lorentzianus*, *M. o. musculus* y *M. sanctipauli*. These represent entities whose occurrence for Argentina was expected. In addition, their areas of occurrence were confirmed and redefined from the identified material. However, part of the examined material, mostly from Misiones, did not match with the species or subspecies listed for the country, which was identified as *M. abbreviatus*, reported to date only for southern Brazil. From the analysis of soft tissues in these four entities, consisting in the characterization of pallial complex, and digestive and reproductive systems, it was possible to evidence differences for a set of anatomical features that complemented the diagnosis. Some of the mainly informative structures were: accessory vessels of pericardium, transversal ad-rectal vessels of ureteric groove, kidney, pulmonary septum, epi-renal plexus, intestinal typhlosole, folds of the pre-valvar region of intestine (p1 – p5), pre-rectal valve, fertilization pouch-spermathecal

complex, accessory oviduct sac, oviduct, vagina, deferens duct, penis, and number of flagella in the insertion of the deferens duct and epiphalus. Also, three mitochondrial markers for individuals of these entities were amplified and sequenced. Two of them were mitochondrial genes coding for proteins, "Cytochrome oxidase subunit I" (COI) and "Cytochrome b" (Cyt *b*), while the third one belongs to a non-coding mitochondrial region, the "16S ribosomal gene" (16S rRNA). The analysis of the molecular evidence, through the estimation of genetic diversity indices, intra- and interspecific distances and phylogenetic reconstructions, allowed to support the interpretation of the conchological and anatomical results. Finally, the information obtained in this study adds to the few integrative taxonomic approaches available in the literature for entities of the genus. On the basis of the conchological, anatomical, genetic and distributional evidence obtained for the four entities of *Megalobulimus* it was possible to redefine their diagnostic characters, as well as evaluating the subspecific status of *M. o. lorentzianus* and *M. o. musculus*. This is not only useful for future studies of this malacofauna in Argentina, but also constitutes a baseline for future comparison with those entities whose taxonomic approaches are still pending.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Entre los moluscos terrestres, se denominan gigantes o megamoluscos aquellos mayores a cuatro centímetros de longitud total (Emberton, 1995). En Sudamérica, y considerados entre los gasterópodos pulmonados terrestres más grandes del mundo, se encuentran las especies del género nativo *Megalobulimus* Miller, 1878 (hasta 17 cm de longitud total) (Bequaert, 1948; Leme, 1973). Estos megamoluscos se caracterizan por presentar hábitos nocturnos (Bequaert, 1948; Almeida y Almeida Bessa, 2001), permaneciendo enterrados en el suelo u hojarasca durante el día y en periodos de estivación (Hylton Scott, 1939; Bequaert, 1948; Morretes, 1952). Son hermafroditas sin autofecundación, iteróparos con periodicidad anual, con producción de 10 a 18 huevos al año, puestas subterráneas (más de 5 cm desde la superficie) y periodo de incubación de 60 a 90 días. Asimismo, presentan un ciclo de vida largo, que puede llegar en algunas especies hasta 20 años, alcanzando una madurez sexual alrededor de los tres años (Pinto de Oliveira *et al.*, 1984; Rengifo Vásquez *et al.*, 2004; Horn *et al.*, 2005; Fontenelle y Miranda, 2012; Miranda *et al.*, 2015).

Los individuos de las entidades de *Megalobulimus* son difíciles de registrar vivos en la naturaleza como consecuencia de la baja densidad de sus poblaciones y hábitos subterráneos (Hylton de Scott, 1939; Bequaert, 1948; Mansur y Leme, 1996; Fontenelle, 2012; Miranda *et al.*, 2015). Si bien el hallazgo de sus conchas es frecuente, generalmente la mayoría de estas permanecen enterradas *post mortem*, por lo que resulta dificultoso inferir su presencia, así como abordar otros estudios que requieran del animal vivo o sus partes blandas (Hylton Scott, 1939; Bequaert, 1948). Por otra parte, el efecto sinérgico de los rasgos de historia de vida -como larga vida, bajo potencial reproductivo, madurez reproductiva tardía y limitada vagilidad- reducen la capacidad de recuperación de las poblaciones de *Megalobulimus*, y cualquier perturbación en sus requisitos y/o hábitats representa una amenaza potencial (Miranda *et al.*, 2015). En la actualidad, varios de estos megamoluscos se enumeran como amenazados debido a la pérdida de hábitat por actividades antrópicas e impacto del cambio climático global (Agudo-Padrón 2011a, 2012; Barbosa dos Santos *et al.*, 2013; Beltramino *et al.*, 2015a; Miranda *et al.*, 2015; IUCN, 2015). Además, con el fin de centrar la atención en la conservación de los caracoles terrestres poco conocidos de la Mata Atlántica, algunas

especies de *Megalobulimus* se han propuesto recientemente como especies paraguas y emblemáticas, *e.g. Megalobulimus sanctipauli* (Barbosa dos Santos, 2011; Beltramino *et al.*, 2015a).

A nivel taxonómico, Pilsbry (1895-1896) fue el primero en incluir al género *Strophocheilus* Spix, 1827 en la subfamilia Acavinae Pilsbry, 1894, dentro de la familia Helicidae Rafinesque, 1815. Pilsbry (1895-1896) dividió al género en los subgéneros *Strophocheilus s.s.* y *Borus* Albers, 1850, considerando a *Megalobulimus* Miller, 1878 un sinónimo de *Borus* (Pilsbry, 1895-1896; Bequaert, 1948; Leme, 1973). Posteriormente, Pilsbry (1901-1902) eleva a Acavinae a nivel de familia, y Pilsbry (1902) erige la subfamilia Strophocheilinae, siendo Thiele en 1931 el primero en considerar Strophocheilidae como una familia (Thiele, 1929-1935).

En 1936, la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica analiza el caso propuesto por Pilsbry, donde *Borus* Albers, 1850 sería un homónimo de *Borus* Agassiz, 1846, y este último a su vez una enmienda de *Boros* Herbst, 1797 (Coleoptera). Acompañando a la propuesta, Pilsbry considera a *Corus* Jousseaume, 1877 un error tipográfico (en el manuscrito de Jousseaume o en la impresión del mismo) para *Borus* Albers, 1850, que no estaría disponible como base para un nuevo nombre, mientras que *Megalobulimus* Miller, 1878 sí lo estaría (ICZN, 1936; Bequaert, 1948). La Comisión adopta los argumentos de Pilsbry y por principio de prioridad *Megalobulimus* Miller, 1878 queda como nombre válido ante la homonimia de *Borus* Albers, 1850 (ICZN, 1936).

Bequaert (1948) en su revisión taxonómica de la familia Strophocheilidae, basada en caracteres conquiliológicos, ordena a la misma en los géneros *Gonyostomus* Beck, 1837 y *Strophocheilus*, este último con cinco subgéneros: *Strophocheilus s.s.*, *Megalobulimus* Miller, 1878, *Speironepion* Bequaert, 1948, *Microborus* Pilsbry, 1926 y *Chiliborus* Pilsbry, 1926. Morretes (1952) realiza una revisión de las especies de la familia Strophocheilidae de Brasil, basada solo en caracteres de la concha, excluyendo de los Strophocheilidae al género *Gonyostomus*, debido a sus hábitos arborícolas, sosteniendo al género *Strophocheilus* y elevando a *Megalobulimus* al estatus de género con los subgéneros *Megalobulimus s.s.*, *Speironepion* Bequaert, 1948 y *Phaiopharus* Morretes, 1952. Además, Morretes (1952) crea el género *Psiloicus* Morretes, 1952 para

un grupo de especies ubicadas por Bequaert (1948) en el subgénero *Megalobulimus* (Morretes, 1952).

Leme (1973) mediante un extenso abordaje anatómico e incluyendo los caracteres conquiliológicos usados hasta el momento, realiza la última revisión conocida para la familia Strophocheilidae; la cual, queda constituida por siete géneros: *Strophocheilus s.s.*, *Mirinaba* Morretes, 1952, *Austroborus* Parodiz, 1949 (= *Microborus* Pilsbry, 1926), *Chiliborus* Pilsbry, 1926, *Gonyostomus* Beck, 1837, *Anthinus* Albers, 1850 y *Speironepion* Bequaert, 1948. A su vez, propone tratar al subgénero *Phaiopharus* y al género *Psiloicus* como sinónimos del género *Megalobulimus* Miller, 1878. Según Leme (1973), la insuficiencia de los caracteres conquiliológicos sumada a las pequeñas variaciones encontradas en los caracteres anatómicos, no admite la delimitación de subgéneros dentro de *Megalobulimus*, ni la definición de otros géneros para un subconjunto de este grupo de especies. Además, considera que las diferencias anatómicas encontradas en la región bucal, el riñón, el complejo paleal e intestino entre *Megalobulimus* y los siete géneros de Strophocheilidae, son suficientes como para pertenecer a una familia distinta de Strophocheilidae, por lo que crea la familia monogenérica Megalobulimidae.

Bouchet y Rocroi (2005) consideran a Megalobulimidae Leme, 1973 como subfamilia de Strophocheilidae Pilsbry, 1902. Si bien no hay consenso a la fecha, varios trabajos anteriores y posteriores a Bouchet y Rocroi (2005) reconocen a Megalobulimidae como familia válida. Algunos de estos trabajos refieren a: i- descripciones o redescripciones de especies de *Megalobulimus* [*e.g.* Leme (1989), Thomé *et al.* (1994), Leme e Indrusiak (1995), Simone y Leme (1998), Simone (2012)]; ii- comparación de *Megalobulimus* spp. con especies de Strophocheilidae u otros gasterópodos terrestres [*e.g.* Deisler y Stange (1982), Indrusiak y Leme (1985), Pena *et al.* (2004), Davison *et al.* (2005), Borda *et al.* (2010), Bonard *et al.* (2012)]; iii- abordajes biológicos/ecológicos, de distribución, conservación o listados de especies [*e.g.* Quintana (1982), Kawano y Leme (1994), Mansur y Leme (1996), Ramírez *et al.* (2003), Campos Salgado y dos Santos Coelho (2003), Scarabino (2003), Simone (2006), Vera Ardila (2008), Chirinos *et al.* (2010), Miranda y Cuezzo (2010), Rigon *et al.* (2010), Agudo-Padrón (2010, 2011b), Barbosa dos Santos (2011), Beltramino *et al.* (2012a), Breure y Romero (2012), Fontenelle y Miranda (2012), Barbosa dos Santos *et*

al. (2013), Beltramino (2013, 2014)]; y iv- filogenias moleculares de Stylommatophora [*e.g.* Wade *et al.* (2001, 2006)].

En relación con el número de especies, Pilsbry (1895-1896) considera un total de 35 entidades para *Megalobulimus*, de las cuales 24 corresponden a especies y 11 a subespecies distribuidas en seis especies (Pilsbry, 1895-1896; Bequaert, 1948). Bequaert (1948) basado en el ordenamiento y sinonimia propuesta por Pilsbry (1895-1896) e integrando nueve especies y dos subespecies descriptas entre 1900 y 1937, realiza una revisión comparada de conchas de toda Sudamérica. En su monografía, este autor amplía y actualiza la sinonimia propuesta por Pilsbry (1895-1896) y las descripciones conquiliológicas preexistentes, además de delimitar 10 subespecies nuevas, por lo cual reconoce un total de 49 entidades, 24 especies y 25 subespecies contenidas en 10 especies. La obra de Bequaert (1948) es el último abordaje descriptivo comparativo e inclusivo del género *Megalobulimus* en el contexto de su rango de distribución nativo. Desde entonces, solo recientemente se ha comenzado a mencionar en la literatura el número de entidades incluidas en *Megalobulimus*, las cuales se consideran en el orden de las 84 especies descriptas (sin mención de subespecies), distribuidas desde Colombia hasta la Argentina (Borda y Ramírez, 2013; Fontenelle *et al.*, 2014). Este aumento en el número de especies para *Megalobulimus* en parte corresponde a la descripción de especies nuevas (*e.g.* Klappenbach y Olazarri, 1965; Leme, 1989; Simone y Leme, 1998; Borda y Ramírez, 2013; Fontenelle *et al.*, 2014) y redescripciones (*e.g.* Leme, 1993; Leme e Indrusiak, 1995; Borda y Ramírez, 2013; Fontenelle *et al.*, 2014), pero también responde a una elevación al estatus específico de las subespecies tratadas por Bequaert (1948). Morretes (1952) es el primero en elevar parte de estas subespecies y en una revisión de la malacofauna de Brasil considera 44 especies para el género *Megalobulimus*, nueve de las cuales corresponden a especies nuevas, mientras que las 35 restantes corresponden a 14 especies y 20 subespecies de Bequaert (1948). Si bien Morretes (1952) se basa en los mismos caracteres conquiliológicos utilizados por Bequaert (1948) para describir las nuevas especies, no ofrece argumentos para el tratamiento específico de las subespecies.

A la fecha, no hay un consenso sobre el tratamiento dado a nivel infragenérico para *Megalobulimus*. Esto se puede evidenciar en abordajes de estos megamoluscos en Brasil y Perú que han seguido mayormente a Morretes (1952), [*e.g.* Morretes (1953),

Thomé *et al.* (1994), Campos Salgado y dos Santos Coelho (2003), Simone (2006), Fontenelle y Miranda (2012), Ramírez *et al.* (2012), Borda y Ramírez (2013)]; mientras que para Argentina, Uruguay y Paraguay se ha seguido a Bequaert (1948), [*e.g.* Parodiz (1957), Klappenbach y Olazarri (1965), Fernández (1973), Fernández y Castellanos (1973), Quintana (1982), Fernández y Rumi (1984), Cuezzo y Drahg (1995), Scarabino (2003), Miquel y Aguirre (2011)].

Particularmente para la Argentina, Bequaert no visitó las colecciones malacológicas nacionales, aunque sí accedió a material de procedencia argentina depositado en los museos de Europa y Estados Unidos, además de recibir material de los Dres. Maximiliano Birabén y María Isabel Hylton Scott a quienes agradece en su obra (Bequaert, 1948). De tal trabajo se desprende que para la Argentina se registran las siguientes especies y subespecies de *Megalobulimus*: *M. oblongus oblongus*, *M. oblongus haemastomus*, *M. oblongus lorentzianus*, *M. oblongus musculus* y *M. sanctipauli eyerdami*. Parodiz (1957) publica un catálogo de moluscos de la Argentina, siendo este el primer trabajo que enumera todas las especies y subespecies conocidas de moluscos terrestres de nuestro país y zonas limítrofes. Este autor considera en el territorio argentino a las ya propuestas especies y subespecies de *Megalobulimus*, excepto *M. oblongus oblongus*. Además informa la presencia de *M. sanctipauli sanctipauli* y considera a *M. intertextus* y *M. oblongus elongatus* como probablemente presentes en la Argentina (Parodiz, 1957). Fernández (1973) realiza una actualización del listado de la malacofauna terrestre de la Argentina y refrenda para el territorio nacional a *M. intertextus*, *M. oblongus oblongus*, *M. o. haemastomus*, *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. s. sanctipauli*, *M. s. eyerdami*, considerando a *M. o. elongatus* con presencia dudosa al igual que lo propuesto por Parodiz (1957). Adicionalmente, Fernández (1973) incluye a *M. parodizi* descripta como especie nueva en 1965 por Klappenbach y Olazarri.

El trabajo de Bequaert (1948) refleja un esfuerzo por una interpretación taxonómica de *Megalobulimus* en Sudamérica; mientras que para la Argentina solo los antecedentes de Parodiz (1957) y Fernández (1973) dan cuenta de un interés por el género y sus entidades. Si bien ambos trabajos son referencia obligada para el tratamiento general o particular de las entidades del género, ya que delimitan la ocupación geográfica de cada entidad para la Argentina, solo Fernández (1973) ofrece

además una lista sinonímica actualizada desde la propuesta dada por Bequaert (1948). Sin embargo, estos megamoluscos son abordados por Parodiz (1957) y Fernández (1973) como parte de un relevamiento de la malacofauna terrestre de la Argentina en general, no indicando los criterios taxonómicos seguidos ni ofreciendo una descripción para la identificación de dichas entidades, dejando así a Bequaert (1948) como única referencia taxonómica vigente para la Argentina. A la fecha, exceptuando un abordaje anatómico para *M. o. lorentzianus* realizado por Hylton Scott (1939), no se cuenta con ningún otro antecedente (*e.g.* conquiliológico, anatómico, genético) que contribuya a dilucidar y/o confirmar las entidades que habitan en la Argentina o en algún área cuya fauna y flora resulten de interés, *e.g.* el Bosque Atlántico Argentino.

Por todo lo antes expuesto, este trabajo de tesis doctoral tiene como objeto general iniciar un análisis taxonómico de las entidades del género *Megalobulimus* presentes en la Argentina, con principal énfasis en aquellas citadas para la provincia de Misiones. Las principales especies y subespecies blanco de este trabajo serán aquellas que según Bequaert (1948), Parodiz (1957) y/o Fernández (1973) se mencionan para la referida provincia: *M. s. sanctipauli*, *M. o. oblongus* y *M. o. musculus*. Además, se incluirá a *M. o. lorentzianus* por ser la mejor definida en cuanto a su ocupación geográfica en el país y la única que presenta antecedentes anatómicos entre las especies y subespecies mencionadas y conocidas a la fecha para la Argentina. Para definir las entidades, la identificación de los individuos de *Megalobulimus* estará basada en los caracteres conquiliológicos propuestos por Bequaert (1948). Una vez definidas, serán consecutivamente abordadas desde la anatomía y genética con el objeto de complementar los caracteres conquiliológicos de diagnosis. Además, se procurará reconstruir y definir para la Argentina la distribución de las especies y subespecies encontradas en Misiones.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Efectuar un análisis taxonómico enfocado en especies del género *Megalobulimus* para dilucidar su situación sistemática que actualmente es confusa, produciendo información morfo-anatómica y genética que permita mejorar la descripción y diferenciación de entidades como así, redefinir los caracteres diagnósticos de las mismas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a. Realizar estudios anatómicos fundamentalmente de las especies ubicadas en el género *Megalobulimus* presentes en la provincia de Misiones.

b. Realizar análisis morfométricos de sus conchas.

c. Iniciar estudios genéticos y caracterizar la variabilidad genética intra e interespecífica.

d. Actualizar la base de datos geo-referenciada de gasterópodos pulmonados terrestres y analizar patrones de distribución en la Argentina, principalmente de la provincia de Misiones.

HIPÓTESIS

A. En Misiones habitan tres entidades del género *Megalobulimus*. *M. sanctipauli*, *M. oblongus y M. oblongus musculus* (Fernández, 1973).

B. Existen diferencias morfo-anatómicas suficientes que permiten elevar a la subespecie *M. oblongus musculus* a la categoría de especie. *M. sanctipauli y M. oblongus* se sostienen como especies válidas.

C. La información genética delimita las mismas unidades taxonómicas que la morfo-anatomía.

D. Las entidades del género *Megalobulimus* distribuidas en Misiones no son endémicas para la provincia.

CAPÍTULO I: CONQUILIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN

I.1 INTRODUCCIÓN

Después de revisar el género *Megalobulimus*, Bequaert (1948) concluye que los caracteres específicos recaen principalmente sobre la escultura de las vueltas de la protoconcha (formada dentro del huevo y que alcanza de tres a tres vueltas y media); siendo sus costillas verticales (*e.g.* tamaño, forma, extensión, espacio entre costillas) y microgranulación (*e.g.* disposición, densidad, patrones) los caracteres que permiten definir a las especies del género, mientras que el tamaño y la forma de la concha son poco fiables para este propósito. Bequaert (1948) considera que las conchas que presentan una alta semejanza en la escultura de la protoconcha deben considerarse como estrechamente relacionadas, a menudo otorgándoles el estatus de subespecie considerando ahora sí el tamaño y la forma de la concha como útiles para delimitarlas. Con este criterio presente, Bequaert (1948) describió subespecies nuevas (*e.g. M. oblongus musculus*) mientras que otras descriptas originalmente como especies fueron tratadas por el autor como subespecies (*e.g. M. oblongus lorentzianus*). Leme (1973) destaca que muchas de las entidades de *Megalobulimus* presentan superposición de caracteres conquiliológicos, por lo que las mismas deben ser tratadas y delimitadas teniendo presente esta consideración. Además, considera que el aporte de nueva evidencia (*e.g.* geográfica, anatómica) es fundamental para complementar la diagnosis conquiliológica de las entidades del género, ya que si bien los caracteres diagnósticos dados a cada entidad no necesariamente le sean exclusivos, en su conjunto pueden ayudar a una mejor definición y delimitación de las entidades como unidades taxonómicas (Leme, 1973; Mansur y Leme, 1996).

La revisión de *Megalobulimus* realizada por Bequaert en 1948, fue relevante para la época ya que resulta ser el primer trabajo que reunía a todas las entidades del grupo conocidas para ese entonces. Además, se ampliaron e ilustraron la descripciones conquiliológicas originales y la sinonimia de la mayoría de ellas, haciendo a estas descripciones individuales comparables entre sí con la definición de caracteres diagnósticos como la protoconcha, que cruzaban desde lo comparativo a todo el género (Bequaert, 1948). Si bien han transcurrido tres cuartos de siglo desde la monografía de Bequaert (1948), en la actualidad no se cuenta con ninguna otra revisión infragenérica

de *Megalobulimus* en el contexto de su distribución nativa. Esto ha dado lugar a que desde 1948 a la fecha, los trabajos que abordan taxonómicamente redescripciones de entidades del género, o descripciones de especies nuevas, siempre tengan que basarse en Bequaert (1948) y su criterio conquiliológico y descriptivo para validar la entidad que se está redescribiendo o presentando por primera vez [*e.g.* Leme (1989: *M. lopesi*), Leme e Indrusiak (1995: *M. proclivis*), Simone y Leme (1998: *M. riopretensis* y *M. mogianensis*), Borda y Ramírez (2013: *M. separabilis*, *M. capillaceus* y *M. florezi*), Fontenelle *et al.* (2014: *M. jaguarunensis*), Jaramillo Roldán *et al.* (2014: *M. oblongus*)].

Si bien la forma y el tamaño de la concha han formado parte de las descripciones o redescripciones antes mencionadas, el género cuenta con escasos antecedentes que hagan uso de herramientas analíticas que permitan evaluar estadísticamente la variabilidad de sus conchas. La descripción de patrones de variación puede llevarse a cabo mediante métodos estadísticos tales como los multivariados (*e.g.* análisis de componentes principales, de variables canónicas, función discriminante) aplicables a grupos de variables cuantitativas (*e.g.* largo, ancho, alto, ángulos; Toro *et al.*, 2010). Este enfoque es referido en la literatura como morfometría clásica (MC) o tradicional (Rohlf y Marcus, 1993). Otra manera de analizar los patrones de variación es mediante la morfometría geométrica (MG), que permite describir el carácter geométrico de la forma biológica aislada del tamaño, con un tratamiento estadístico adecuado de la variación registrada (Monteiro y Reis, 1999; Adams *et al.*, 2004). Ambos abordajes morfométricos han sido ampliamente aplicados en gasterópodos con distintos fines; *e.g.* Chiu *et al.* (2002: *Cipangopaludina chinensis*), Madec *et al.* (2003: *Cornu aspersum*), Núñez (2011: *Physa acuta* y *Stenophysa marmorata*), Cruz *et al.* (2012: especies del género *Conus*), Vogler *et al.* (2012: especies de *Aylacostoma*), Solas *et al.* (2015: *Acanthina monodon*). Entre los gasterópodos terrestres y con objetivos taxonómicos también se encuentran antecedentes de la aplicación de MC y MG; *e.g.* Madec y Bellido (2007: *Notodiscus hookeri*), Pizá y Cazzaniga (2010: *Plagiodontes daedaleus* y *P. strobelii*), Buckleya *et al.* (2011: *Placostylus ambagiosus*, *P. hongii*, *P. bollonsi* y sus subespecies), Díaz *et al.* (2012: *Bulimulus bonariensis bonariensis* y *B. b. sporadicus*), Miranda y Cuezzo (2014: especies del complejo *Bostryx stelzneri*). En lo que refiere a *Megalobulimus*, recientemente se han empleado por primera vez abordajes de MC y MG con un enfoque taxonómico para evaluar la variabilidad de la forma y tamaño de

las conchas y su valor taxonómico para delimitar entidades presentes en el Perú (Borda y Ramírez, 2013, 2014). Estos análisis incluyeron las especies *M. separabilis*, *M. capillaceus*, *M. florezi* y *M. leucostoma* y sus subespecies (*i.e. M. l. leucostoma*, *M. l. weyrauchi* y *M. l. lacunosus*).

En la Argentina, el único abordaje conquiliológico cualitativo y cuantitativo, no estadístico, para algún representante de *Megalobulimus* posterior a su descripción original lo ofrece Hylton Scott (1939). En su descripción anatómica para *M. o. lorentzianus* Hylton Scott (1939) describe conquiliológicamente esta entidad y la compara con *M. o. oblongus*. En dicho trabajo no se describe ni compara la escultura de la protoconcha y ambas entidades eran consideradas como especies válidas para la época. Casi una década después, el valor de la protoconcha es definido para la diagnosis especifica por Bequaert (1948), tal como ya fuera mencionado, subordinando a *M. lorentzianus* a *M. oblongus* (Bequaert, 1948).

Post Bequaert (1948), las únicas menciones de estos megamoluscos para toda la Argentina provienen de Parodiz (1957) y Fernández (1973), estos autores reflejan un esfuerzo concatenado al de Bequaert (1948) por una interpretación de su distribución en todo el territorio nacional. Si bien es evidente un consenso entre los autores en el tratamiento de las especies y subespecies de *Megalobulimus*, no hay entre ellos un acuerdo sobre qué entidades y regiones son ocupadas por estos moluscos en la Argentina, a saber:

i- *M. o. oblongus*: según Bequaert (1948) se encuentra en Entre Ríos, mientras que según Parodiz (1957) no estaría presente en la Argentina, aunque para Fernández (1973) su distribución alcanza a Jujuy, Salta, Tucumán, Chaco, Misiones y Buenos Aires;

ii- *M. o. musculus*: según Bequaert (1948) se encuentra en Salta y Jujuy, Parodiz (1957) además la considera presente en Corrientes, mientras que Fernández (1973) extiende su distribución hasta Misiones;

iii- *M. o. haemastomus*: está presente en Entre Ríos y Santiago del Estero según Bequaert (1948), Parodiz (1957) además la considera para Corrientes y Fernández (1973) para Santa Fe;

iv- *M. o. lorentzianus*: Bequaert (1948), Parodiz (1957) y Fernández (1973) concuerdan con el área de ocupación, *i.e.* desde Salta a Córdoba;

v- *M. o. elongatus* y *M. intertextus*: según Bequaert (1948) no se encuentran presentes en la Argentina, mientras que Parodiz (1957) cree que podrían estar presentes en Entre Ríos y Santa Fe, respectivamente; Fernández (1973) no puede confirmar la presencia de *M. o. elongatus* para la Argentina, mientras que considera a *M. intertextus* en Salta y Santa Fe;

vi- *M. s. sanctipauli*: según Bequaert (1948) se encuentra en el sur de Brasil y noreste de Paraguay; mientras que para Parodiz (1957) y Fernández (1973) se extiende en la Argentina en las provincias de Misiones y Corrientes;

vii- *M. s. eyerdami*: fue definida como subespecie nueva por Bequaert (1948) sobre la base de un individuo depositado en el Museo de Zoología Comparada (Estados Unidos) procedente de Salta; Parodiz (1957) y Fernández (1973) solo citan a la entidad refiriéndose a Bequaert (1948);

viii- *M. parodizi*: descripta para una localidad de Corrientes (Klappenbach y Olazarri, 1965); Fernández (1973) solo refiere a su descripción original.

En función de lo antes expuesto, en este capítulo se evaluarán las entidades de *Megalobulimus* presentes principalmente en la provincia de Misiones. Para ello se empleará material recolectado en dicha provincia y se incluirá todo aquel, en la medida de lo posible, recolectado en diferentes partes del país que permita la interpretación comparativa del material vinculado a la provincia de Misiones. Este capítulo resulta ser el más inclusivo a partir del material recolectado para la ejecución de esta tesis, ya que solo una pequeña parte del mismo estará representado por partes blandas en los subsiguientes capítulos (*i.e.* anatomía y genética). En el presente abordaje, todo el material conquiliológico será identificado taxonómicamente siguiendo los criterios establecidos por Bequaert (1948). A partir de las entidades identificadas, una submuestra de las mismas será sometida a abordajes de morfometría clásica y geométrica con el objeto de evaluar la variabilidad del tamaño y la forma de las conchas dentro y entre las entidades, y su consecuente valor como carácter diagnóstico. Además, mediante el mapeo del material identificado se procurará delimitar, o redefinir según sea el caso, el área de ocupación de las entidades presentes en Misiones y contextualizar estas con su distribución conocida hasta la fecha para la Argentina (Bequaert, 1948; Parodiz, 1957; Fernández, 1973).

I.2 MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1 MATERIAL DE ESTUDIO

Los esfuerzos de muestreo estuvieron focalizados principalmente en la provincia de Misiones, Argentina y las campañas se llevaron a cabo entre 2011 y 2015. Adicionalmente, se contó con material procedente de campañas y subsidios previos al inicio de esta tesis. El método de recolección empleado en las prospecciones malacológicas fue búsqueda directa y extensiva en periodos diurnos y nocturnos, así como también en áreas naturales, protegidas y no protegidas, y en áreas urbanizadas, ejecutando la recolección de forma manual siguiendo la metodología empleada por Borda y Ramírez (2013, 2014). Todo el material recolectado fue depositado en la Colección Malacológica de la División Zoología Invertebrados del Museo de La Plata (DZI-MLP-Ma).

El material analizado en esta tesis permitió disponer de un vasto número de ejemplares procedentes de la provincia de Misiones, así como de otras provincias de la Argentina (ver Tabla I). Adicionalmente, se contó con dos lotes de la Colección Malacológica del Instituto Fundación Miguel Lillo (IFML-Moll) de San Miguel de Tucumán (préstamo institucional) (Tabla I).

En el caso del material que contaba con partes blandas (ver Tabla I), el mismo fue separado de su concha. El tratamiento dado a las partes blandas y su separación de la concha, se menciona en los capítulos subsiguientes que hacen uso de ellas (capítulo II y III).

Para el presente capítulo se analizaron un total de 54 lotes, los que resultaron en un acumulado de 151 conchas (Tabla I), 120 de las cuales correspondieron a especímenes adultos considerados así por el engrosamiento del peristoma (Pinto de Oliveira *et al.*, 1984; Fontenelle y Miranda, 2012; Borda y Ramírez, 2014).

Tabla I. Material empleado en la ejecución de la presente tesis doctoral. Primero se presenta el material procedente de la provincia de Misiones, el resto de las provincias se presentan siguiendo su disposición política de Norte a Sur y de Este a Oeste. Bajo este último criterio también se presentan las localidades dentro de cada provincia.

Provincia	Sitio, Localidad	Lote		
		ID	N	c/ PB
Misiones	Hito 3 Fronteras, Puerto Iguazú	MLP-Ma 14097	7 (4A+3J)	*
	Arroyo Mariposa, Puerto Iguazú	MLP-Ma 14101	2 (A)	
	Parque Nac. Iguazú (Casa del Guardaparque)	MLP-Ma 14102	3 (2A+1J)	
	Parque Prov. Uruguaí (Ruta 101)	MLP-Ma 14108	1 (A)	
	Parque Prov. Uruguaí (Ruta Prov. 19)	MLP-Ma 14109	5 (A)	
	Parque Prov. Piñalito (al noreste de Tobuna)	MLP-Ma 14110	4 (A)	
	Parque Prov. Esmeralda, San Pedro	MLP-Ma 14098	1 (A)	*
	Parque Prov. Moconá	MLP-Ma 14099	1 (A)	*
	Parque Prov. Salto Encantado (Salto Agutí)	MLP-Ma 14103	1 (A)	
	Valle Cuña Pirú, Aristóbulo del Valle	MLP-Ma 14100	1 (A)	
	San Ignacio	MLP-Ma 14107	3 (A)	
	Al este de San Ignacio	MLP-Ma 14133	5 (A)	
	Parque Prov. Campo San Juan (entre el A° Santa Ana y RN12)	MLP-Ma 14113	2 (A)	
	Santa Ana	MLP-Ma 14119	5 (A)	
	Parque Prov. Campo San Juan	MLP-Ma 14104	3 (A)	
	Costanera Norte de Posadas	MLP-Ma 14130	4 (3A+1J)	*
	Posadas (patio de una casa)	MLP-Ma 14128	3 (1A+2J)	*
	Costa oeste Arroyo Mártires (a 500 m del puente viejo), Posadas	MLP-Ma 14127	1 (J)	*
	Acceso oeste del puente viejo del Arroyo Mártires, Posadas	MLP-Ma 14131	11 (7A+4J)	
	Entre A° Mártrires y Aeropuerto Inte. Gral. San Martín, Posadas	MLP-Ma 14106	1 (A)	
	Barrio Villa Lanús, Gran Posadas	MLP-Ma 14129	2 (A)	*
	Parque Prov. Profundidad, Candelaria	MLP-Ma 14105	1 (A)	
	Parque Prov. Profundidad (casa del guardaparque), Candelaria	MLP-Ma 14111	3 (A)	
	Al sureste de la localidad de Profundidad	MLP-Ma 14112	2 (A)	
	Leandro N. Além	MLP-Ma 14114	2 (A)	
	Parque Provincial Fachinal	MLP-Ma 14118	2 (A)	
		MLP-Ma 14117	3 (A)	
	INTA, Cerro Azul	MLP-Ma 14126	1 (A)	*
		MLP-Ma 14125	1 (A)	*
		MLP-Ma 14132	1 (A)	
	Parque Prov. De las Sierras "Ing. Raúl M. Crovetto"	MLP-Ma 14115	3 (A)	

MLP-Ma, Colección Malacológica del Museo de La Plata. **N**, número de individuos que componen cada lote, entre paréntesis se indica cuantos corresponden a adultos (**A**) y juveniles (**J**); **c/ PB** (con Partes Blandas), * indica que el lote cuenta con especímenes (adultos y/o juveniles) representados por partes blandas incluidos en los subsiguientes abordajes anatómicos y/o genéticos.

Tabla I. Continuación.

PROVINCIA	LOCALIDAD	LOTE		
		ID	N	C/ PB
Salta	Los Toldos (a la altura de La Toma)	IFML-Moll 15857	1 (A)	*
	San Ramón de la Nueva Orán (al noreste de la ciudad)	MLP-Ma 14095	8 (4A+4J)	
	2 km al oeste del Río Bermejo y 10 km al noreste de San Ramón de la Nueva Orán	MLP-Ma 14096	8 (6A+2J)	
	Quebrada San Lorenzo (Al noroeste de la Ciudad de San Lorenzo)	MLP-Ma 14089	3 (A)	
	Cerro San Bernardo, ciudad de Salta	MLP-Ma 14093	1 (A)	
Jujuy	Parque Nac. Calilegua, Dpto. Ledesma	IFML-Moll 15858	2 (A)	*
	Ruta Prov. 13, entre la Estrella-Jujuy y el límite con Salta	MLP-Ma 14090	1 (A)	
	Villamonte	MLP-Ma 14092	2 (1A+1J)	*
		MLP-Ma 14094	14 (8A+6J)	
Formosa	Ruta 86 (26 km desde Villa Gral. Güemes, hacia Gral. Belgrano)	MLP-Ma 14087	1 (A)	*
S. M. de Tucumán	Ciudad de San Miguel de Tucumán	MLP-Ma 14091	2 (1A+1J)	
Corrientes	Rincón Ombú, Ituzaingó	MLP-Ma 14120	1 (A)	
	Al suroeste de Azara, Misiones (= 3 km por RP 94 hacia Corrientes y 1 km por camino de tierra hacia el este)	MLP-Ma 14116	1 (A)	**
	Arroyo Castillo (1 km al este y 1 km al norte del cruce de RN 119 y RP 126), Curuzú Cuatiá	MLP-Ma 14121	4 (A)	
Santa Fe	Villa Trinidad	MLP-Ma 14083	4 (1A+3J)	*
Córdoba	Deán Funes	MLP-Ma 14079	2 (A)	*
	Morteros	MLP-Ma 14084	2 (A)	*
		MLP-Ma 14082	2 (1A+1J)	*
		MLP-Ma 14080	1 (A)	*
		MLP-Ma 14081	1 (A)	*
	Almafuerte	MLP-Ma 14084	1 (A)	*
Buenos Aires	Lincoln	MLP-Ma 14085	2 (1A+1J)	*
	9 de Julio	MLP-Ma 14086	2 (A)	*
TOTAL		**54**	**151**	

MLP-Ma, Colección Malacológica del Museo de La Plata; **IFML-Moll**, Colección Malacológica del Instituto Fundación Miguel Lillo - Tucumán. **N**, número de individuos que componen cada lote, entre paréntesis se indica cuantos corresponden a adultos (**A**) y juveniles (**J**); **c/ PB** (con Partes Blandas), * indica que el lote cuenta con especímenes (adultos y/o juveniles) representados por partes blandas incluidos en los subsiguientes abordajes anatómicos y/o genéticos, ** indica que de la concha vacía se pudo recuperar restos de tejido incluido en el abordaje genético.

I.2.2 MORFOLOGÍA CUALITATIVA

Para la caracterización e identificación taxonómica de las conchas, incluyendo la terminología, se siguió a Bequaert (1948). La observación se realizó mediante visualización directa y bajo lupa flexo (2X). Cuando la observación requirió más detalle (*e.g.* costillas de la protoconcha, microgranulación) se empleó un microscopio binocular estereoscópico (LEICA MZ6 y LABOMED Luxeo 4D). Las imágenes para ilustrar la descripción cualitativa, de la concha y protoconcha, se realizaron con una cámara Nikon Coolpix P500 36X y microscopio binocular estereoscópico LABOMED Luxeo 4D; las imágenes fueron editadas con los programas Corel PHOTO-PAINT X7 y CorelDRAW X7.

La descripción conquiliológica (Fig. 1) consistió en:

Concha: forma y contorno (oval, oval-alargada, elíptica, ahusada); posición del ancho en vista frontal respecto a la longitud total (ancho por debajo de la mitad del largo o ancho cerca de la mitad del largo); sutura (superficial o profunda, Fig. 1B; inclinación en vista dorsal en función al eje vertical, Fig. 1D); banda subsutural (presencia, color; Fig. 1B); color del periostraco (uniforme, variable, con bandas axiales o espirales).

Columela (porción externa del eje columelar, Fig. 1B): grado de desplazamiento hacia la izquierda respecto al eje vertical de la concha (fuerte, leve; Fig. 1A, B); trayectoria (oblicua o recta) y contorno (lineal, curvo o giboso) del borde interno (Fig. 1B).

Protoconcha: costillas axiales (regularidad, abundancia, tamaño ancho/alto, espaciado, trayectoria axial/oblicua, alcance de sutura a sutura); microgranulación (espiral, axial, concentrada, dispersa).

Espira (Fig. 1A**)**: forma (cónica, redondeada, angosta, ahusada); forma de la base en relación con la última vuelta (atenuada, continua); contorno (convexo, aplanado convexo); forma del ápice (puntiagudo, redondeado, aplanado).

Última Vuelta (Fig. 1A): forma (obesa-oval, oval-alargada, elíptica, ahusada); contorno (convexo, aplanado convexo).

Escultura (de la teleoconcha): costillas axiales (regularidad, abundancia, tamaño ancho/alto, espaciado); microgranulación (densidad y disposición -espiral/axial/dispersa-).

Abertura (Fig. 1A): forma (oval, semi-elíptica, elíptica); posición del eje mayor (longitud de la abertura -LA-, Fig. 2A) respecto al eje vertical de la concha.

Callo parietal (Fig. 1B): presencia; color; borde (interno y externo); nitidez.

Labio: convexidad; ancho (vista frontal, Fig. 1A); espesor (vista lateral izquierda, Fig. 1C).

Orificio umbilical (Fig. 1E): moderadamente abierto, cerrado.

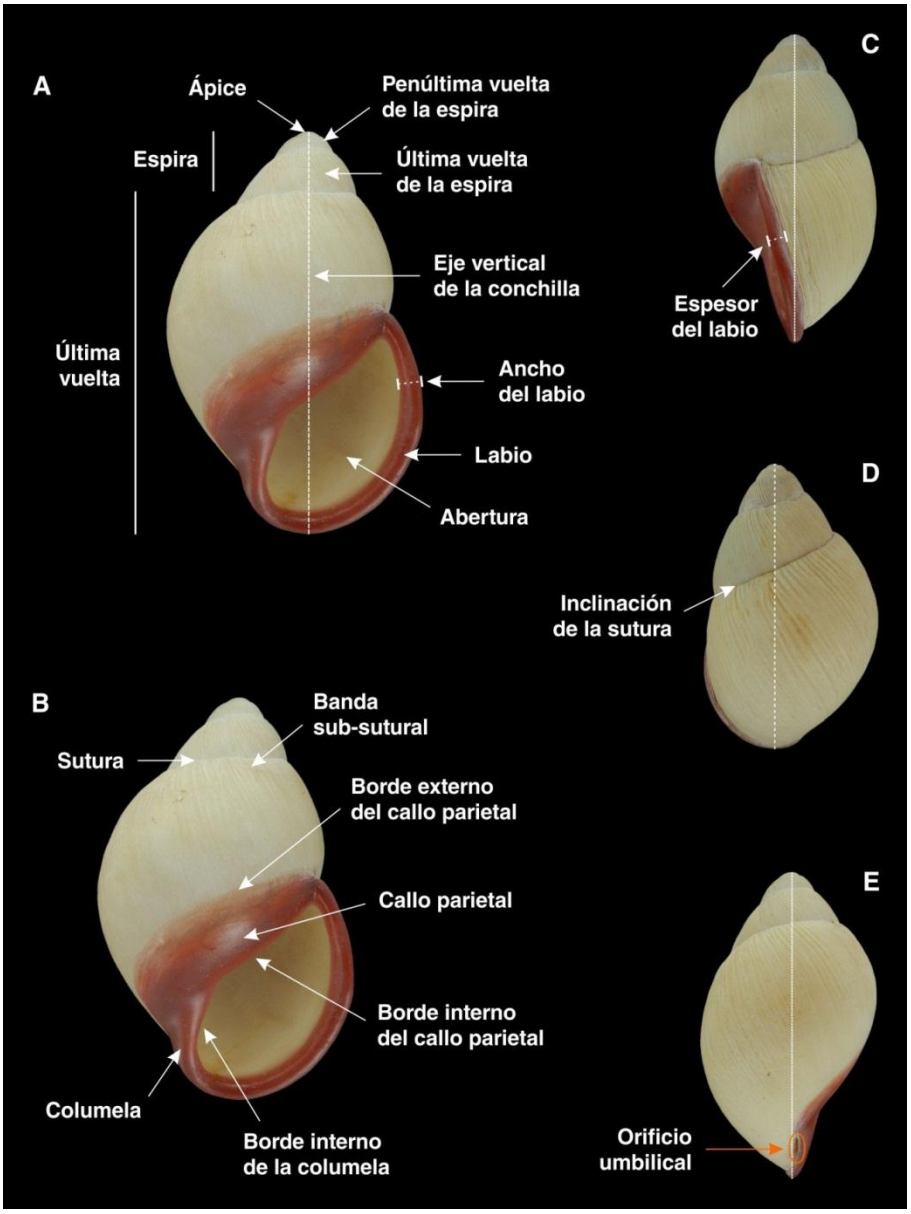

Figura 1. Estructuras observadas en la descripción cualitativa de las conchas de *Megalobulimus*. A, **B**: vista ventral; **C**: vista lateral derecha; **D**: vista dorsal; **E**: vista lateral izquierda. La línea punteada en A, C, D, E indica el eje mayor de la concha. El ápice indica el extremo posterior, su punto opuesto en el borde inferior del labio indica el extremo anterior.

Considerando a esta parte del acápite el más apropiado para presentar información vinculada a la historia taxonómica de las entidades que resulten aquí identificadas, es que se acompañará a cada descripción presentada en los resultados (y según corresponda el caso) con una lista sinonímica, material tipo y localidad tipo, como ya fuera confirmada en las publicaciones originales y/o precedentes a esta tesis, y solo serán añadidos más detalles cuando sea posible, con el objeto de complementar dicha información.

I.2.3 MORFOMETRÍA CLÁSICA

Una vez que el material fue asignado a entidades (especies o subespecies) de *Megalobulimus* mediante el análisis cualitativo de la concha, una submuestra de cada una de ellas (aproximadamente 15 individuos adultos, dependiendo de la disponibilidad de cada caso) se seleccionó para el abordaje de morfometría clásica, con el objeto de testear si este análisis estadístico proporciona información complementaria a las observaciones cualitativas. También se tuvo en cuenta para la selección que las conchas estuvieran completas y que no presentaran traumatismos durante su crecimiento. Asimismo, siempre que se pudo, se incluyó todo aquel material cuyas conchas contaban con partes blandas y se procuró representar el rango geográfico indicado por la procedencia de los lotes.

Por cada ejemplar seleccionado se tomaron ocho variables continuas (Fig. 2 y 3). Para siete de ellas (longitud total, ancho en vista frontal y dorsal, longitud y ancho de la espira, longitud y ancho de la abertura) se empleó un calibre digital (Litz® *Professional*, rango de 0 - 150 mm, precisión de dos decimales) y los valores fueron expresados en mm. Para cinco de estas variables se siguió a Bequaert (1948) y Thomé *et al.* (1994) (*i.e.* LT, AF, AL, LA y AA), mientras que para las dos variables restantes (*i.e.* LE y AE) se siguió a Parodiz (1951) y Borda y Ramírez (2013, 2014). A continuación las variables son definidas y se describe el criterio de medición.

Longitud total (**LT**; Fig. 2A): es la del eje vertical largo de la concha, medido desde el ápice hasta el borde basal del labio.

Ancho en vista frontal (**AF**; Fig. 2A): es el diámetro transversal mayor, medido en ángulos rectos al eje vertical, desde el margen izquierdo de la última vuelta hasta el borde exterior más alejado del labio.

Ancho en vista lateral (**AL**; Fig. 2B): es el diámetro dorso-ventral de la última vuelta, medido en ángulos rectos al eje vertical de la concha.

Longitud de la espira (**LE**; Fig. 2A): porción del eje vertical (LT) que va desde el ápice hasta la sutura que separa la espira de la última vuelta.

Ancho de la espira (**AE**; Fig. 2A): es el diámetro de la base de la espira, medido paralelamente a la sutura que separa la espira de la última vuelta, desde sus extremos más distantes al eje vertical de la concha.

Longitud de la abertura (**LA**; Fig. 2A): es el eje o diámetro más largo, desde el interior del extremo superior de la unión del labio y la pared parietal, hasta el interior del borde basal del labio.

Ancho de la abertura (**AA**; Fig. 2A): es el mayor diámetro transversal, medido en ángulo recto al eje mayor de la abertura, desde el borde interior de la columela al borde interior del labio.

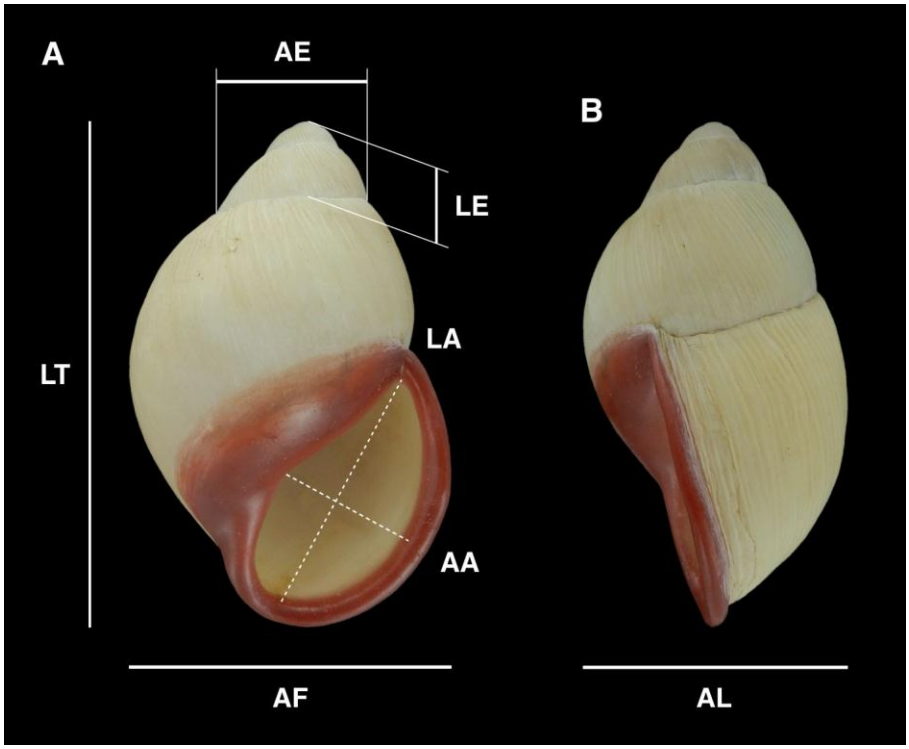

Figura 2. Variables continuas tomadas para cada espécimen de *Megalobulimus*. **A**: LT, longitud total; AF, ancho en vista frontal; LE, longitud de la espira; AE, ancho de la espira; LA, longitud de la abertura; AA, ancho de la abertura; **B**: AL, ancho en vista lateral.

La octava variable continua fue el **número de vueltas** (**NV**) de la concha. Para ello se adaptó a *Megalobulimus* el *procedimiento de Diver* descripto por Parodiz (1951). Este consiste en tomar una imagen (o esquema) de una concha en vista posterior (Fig. 3). Sobre esta se debe ubicar el inicio de la espira (en la primera vuelta de la protoconcha; "*a*" en la Fig. 3A, C) y donde termina la línea de sutura (por detrás del borde externo del labio; "*c*" en la Fig. 3A, B); luego se traza una línea de unión entre esos puntos (línea punteada "*ac*"; Fig. 3A). Desde el mismo punto inicial ("*a*"), se traza una línea en sentido contrario al cierre de la primera vuelta de la protoconcha (Fig. 3C) hasta el borde de la última vuelta completa ("*b*" en la Fig. 3A, B). El ángulo formado entre "*b*" y "*c*" representa la fracción de la última vuelta que no alcanza la unidad (Fig. 3B). La Fig. 3 da un ejemplo, en la imagen A se pueden contar cinco vueltas enteras, mientras que el ángulo formado por la última vuelta incompleta en la imagen B es de 319,49° (equivalente a 0,88 vuelta); así la concha muestra cinco vueltas +319,49° o 5,88 vueltas (esta última fue la expresión elegida). De cada espécimen se obtuvo una imagen digital con una cámara Nikon Coolpix P500 36X y los ángulos fueron medidos con la herramienta "Cotas Angulares" del programa CorelDRAW X7.

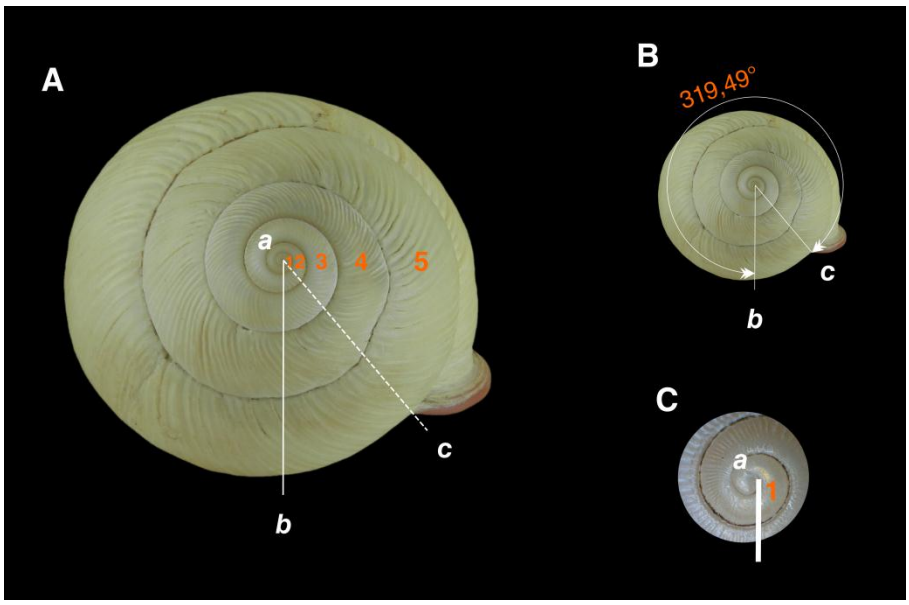

Figura 3. Estimación del número de vueltas de una concha de *Megalobulimus*. **A**: muestra los vectores *ac* (une los puntos de inicio y finalización de la sutura) y *ab* (delimita el número de vueltas enteras, indicadas como 1-5 en naranja); **B**: estimación de la proporción de la vuelta incompleta usando como referencia los vectores *ac* y *ab*; **C**: ampliación de la protoconcha para indicar el establecimiento del vector *ab* definido por la primera vuelta.

Una vez tomadas las ocho variables para los individuos seleccionados se calcularon para cada entidad identificada los estadísticos básicos (media y desviación estándar, mínimo y máximo). Posteriormente, las medidas tomadas para cada individuo fueron transformadas a logaritmo a los efectos de su normalización y sometidas a un Análisis de Componentes Principales (ACP), el cual permite resumir la estructura de los datos en factores no correlacionados entre sí (Núñez, 2011; Borda y Ramírez, 2013, 2014). Luego, con el objeto de evaluar la significancia de las variables normalizadas se realizó un MANOVA. Consecutivamente, estas variables fueron usadas en un Análisis Canónico de la Varianza (CVA, *Canonical Variates Analysis*) para maximizar la separación entre los grupos (Zelditch *et al.*, 2004). Además, se estimó la tasa de asignación correcta de individuos a cada grupo mediante la obtención de las matrices de clasificación y confusión corregidas por remuestreo mediante *Jackknife* (Vogler *et al.*, 2012). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa PAST 2.16 (Hammer *et al.*, 2013).

I.2.4 MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

Los mismos ejemplares seleccionados para el análisis de morfometría clásica se digitalizaron con cámara Nikon Coolpix P500 36X fijada en un estativo, utilizando como referencia una escala graduada en cm. En todos los casos, se utilizó la misma orientación de la concha, con el eje de torsión y la abertura en el mismo plano que el objetivo de la cámara, como se muestra en la Fig. 4.

Con el objeto de capturar las diferencias de forma, se seleccionaron 12 *landmarks* (Fig. 4, Tabla II) siguiendo el criterio empleado por Borda y Ramírez (2014) para especies de *Megalobulimus*. En gasterópodos, estos puntos no necesariamente representan *landmarks* homólogos (desde el punto de vista del desarrollo), aunque los mismos permiten capturar y analizar de manera objetiva y repetitiva la forma de la concha de los especímenes (Carvajal-Rodríguez *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2012). Para el resto del abordaje morfométrico también se tuvieron en cuenta los trabajos de Cruz *et al.* (2012), Vogler *et al.* (2012) y Miranda y Cuezzo (2014). La digitalización de las coordenadas de *landmark*s fue obtenida mediante el programa TPSDIG 2.19 (Rohlf, 2008).

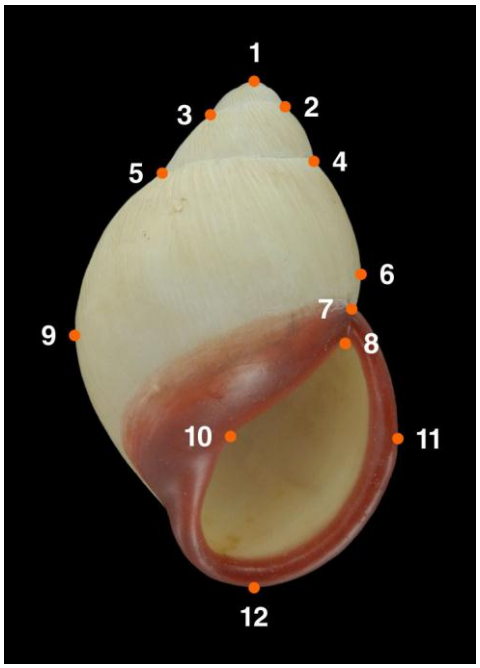

Figura 4. Disposición de *landmarks* utilizados en el estudio de morfometría geométrica. Vista ventral de una concha de *Megalobulimus* que muestra la posición de los 12 *landmarks*. Ver descripción de los *landmarks* (LM) en Tabla II.

Tabla II. Descripción de la posición de los *landmarks* en la concha.

LM	POSICIÓN
LM1	Sobre el ápice de la concha.
LM2	Sobre el perfil derecho de la concha, en el extremo de la sutura superior de la última vuelta de la espira.
LM3	Sobre el perfil izquierdo de la concha, en el extremo de la sutura superior de la última vuelta de la espira.
LM4	Sobre el perfil derecho de la concha, en el extremo de la sutura inferior de la última vuelta de la espira.
LM5	Sobre el perfil izquierdo de la concha, en el extremo de la sutura inferior de la última vuelta de la espira.
LM6	En el punto más externo del contorno derecho de la última vuelta.
LM7	En el extremo superior de la inserción del labio externo en la última vuelta.
LM8	En el extremo inferior de la inserción del labio externo en la última vuelta.
LM9	En el punto más externo del contorno izquierdo de la última vuelta.
LM10	Sobre el punto más externo del perfil izquierdo de la abertura de la concha.
LM11	Sobre el perfil derecho de la concha, en el punto más externo del labio externo.
LM12	Sobre el punto más bajo de la base.

LM: *landmark*.

Con el fin de eliminar la posible variación debida a diferencias en escala y orientación, y establecer una configuración "promedio" de los diferentes especímenes, las configuraciones de coordenadas "crudas" de todos los ejemplares fueron alineadas utilizando Análisis Generalizado de Procrustes (GPA, *Generalized Procrustes Analysis*; Rohlf y Slice, 1990; Cavalcanti *et al.*, 1999; Rohlf, 1999). Esta configuración promedio fue usada como configuración de referencia para obtener de cada individuo una variable para el tamaño (factor de escala), *i.e. centroid size* (CS), y un conjunto de variables para la forma, *i.e.* componentes uniformes (diferencias globales) y no-uniformes (deformaciones de forma locales) (Cavalcanti *et al.*, 1999; Conde-Padín *et al.*, 2007; Strauss, 2010).

Seguidamente, las coordenadas alineadas de todos los especímenes fueron analizadas mediante *Thin Plate Splines* -TPS- y *Relative Warps Analysis* -RWA- (Bookstein, 1991; Rohlf, 1993) a los efectos de analizar y visualizar la dirección de la diferencia de forma. Resumidamente esta metodología consiste en obtener una placa hipotética infinitamente delgada que representa la configuración de referencia. Esta placa es posteriormente deformada hasta que coincide con la forma "*target*" (Bookstein, 1989, 1991; Rohlf *et al.*, 1996), donde la deformación de la placa reflejará la discrepancia entre *landmarks* (Bastir *et al.*, 2004). En este punto, la forma se halla descompuesta en sus componentes uniformes y no uniformes (Strauss, 2010). Con el objeto de caracterizar la variación de forma local, los componentes no uniformes fueron a su vez descompuestos en deformaciones parciales o *partial warps*, cada una siendo un componente de cambio en la forma (Conde-Padín *et al.*, 2007). Estas deformaciones parciales reflejan las cantidades de "energía de torsión", la cual fue utilizada en la derivación de los descriptores de forma, *i.e.* los puntajes de deformaciones parciales o *partial warp scores* (Bastir *et al.*, 2004). Los *relative warps* -RWs- son los componentes principales de cualquier tipo de variables de forma y reflejan las mayores tendencias en la variación de la forma. El RWA y el cómputo de los puntajes de deformaciones parciales se realizó mediante el programa TPSRELW 1.60 (Rohlf, 2010) con la opción de escala $\alpha = 0$ que pondera todos los *landmarks* igualitariamente, lo cual es considerado más apropiado para estudios sistemáticos (Rohlf *et al.*, 1996; Cavalcanti *et al.*, 1999).

Las variables morfométricas derivadas (RWs) que acumularon el 5% o más, fueron incluidas en un MANOVA (Plomp *et al.*, 2015), con la finalidad de evaluar la

significancia de la forma media de los grupos. Consecutivamente, se realizó a los mismos RWs un CVA, con el objeto de maximizar la separación entre los grupos (Zelditch *et al.*, 2004), para estimar tasas de clasificación erróneas (*i.e.* matrices de clasificación y confusión; Vogler *et al.*, 2012) y para evaluar las diferencias de forma que mejor distinguen a los grupos (Márquez *et al.*, 2010). Las retículas de deformación a lo largo de los ejes de los RWs y canónicos fueron generadas mediante el programa TPSREGR 1.42 (Rohlf, 2011) y los análisis estadísticos fueron realizados con PAST 2.16 (Hammer *et al.*, 2013).

I.2.5 Mapeo de la Distribución

La descripción de la localidad asociada a cada ejemplar o grupo de ejemplares (= lotes analizados) fue georreferenciada siguiendo los criterios y procesos establecidos en el método de punto-radio (Wieczorek *et al.*, 2004; CONABIO, 2008). La aplicación del método fue equivalente a la realizada por Beltramino (2013, 2014) y Beltramino *et al.* (2015a), asistida por el sistema de información geográfica de cartografía digital Google Earth, SIG-SEGEMAR (Sistema de Información Geográfica del Servicio Geológico Minero Argentino, http://sig.segemar.gov.ar/) y el nomenclador geográfico *online* GEOLocate (http://www.museum.tulane.edu/geolocate/default.html). El *datum* geodésico empleado fue WGS84. Las coordenadas geográficas de cada descripción de localidad, informada en la Tabla I, fue recuperada y expresada mediante el sistema de coordenadas de grados/minutos/segundos. La incertidumbre total (o error de georreferenciación) para cada registro fue expresada en kilómetros y cuantificada mediante el programa MaNIS (Wieczorek *et al.*, 2001, 2012; Wieczorek y Bloom, 2011).

Las coordenadas geográficas, obtenidas en grados/minutos/segundos, fueron convertidas a coordenadas decimales mediante el conversor de MaNIS (Wieczorek *et al.*, 2001, 2012; Wieczorek y Bloom, 2011). Posteriormente estas fueron empleadas para mapear la distribución de cada entidad de *Megalobulimus* identificada mediante ArcGIS v.9.3 (ESRI, 2008). Para ello, el conjunto de registros fue proyectado sobre todas las provincias de la Argentina. El *shape* de dicha superficie se descargó de la base de datos espaciales de DIVA-GIS (http://www.diva-gis.org).

I.3 RESULTADOS

I.3.1 MORFOLOGÍA CUALITATIVA

El material de estudio presentado en la Tabla I, revisado bajo los criterios conquiliológicos establecidos por Bequaert (1948), permitió organizarlo en cuatro entidades. A continuación se presenta cada una de las entidades identificadas:

Sistemática

Clase Gastropoda Cuvier, 1797

Orden Pulmonata Cuvier, 1817

Suborden Stylommatophora Schmidt, 1856

Superfamilia Strophocheiloidea Pilsbry, 1902

Familia Megalobulimidae Leme, 1973

Género *Megalobulimus* Miller, 1878

Megalobulimus oblongus lorentzianus (Doering, 1876)

Megalobulimus oblongus musculus (Bequaert, 1948)

Megalobulimus sanctipauli (Ihering y Pilsbry, 1900)

Megalobulimus abbreviatus (Bequaert, 1948)

I.3.1.1 *Megalobulimus oblongus lorentzianus* (Doering, 1876)

<u>*Sinonimia*</u>

Bulimus (Borus) lorentzianus Doering, 1876: Doering, 1876: 336/7; Doering, 1877: 255/6.

Strophocheilus (*Borus*) *lorentzianus*: Pilsbry, 1895-1896: 197; Pilsbry, 1901-1902: 125.

Borus oblongus var. *minor*: Ancey, 1897: 12.

Borus lorentzianus: Pilsbry, 1901-1902: 125; Cockerell, 1926: 77-78 (Pl. 4, Fig. 4).

Strophocheilus (*Borus*) *lorenzianus*: Pilsbry, 1902: v, xxxvi.

Borus oblongus var. *lorentzianus*: Frenguelli, 1923: 406 (Fig. 3, 4, 8 y 9); Cockerell, 1926: 77; Hylton Scott, 1939: 218.

Borus (o *Strophocheilus) lorentzianus*: Hylton Scott, 1939: *partim* (Fig. p. 220, Figs. 1-24); Martinez-Pereira *et al.*, 2013: 327.

Strophocheilus (Megalobulimus) oblongus lorentzianus: Bequaert, 1948: 20, 24, 56, 60-62, 80-84, 86, 122, 206-7, (Pl. 27, Fig. 5); Parodiz, 1957: 132; Sawaya y Petersen, 1962: 33; Fernández y Castellanos, 1973: 276 (lámina IV, Fig. 10); Fernández, 1973: 66; Vasta *et al.*, 1975: 107, 111; Fernández y Rumi, 1984: 215.

Strophocheilus oblongus lorentzianus: Sawaya y Petersen, 1962: 36, 38; Fernández, 1978: 150 (Fig. 2).

Megalobulimus lorentzianus: Miquel y Parent, 1996: 108, 111; Simone y Leme, 1998: 201-2; Pena *et al.*, 2004: 49, 50; Borda *et al.*, 2010: 43; Borda y Ramírez, 2013: 689, 690; Beltramino, 2014: 10, 11 (Fig. 1).

Megalobulimus loretzianus: Borda *et al.*, 2010: 51.

Megalobulimus oblongus lorentzianus: Miquel y Aguirre, 2011: 111, 128 (Fig. 13).

Localidad y Material Tipo

Localidad Tipo: Sierras de Tucumán, Salta y Jujuy, Argentina (Doering, 1876).

Material Tipo: Si bien Doering (1876) no indicó el repositorio del material empleado por él para describir la nueva especie; Bequaert (1948) sugirió que el mismo probablemente se encuentra en el Museo de Zoología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Lotes Identificados

IFML-Moll 15857, MLP-Ma 14079, MLP-Ma 14080, MLP-Ma 14081, MLP-Ma 14082, MLP-Ma 14083, MLP-Ma 14084, MLP-Ma 14085, MLP-Ma 14086, MLP-Ma 14087, MLP-Ma 14088, MLP-Ma 14089, MLP-Ma 14090.

Descripción

Concha (Fig. 5): forma oval, contorno cónico-oval; ancho máximo por debajo de la mitad del largo; sutura no profunda, inclinada en su vista dorsal; banda subsutural clara ausente; color marfil opaco sin lustre, uniforme; internamente blanco nacarado

uniforme. **Columela** (Fig. 5): desplazada hacia la izquierda del eje mayor de la concha; trayecto recto; contorno del borde interno liso, lineal, no giboso.

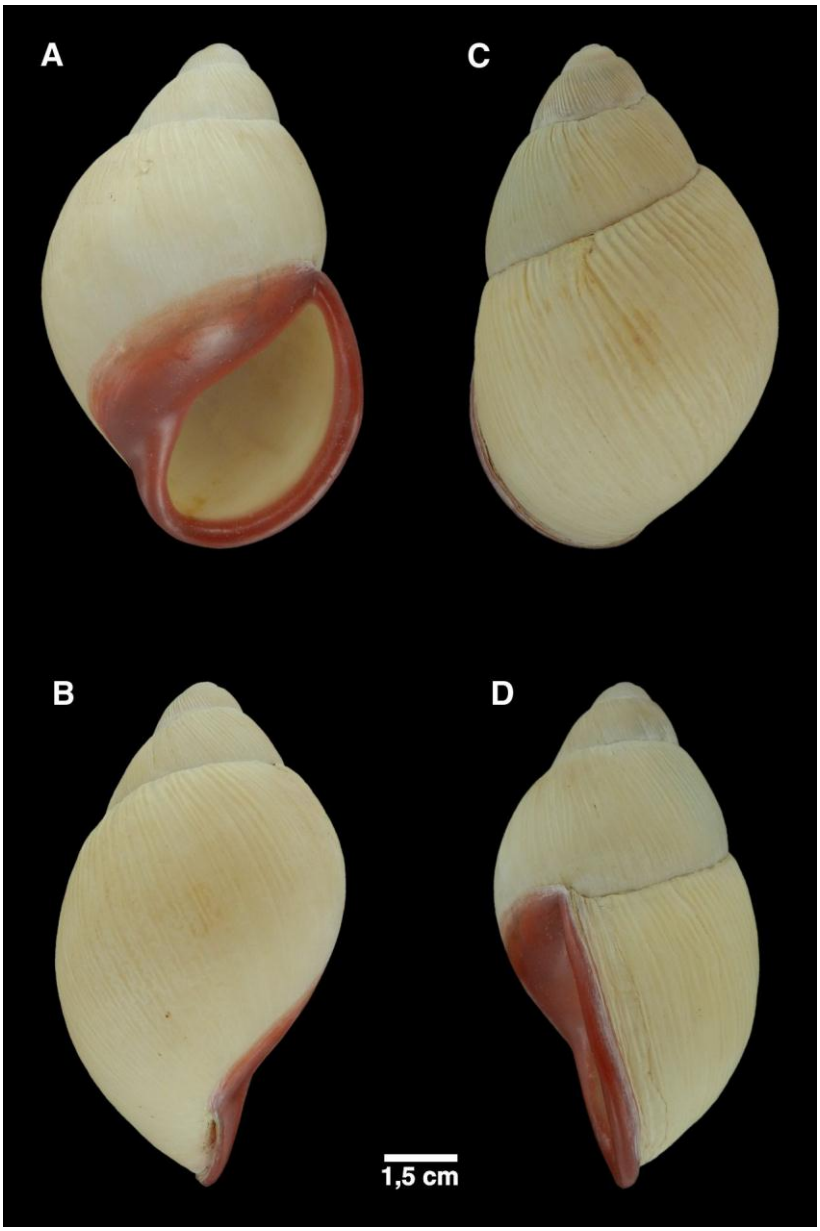

Figura 5. Concha adulta de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; (MLP-Ma 14079/2). **A**: vista ventral; **B**: vista lateral izquierda; **C**: vista dorsal; **D**: vista lateral derecha.

Protoconcha (Fig. 6): en general costillas axiales finas, numerosas, de trayectoria recta, distribuidas regularmente, continuas de sutura a sutura; intervalos $1^{1/2}$ o el doble del ancho de una costilla. Primera y segunda vueltas no aplanadas apicalmente, la primera lisa y opaca; en la primera parte de la segunda aparecen

gradualmente finas costillas axiales, haciéndose más gruesas y alcanzando su recorrido de sutura a sutura en la segunda mitad, estas se continúan de forma regular en la tercera vuelta. Sin microgranulación. Límite entre protoconcha y teleoconcha no definido. **Espira** (Fig. 5): cónica redondeada, vueltas pronunciadamente convexas, base amplia y atenuada respecto a la última vuelta; ápice redondeado, no aplanado. **Última vuelta** (Fig. 5): obesa-oval; contorno convexo. **Escultura** (Fig. 5): costillas gruesas, paralelas, irregulares; más pronunciadas en la última vuelta; sin microgranulación. **Abertura** (Fig. 5): semi-elíptica, más alta que ancha, oblicua al eje mayor. **Callo parietal** (Fig. 5): rosa púrpura intenso, espeso, liso, contorno definido; borde externo posterior alcanza la terminación de la sutura, la que en la mayoría de los especímenes la sobrepasa; borde externo anterior se continúa de forma uniforme con el peristoma; borde interno oblicuo, giboso en su porción media. **Labio** (Fig. 5): rosa brillante intenso, convexo, uniformemente ancho y espeso, la reflexión del labio se aprieta contra la última vuelta. **Orificio umbilical** (Fig. 5): moderadamente abierto y notorio.

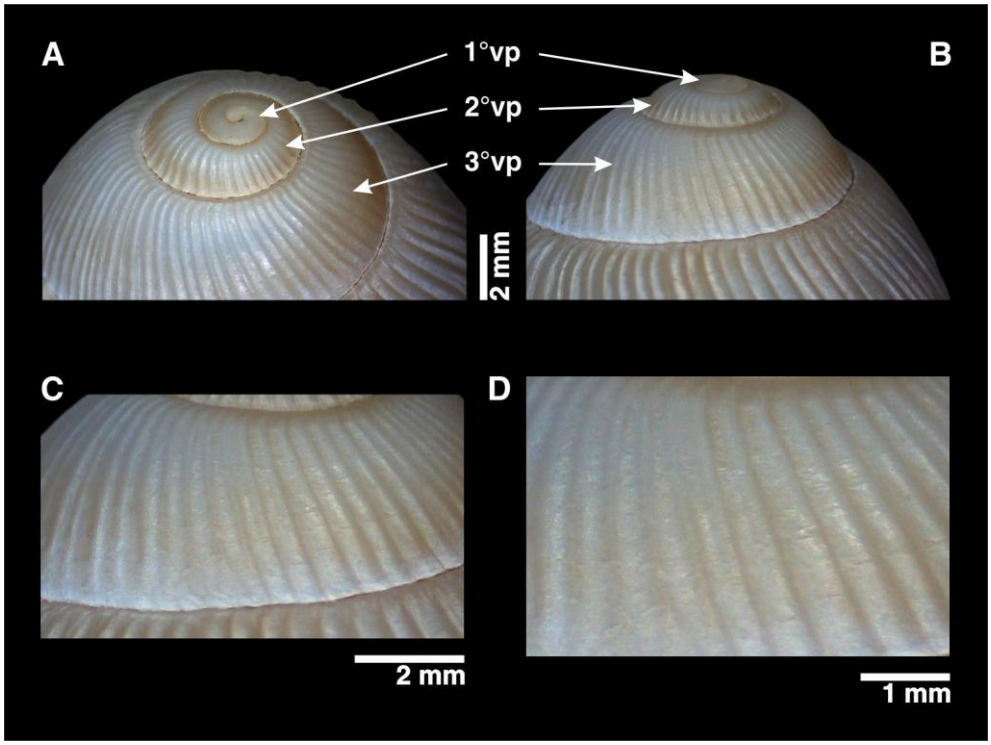

Figura 6. Protoconcha de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; (MLP-Ma 14079/2). **A**: vista lateral apical; **B**: vista lateral; **C**, **D**: vista lateral ampliada de la 3°vp.

1°vp, primera vuelta de la protoconcha; **2°vp**, segunda vuelta de la protoconcha; **3°vp**, tercera vuelta de la protoconcha.

I.3.1.2 *Megalobulimus oblongus musculus* (Bequaert, 1948)

Sinonimia

Strophocheilus (Megalobulimus) oblongus musculus Bequaert, 1948: Bequaert, 1948: 12, 20, 56, 60, 62, 82-6, 121-2, 181, (Pl. 12, Fig. 6; Pl. 20, Fig. 1; Pl. 31, Fig. 4, Holotipo); Parodiz, 1957: 132; Sawaya y Petersen, 1962: 33, 38; Figueiras, 1963: 83; Schade, 1965: 216; Fernández y Castellanos, 1973: 276; Fernández, 1973: 67.

Psiloicus musculus: Morretes, 1952: 113.

Strophocheilus oblongus musculus: Sawaya y Petersen, 1962: 31, 35, 38 (Fig. 1-4); Tompa *et al.*, 1977: 279.

Megalobulimus oblongus musculus: Klappenbach y Olazarri, 1965: 4; Quintana, 1982: 85, 154; Scarabino, 2003: 211; Agudo-Padrón, 2008: 161.

Megalobulimus musculus: Simone y Leme, 1998: 201; Campos Salgado y dos Santos Coelho, 2003: 158; Almeida y Almeida Bessa, 2001: 1121; Simone, 2006: 214 (Fig. 816); Siqueira Dornellas y Simone, 2011: 29, 62, 74; Agudo-Padrón, 2012: 24; Borda y Ramírez, 2013: 675, 680; Fontenelle *et al.*, 2014: 31, 34 (Fig. 17).

Localidad y Material Tipo

Localidad Tipo: Villarica, Paraguay (Bequaert, 1948).

Material Tipo: Holotipo, N° 62471 Museum of Comparative Zoology (MCZ), Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos.

Lotes Identificados

IFML-Moll 15858, MLP-Ma 14091, MLP-Ma 14092, MLP-Ma 14093, MLP-Ma 14094, MLP-Ma 14095, MLP-Ma 14096.

Descripción

Concha (Fig. 7): forma oval, contorno cónico-oval; ancho máximo por debajo de la mitad del largo; sutura poco profunda, inclinada en su vista dorsal; banda subsutural clara, fina (menor a 2 mm); periostraco papiráceo (no siempre presente) marrón verdoso, con franjas paralelas al eje mayor más oscuras; internamente marrón pálido. **Columela** (Fig. 7): desplazada hacia la izquierda del eje mayor de la concha; trayecto recto; contorno del borde interno liso, lineal, no giboso. **Protoconcha** (Fig. 8): en general costillas axiales finas, altas, numerosas, de trayectoria recta, distribuidas

regularmente, continuas de sutura a sutura; intervalos $1^{1/2}$ al doble del ancho de una costilla. Primera y segunda vueltas apicalmente aplanadas; la primera y el inicio de la

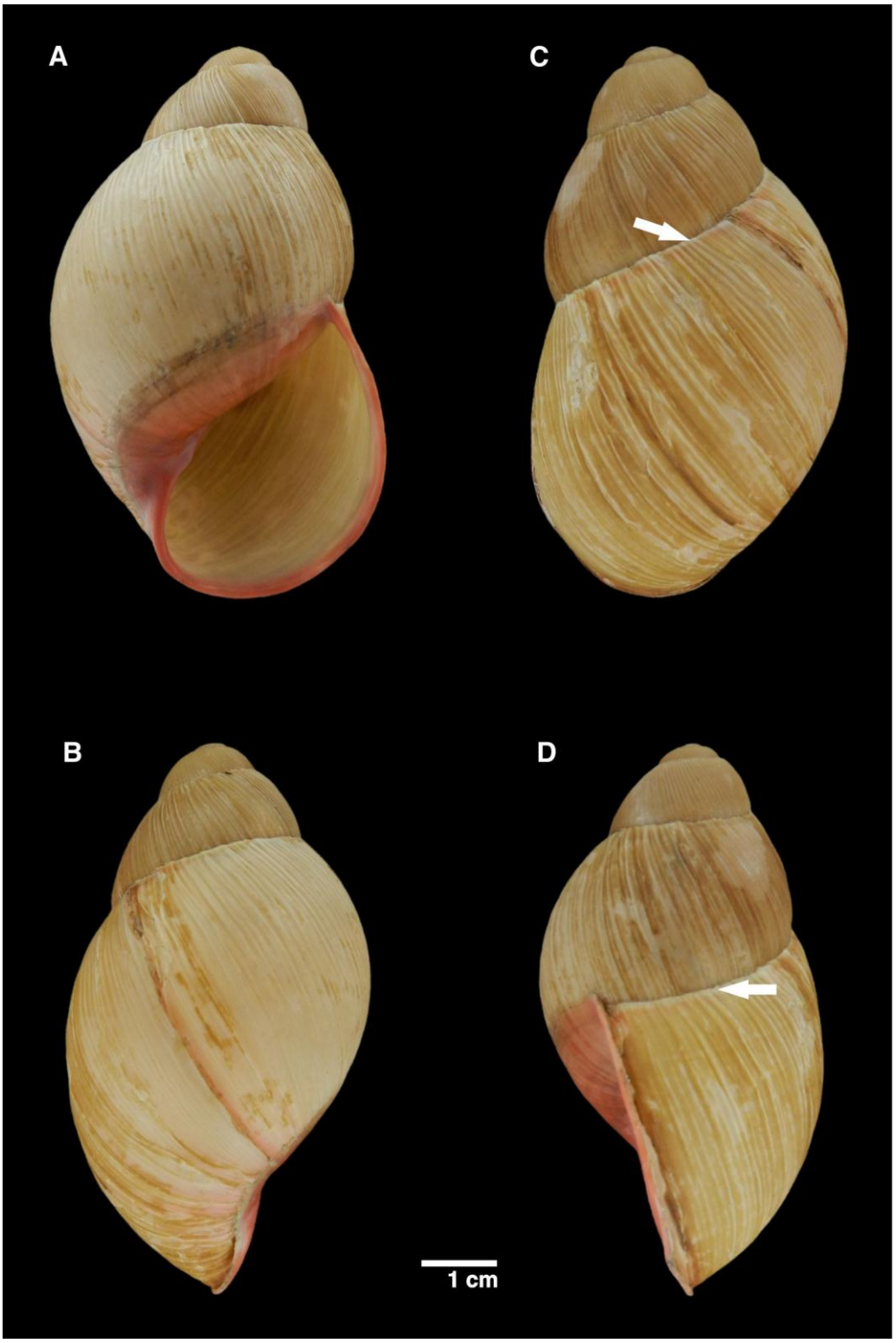

Figura 7. Concha adulta de *Megalobulimus oblongus musculus*; (MLP-Ma 14091/1). **A**: vista ventral; **B**: vista lateral izquierda; **C**: vista dorsal; **D**: vista lateral derecha. En **C** y **D** la flecha blanca indica la fina banda subsutural.

segunda lisa y opaca; surgimiento gradual de costillas finas cuyo recorrido inicia en la parte media y alcanzan solo la sutura inferior, haciéndose más gruesas y alcanzando su recorrido de sutura a sutura en la segunda mitad de la segunda vuelta; tercera vuelta con costillas marcadas, de sutura a sutura. Microgranulación presente, dispuesta en espiral, pudiendo o no interrumpirse sobre las costillas. Límite entre protoconcha y teleoconcha no definido. **Espira** (Fig. 7): cónica redondeada, vueltas convexas, base amplia y atenuada respecto a la última vuelta; ápice redondeado, aplanado. **Última vuelta** (Fig. 7): oval-alargada, contorno convexo. **Escultura** (Fig. 7): costillas finas, bajas, paralelas, irregulares; sin microgranulación. **Abertura** (Fig. 7): semi-elíptica, más alta que ancha, oblicua al eje mayor. **Callo parietal** (Fig. 7): débil, contorno parcialmente definido; borde externo posterior no alcanza la terminación de la sutura; borde externo anterior se continúa con el peristoma; borde interno oblicuo, no giboso en su porción media. **Labio** (Fig. 7): rosa, plano-convexo, el ancho del labio es muy fino, poco o no espeso. **Orificio umbilical** (Fig. 7): débilmente perceptible en algunos ejemplares, en otros totalmente obliterado.

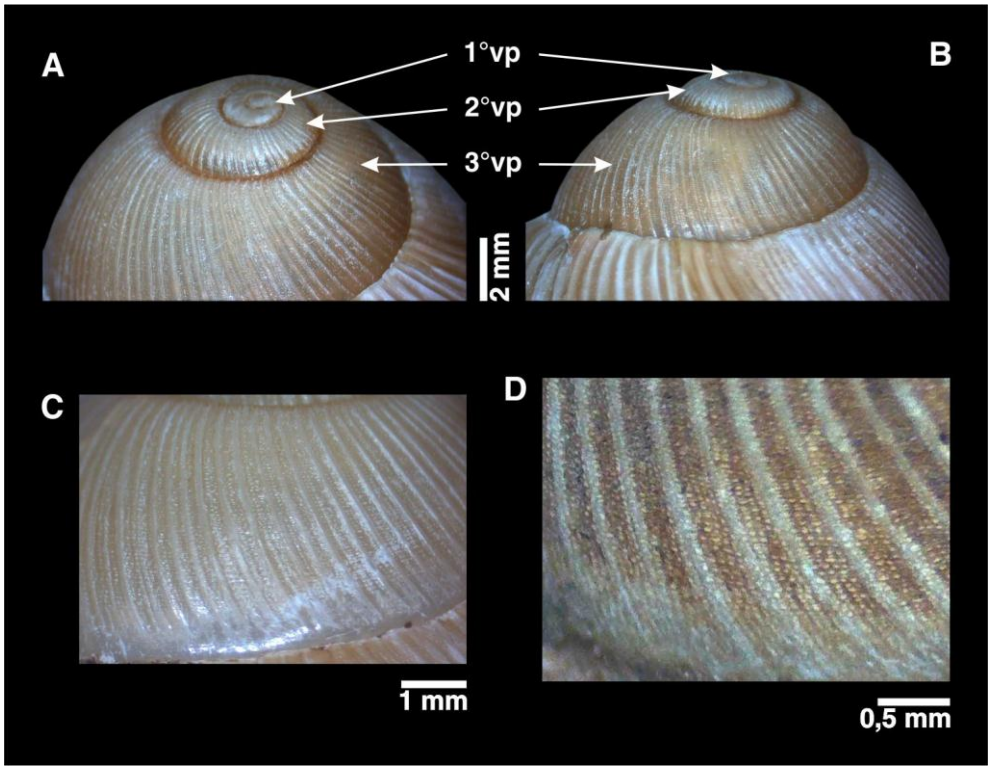

Figura 8. Protoconcha de *Megalobulimus oblongus musculus*; (**A**, **B y D**, MLP-Ma 14091/1; **C**, MLP-Ma 14096/2). **A**: vista lateral apical; **B**: vista lateral; **C**, **D**: vista lateral ampliada de la 3°vp.

1°vp, primera vuelta de la protoconcha; **2°vp**, segunda vuelta de la protoconcha; **3°vp**, tercera vuelta de la protoconcha.

I.3.1.3 *Megalobulimus sanctipauli* (Ihering y Pilsbry, 1900)

Sinonimia

Strophocheilus oblongus var. *sanctæpauli* Ihering y Pilsbry en Pilsbry, 1900: Pilsbry, 1900: 390; Pilsbry, 1901-1902: 124.

Strophocheilus (*Borus*) *sanctæpauli*: Pilsbry, 1901-1902: 123-124 (Pl. 20, Fig. 63, Holotipo); Pilsbry, 1902: v.

Strophocheilus (*Borus*) *sanctipauli*: Pilsbry, 1902: v, xciv (enmienda de *sanctæpauli* en Pilsbry, 1900); Pilsbry, 1901-1902: 292 (referencia a las figuras de Pl. 20); Bequaert, 1948: 17, 137.

Strophocheilus oblongus var. *sanctaepauli*: Bequaert, 1948: 21, 137, 209.

Strophocheilus (*Megalobulimus*) *sanctipauli*: Bequaert, 1948: 21, 57, 137-139, 167, 209, 262 (Pl. 13, Fig. 7, Holotipo); Parodiz, 1957: 132; Klappenbach y Olazarri, 1965: 5; Fernández, 1973: 68; Fernández y Castellanos, 1973: 276; Fernández y Rumi, 1984: 212, 215.

Strophocheilus sanctipauli: Morretes, 1949: 141; Fernández, 1978: 149 (Fig. 1); Cuezzo y Drahg, 1995: 197.

Megalobulimus (*Megalobulimus*) *sanctipauli*: Morretes, 1952: 113; Agudo, 2006: 10; Agudo-Padrón, 2009: 5.

Melalobulimus (*Megalobulimus*) *sanctipauli*: Morretes, 1953: 68.

Megalobulimus sanctipauli: Quintana, 1982: 85, 154, 156; Campos Salgado y dos Santos Coelho, 2003: 158; Romero, 2004: 79; Simone, 2006: 219 (Fig. 831, Holotipo), 387; Bonard *et al*., 2012: 98; Beltramino *et al*., 2012a: *partim*, (Fig. 1); Beltramino, 2013: 469; Gutiérrez Gregoric *et al.*, 2013a: 1764; Fontenelle *et al.*, 2014: 31, 33, (Fig. 14); Beltramino *et al*., 2015a: *partim*, (Fig. 1).

Strophocheilus (*Megalobumus*) *sanctipauli*: Fernández y Rumi, 1984: 211.

Megalobulimus sanctipaulis: Gutiérrez Gregoric *et al.*, 2011: 136.

Localidad y Material Tipo

Localidad Tipo: Botucatú, Estado de São Paulo, Brasil (Pilsbry, 1900, 1901-1902).

Material Tipo: Holotipo, N° 71229 Academy of Natural Sciences Philadelphia (ANSP), Philadelphia, Pennsylvania, Estados Unidos.

Lotes Identificados

MLP-Ma 14097, MLP-Ma 14098, MLP-Ma 14099, MLP-Ma 14100, MLP-Ma 14101, MLP-Ma 14102, MLP-Ma 14103, MLP-Ma 14104, MLP-Ma 14105, MLP-Ma 14106, MLP-Ma 14107, MLP-Ma 14108, MLP-Ma 14109, MLP-Ma 14110.

Descripción

Concha (Fig. 9): forma ahusada, contorno elíptico; ancho máximo aproximadamente en la mitad del largo; sutura profunda, inclinada en su vista dorsal; banda subsutural ancha (mayor a 3 mm), discontinua, amarilla tenue; periostraco papiráceo (no siempre presente) marrón claro a verdoso dependiendo del espécimen; internamente ámbar pálido. **Columela** (Fig. 9): desplazada hacia la izquierda del eje mayor de la concha; trayecto oblicuo; contorno del borde interno liso, lineal, no giboso. **Protoconcha** (Fig. 10): en general costillas axiales gruesas, altas, numerosas, de trayectoria no recta, distribuidas regularmente, continuas de sutura a sutura; intervalos del mismo ancho de una costilla. Primera y segunda vueltas no aplanadas apicalmente; la primera y la primera parte de la segunda lisa; luego las costillas surgen gradualmente en el tercio inferior de la vuelta, hasta alcanzar un recorrido de sutura a sutura desde la mitad de la segunda vuelta en adelante. Con microgranulación, no dispuesta en espiral, mayormente presente en los intervalos entre las costillas. Límite entre protoconcha y teleoconcha no definido. **Espira** (Fig. 9): cónica ahusada, vueltas aplanado convexas, base continua respecto a la última vuelta; ápice puntiagudo. **Última vuelta** (Fig. 9): elíptica, contorno aplanado convexo. **Escultura** (Fig. 9): costillas conspicuas, finas, bajas, paralelas, regulares, convirtiéndose en irregulares y difusas sobre la porción terminal de la última vuelta. Con granulación, dispersa, no en patrón espiral, ausente por completo en la porción terminal de la última vuelta. **Abertura** (Fig. 9): elíptica, más alta que ancha, oblicua al eje mayor. **Callo parietal** (Fig. 9): rosado tenue u opaco, no espeso; cuando es espeso, solo en la mitad inferior; presenta en relieve las costillas y/o granulación de la última vuelta, contorno definido; borde externo posterior alcanza, pero no supera la terminación de la sutura; borde externo anterior se continúa con el peristoma; borde interno oblicuo, giboso. **Labio** (Fig. 9): rosado tenue, plano-convexo, ancho y espeso uniformemente. **Orificio umbilical** (Fig. 9): sin vestigios, totalmente obliterado.

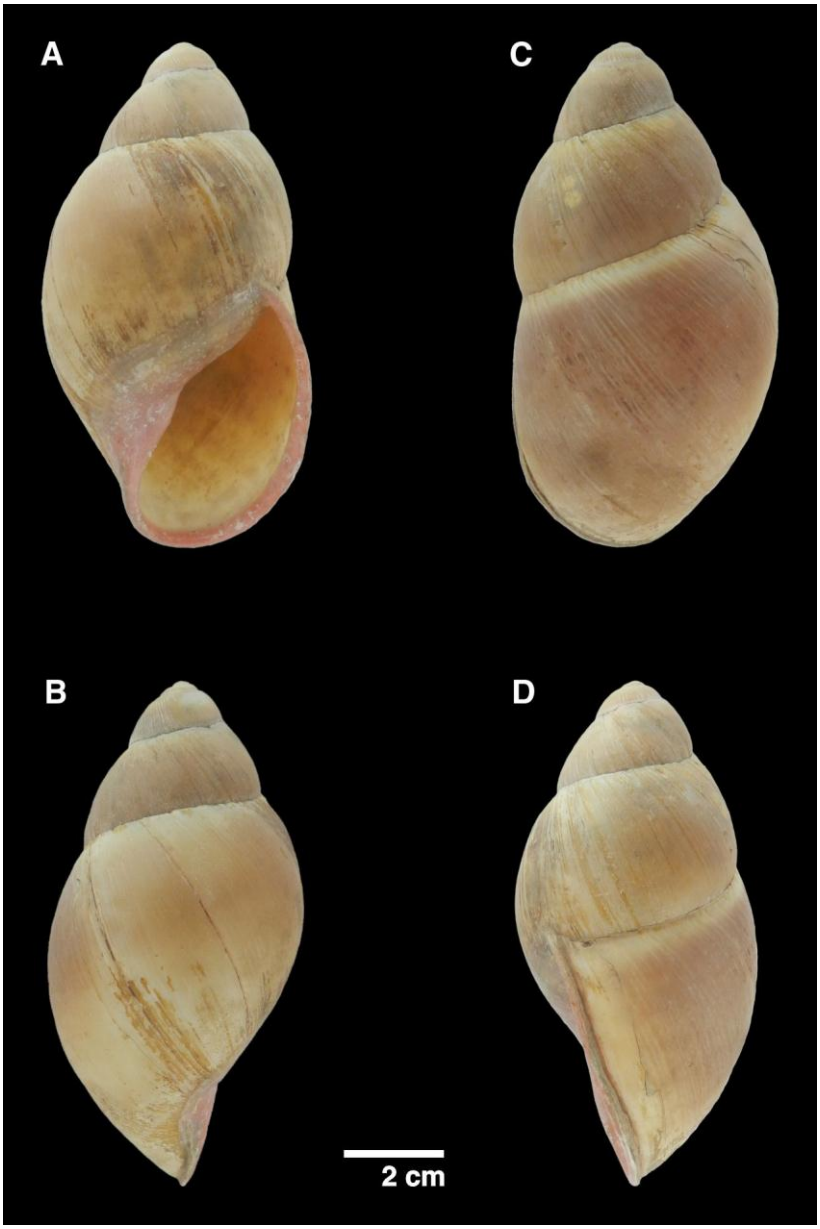

Figura 9. Concha adulta de *Megalobulimus sanctipauli*; (MLP-Ma 14097/3). **A**: vista ventral; **B**: vista lateral izquierda; **C**: vista dorsal; **D**: vista lateral derecha.

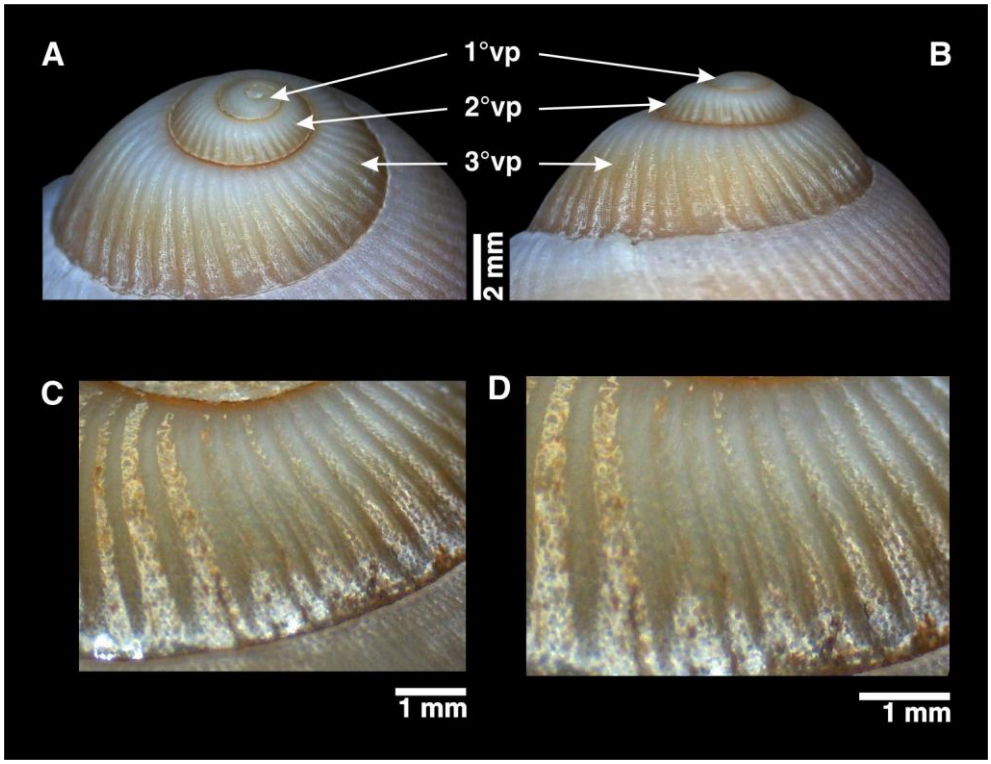

Figura 10. Protoconcha de *Megalobulimus sanctipauli*; (**A** y **B**, MLP-Ma 14110/1; **C** y **D**, MLP-Ma 14097/3). **A**: vista lateral apical; **B**: vista lateral; **C**, **D**: vista lateral ampliada de la 3°vp.

1°vp, primera vuelta de la protoconcha; **2°vp**, segunda vuelta de la protoconcha; **3°vp**, tercera vuelta de la protoconcha.

I.3.1.4 *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948)

<u>*Sinonimia*</u>

Strophocheilus (*Megalobulimus*) *granulosus abbreviatus* Bequaert, 1948: Bequaert, 1948: 58, 164 (Pl. 27, Fig. 4, Holotipo).

Megalobulimus (*Phaiopharus*) *abreviatus*: Morretes, 1952: 112.

Megalobulimus (*Phaiopharus*) *abbreviatus*: Morretes, 1953: 65.

Megalobulimus abbreviatus: Leme, 1973: 316 (Fig. 29, 32-35); Thomé *et al.*, 1994: 6 (Figs. 1-14); Simone y Leme, 1998: 202; Bruschi-Figueiró y Veitenheimer-Mendes, 2002: 33; Campos Salgado y dos Santos Coelho, 2003: 157; Achaval *et al.*, 2005: *partim*; Horn *et al.*, 2005: *partim*; Simone, 2006: 206 (Fig. 779); Nóblega *et al.*, 2006: *partim*; Kalil-Gaspar *et al.*, 2007: *partim*; Rigon *et al.*, 2009, 2010: *partim*; Moraes *et al.*, 2010: 341-343, 347, 348; Agudo-Padrón, 2011c: 30 (Fig. 5A); Agudo-Padrón y Lenhard, 2011: 167 (Figs. 13-15);

Siqueira Dornellas y Simone, 2011: 2, 62, 73; Borda y Ramírez, 2013: 681; Martinez-Pereira *et al.*, 2013: *partim*; Fontenelle *et al.*, 2014: 31, 34 (Fig. 19).

Localidad y Material Tipo

Localidad Tipo: Brasil (Bequaert, 1948).

Material Tipo: Holotipo, N° 49537 Museum of Comparative Zoology (MCZ), Cambridge, Massachusetts, Estados Unidos.

Lotes Identificados

MLP-Ma 14111, MLP-Ma 14112, MLP-Ma 14113, MLP-Ma 14114, MLP-Ma 14115, MLP-Ma 14116, MLP-Ma 14117, MLP-Ma 14118, MLP-Ma 14119, MLP-Ma 14120, MLP-Ma 14121, MLP-Ma 14125, MLP-Ma 14126, MLP-Ma 14127, MLP-Ma 14128, MLP-Ma 14129, MLP-Ma 14130, MLP-Ma 14131, MLP-Ma 14132, MLP-Ma 14133.

Descripción

Concha (Fig. 11): forma oval, contorno convexo; ancho máximo aproximadamente en la mitad del largo; sutura profunda, inclinada en su vista dorsal; banda subsutural ancha (mayor a 3 mm), pudiendo estar discontinua, amarilla tenue; periostraco papiráceo (no siempre presente) castaño, con finas franjas paralelas al eje mayor más oscuras; internamente marrón nacarado. **Columela** (Fig. 11): desplazada hacia la izquierda del eje mayor de la concha; trayecto recto; contorno del borde interno giboso. **Protoconcha** (Fig. 12): costillas axiales sin un patrón general definido. Primera y mitad de la segunda vuelta lisa; mitad restante de la segunda vuelta y 1/3 a 1/2 de la tercera vuelta costillas robustas, altas, distribuidas regularmente, intervalos equivalentes al ancho de las costillas, su recorrido va de sutura a sutura. A partir de la mitad o 2/3 finales de la tercera vuelta las costillas se hacen más anchas, bajas, con contorno poco definido, distribuidas irregularmente, sin patrón aparente en el ancho de los intervalos, las costillas que van de sutura a sutura presentan el tercio final desvanecido, entre estas costillas hay presencia de costillas accesorias que recorren parcialmente el ancho de la vuelta no alcanzando la sutura inferior, en una minoría de los casos estas se hacen dicotómicas en la mitad inferior de la vuelta haciéndose difusas hacia la sutura inferior. Microgranulación conspicua, en un patrón espiral inconfundible. Límite entre protoconcha y teleoconcha no definido. **Espira** (Fig. 11): cónica redondeada, vueltas

convexas, base atenuada respecto a la última vuelta; ápice redondeado, aplanado. **Última vuelta** (Fig. 11): oval-alargada, contorno plano convexo. **Escultura** (Fig. 11): costillas finas, bajas, regulares, intervalos menores a su ancho; microgranulación en patrón espiral, en la espira se continúa sin zona de transición desde la protoconcha, en la última vuelta se hace más difuso y poco denso en su porción terminal, pero en algunos ejemplares alcanza el borde externo del labio.

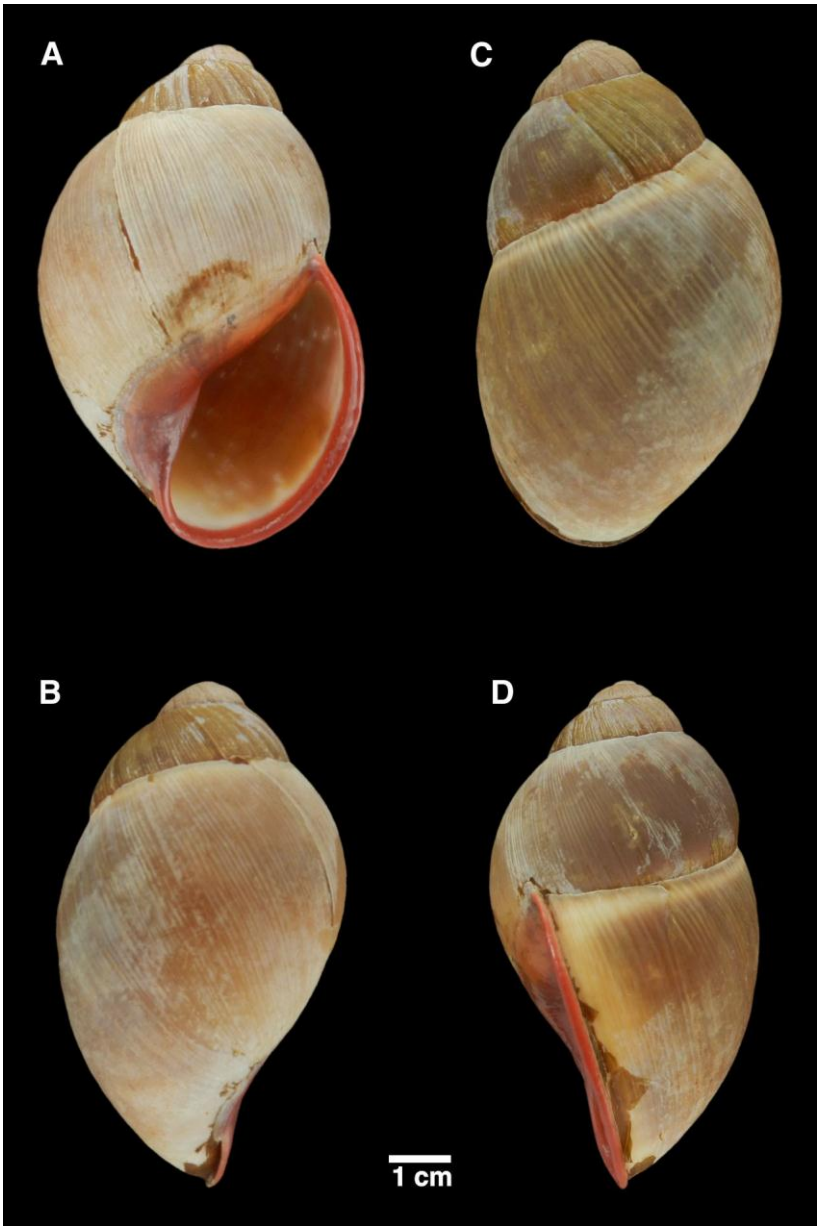

Figura 11. Concha adulta de *Megalobulimus abbreviatus*; (MLP-Ma 14129/2). **A**: vista ventral; **B**: vista lateral izquierda; **C**: vista dorsal; **D**: vista lateral derecha.

Abertura (Fig. 11): elíptica, más alta que ancha, oblicua al eje mayor. **Callo parietal** (Fig. 11): rosado pálido a intenso; no espeso, presenta en relieve las costillas y/o granulación de la última vuelta, contorno definido; borde externo posterior alcanza la terminación de la sutura; borde externo anterior se continúa con el peristoma; borde interno oblicuo, no giboso. **Labio** (Fig. 11): rosado pálido a intenso, plano-convexo, ancho y espeso. **Orificio umbilical** (Fig. 11): parcial o totalmente obliterado.

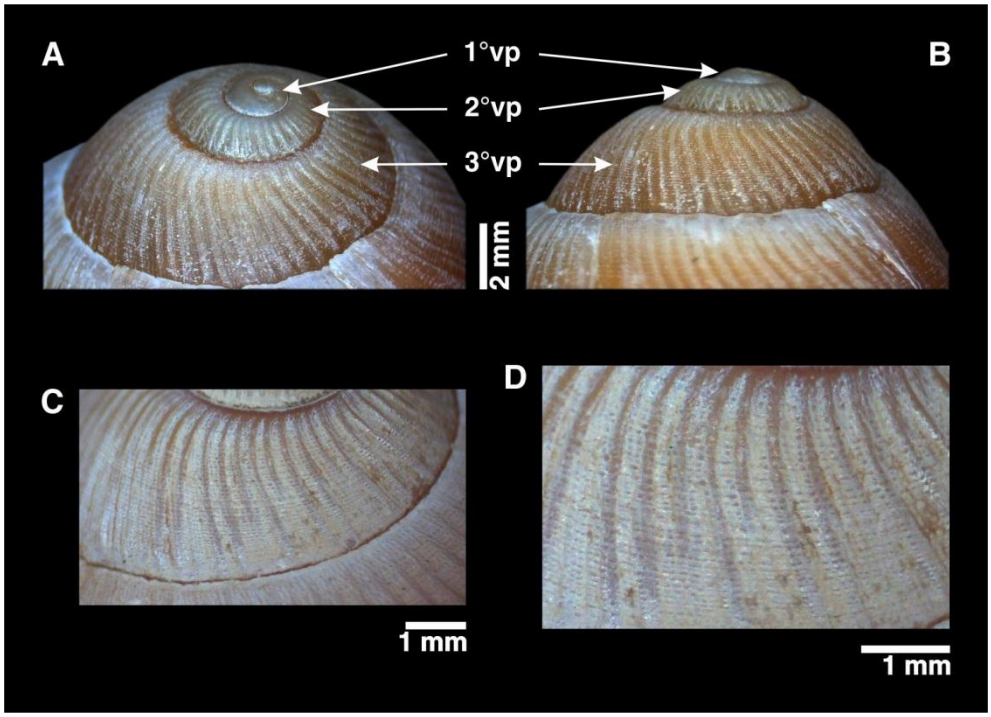

Figura 12. Protoconcha de *Megalobulimus abbreviatus*; (**A** y **B**, MLP-Ma 14129/2; **C** y **D**, MLP-Ma 14128/1). **A**: vista lateral apical; **B**: vista lateral; **C**, **D**: vista lateral ampliada de la 3°vp.

1°vp, primera vuelta de la protoconcha; **2°vp**, segunda vuelta de la protoconcha; **3°vp**, tercera vuelta de la protoconcha.

I.3.2 Morfometría Clásica

Se seleccionaron un total de 70 conchas para las cuatro entidades identificadas: 15 correspondieron a *M. o. lorentzianus*, 15 a *M. o. musculus*, 16 a *M. sanctipuli* y 24 a *M. abbreviatus*. La trazabilidad de cada concha se indica en la Tabla III (el ID otorgado a cada individuo será respetado a lo largo de la presentación de los resultados de MC, como así también en MG).

Tabla III. Conchas seleccionadas para el análisis de morfometría clásica y geométrica.

ID	Lote / Individuo
	M. abbreviatus
1	MLP-Ma 14125/1
2	MLP-Ma 14126/1
3	MLP-Ma 14129/1
4	MLP-Ma 14129/2
5	MLP-Ma 14131/1
6	MLP-Ma 14131/2
7	MLP-Ma 14132/1
8	MLP-Ma 14133/1
9	MLP-Ma 14133/2
10	MLP-Ma 14111/1
11	MLP-Ma 14112/1
12	MLP-Ma 14113/1
13	MLP-Ma 14114/1
14	MLP-Ma 14114/2
15	MLP-Ma 14115/1
16	MLP-Ma 14116/1
17	MLP-Ma 14117/1
18	MLP-Ma 14118/1
19	MLP-Ma 14119/1
20	MLP-Ma 14119/2
21	MLP-Ma 14120/1
22	MLP-Ma 14130/1
23	MLP-Ma 14121/1
24	MLP-Ma 14121/2
	M. o lorentzianus
25	MLP-Ma 14079/1
26	MLP-Ma 14079/2
27	MLP-Ma 14080/1
28	MLP-Ma 14081/1
29	MLP-Ma 14082/1
30	MLP-Ma 14083/1
31	MLP-Ma 14084/1
32	IFML-Moll 15857/1
33	MLP-Ma 14085/1
34	MLP-Ma 14086/1
35	MLP-Ma 14087/1
36	MLP-Ma 14088/1
37	MLP-Ma 14089/1
38	MLP-Ma 14089/2
39	MLP-Ma 14090/1
	M. o. musculus
40	IFML-Moll 15858/1
41	IFML-Moll 15858/2
42	MLP-Ma 14091/1
43	MLP-Ma 14092/1
44	MLP-Ma 14093/1
45	MLP-Ma 14094/1
46	MLP-Ma 14094/2
47	MLP-Ma 14094/3
48	MLP-Ma 14094/4
49	MLP-Ma 14095/1
50	MLP-Ma 14095/2
51	MLP-Ma 14095/3
52	MLP-Ma 14096/1
53	MLP-Ma 14096/2
54	MLP-Ma 14096/3
	M. sanctipauli
55	MLP-Ma 14097/1
56	MLP-Ma 14097/2
57	MLP-Ma 14098/1
58	MLP-Ma 14099/1
59	MLP-Ma 14100/1
60	MLP-Ma 14102/1
61	MLP-Ma 14104/1
62	MLP-Ma 14104/2
63	MLP-Ma 14105/1
64	MLP-Ma 14106/1
65	MLP-Ma 14107/1
66	MLP-Ma 14107/2
67	MLP-Ma 14109/1
68	MLP-Ma 14109/2
69	MLP-Ma 14110/1
70	MLP-Ma 14110/2

MLP-Ma, Colección Malacológica del Museo de La Plata; **IFML-Moll**, Colección Malacológica del Instituto Fundación Miguel Lillo - Tucumán.

Los estadísticos básicos (media y desviación estándar, mínimo y máximo) para las ocho medidas propuestas a partir de las 70 conchas se presentan en la Tabla IV. Del ACP efectuado, los dos primeros componentes explicaron el 93,07% de la varianza total. El primer componente (CP1) acumuló un 80,54% de la varianza total y la variable que explicó mejor dicha varianza fue la longitud de la espira (Tabla V). El segundo componente (CP2) acumuló 12,53% de la variabilidad total. La variable que mejor explicó la variación de este componente también fue la longitud de la espira seguida del ancho de la abertura (Tabla V). La dispersión de los individuos de las cuatro entidades en función del CP1 y CP2 se muestra en la Fig. 13.

Tabla IV. Resumen de las ocho variables obtenidas a partir de las conchas de las cuatro entidades. La información es organizada de la siguiente manera: Media ± Desvío estándar (Mínimo – Máximo). Medidas en mm.

VARIABLE	*M. abbreviatus* (N = 24)	*M. o. lorentzianus* (N = 15)	*M. o. musculus* (N = 15)	*M. sanctipauli* (N = 16)
LT	75,00 ± 4,82 (66,78 – 84,16)	85,72 ± 5,64 (75,26 – 93,30)	68,82 ± 4,96 (62,57 – 78,31)	88,48 ± 7,39 (76,64 – 102,21)
LE	12,49 ± 1,72 (10,00 – 16,97)	14,75 ± 1,22 (12,62 – 17,16)	11,89 ± 1,19 (10,13 – 13,77)	17,38 ± 2,22 (12,72 – 22,03)
AE	24,88 ± 1,48 (22,68 – 29,37)	27,62 ± 2,08 (23,80 – 31,50)	22,20 ± 1,66 (19,18 – 25,50)	28,75 ± 2,44 (23,19 – 33,37)
AF	44,04 ± 2,74 (39,50 – 49,21)	51,72 ± 3,56 (44,86 – 55,45)	39,88 ± 3,20 (35,93 – 47,14)	47,89 ± 4,25 (41,00 – 56,82)
AL	38,09 ± 2,25 (34,68 – 43,20)	44,34 ± 2,72 (39,52 – 47,57)	35,17 ± 2,19 (32,27 – 39,81)	41,83 ± 3,51 (35,95 – 48,06)
AA	19,54 ± 1,40 (17,34 – 22,34)	24,59 ± 1,50 (21,40 – 26,92)	20,77 ± 1,75 (18,15 – 24,38)	22,08 ± 2,24 (19,06 – 26,08)
LA	37,46 ± 3,09 (32,63 – 42,60)	41,59 ± 2,58 (36,87 – 45,00)	34,52 ± 2,74 (30,58 – 39,30)	42,93 ± 4,04 (35,34 – 50,07)
NV	5,76 ± 0,26 (4,75 – 6,19)	5,85 ± 0,12 (5,70 – 6,08)	5,60 ± 0,12 (5,38 – 5,73)	6,15 ± 0,21 (5,82 – 6,50)

Abreviaturas: **LT**, longitud total; **LE**, longitud de la espira; **AE**, ancho de la espira; **AF**, ancho en vista frontal; **AL**, ancho en vista lateral; **AA**, ancho de la abertura; **LA**, longitud de la abertura; **NV**, número de vueltas. **N** = individuos medidos.

Tabla V. Aporte de cada variable a los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2) del ACP (Morfometría Clásica). Los valores resaltados en negrita indican las variables que explican mejor la varianza.

	COMPONENTES PRINCIPALES	
VARIABLE	**CP1**	**CP2**
LT	0,3833	0,02494
LE	**0,5351**	**-0,72**
AE	0,37	-0,04686
AF	0,3444	0,3397
AL	0,317	0,2903
AA	0,2968	**0,4238**
LA	0,3356	0,236
NV	0,09988	-0,2094

Abreviaturas: **LT**, longitud total; **LE**, longitud de la espira; **AE**, ancho de la espira; **AF**, ancho en vista frontal; **AL**, ancho en vista lateral; **AA**, ancho de la abertura; **LA**, longitud de la abertura; **NV**, número de vueltas.

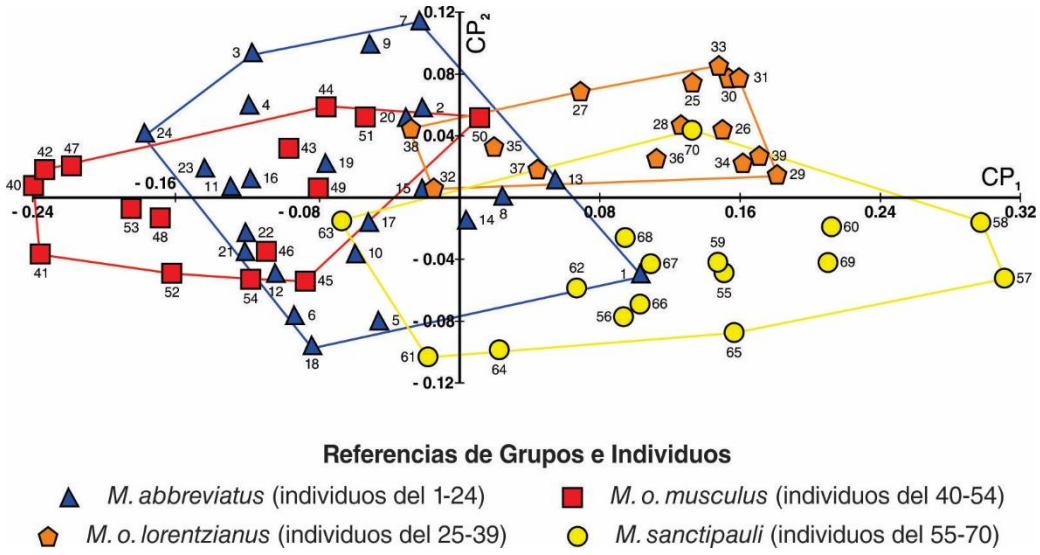

Figura 13. Morfometría clásica: representación de los dos componentes principales del ACP. El ID de cada individuo corresponde al indicado en la Tabla III.

El MANOVA realizado para evaluar la significación estadística de las separación de las cuatro entidades fue altamente significativo (λ de Wilks = 0,01869; $F_{(24,172)}$ = 21,06; P<0,0001). El CVA a partir de las ocho variables maximizó la separación entre las entidades. Las dos primeras variables canónicas obtenidas explicaron un acumulado del 87,57% de la varianza. El CV1 explicó el 68,48% de la

varianza y la variable que más aportó a este eje fue el ancho de la abertura (AA) (Tabla VI). El CV2 explicó el 19,09% y las variables que más aportaron fueron el ancho en vista lateral (AL) y la longitud total (LT) (Tabla VI). La dispersión de los individuos de las cuatros entidades en el morfoespacio canónico se presenta en la Fig. 14.

Tabla VI. Aporte de cada variable a los dos primeros ejes canónicos (CV1 y CV2) (Morfometría Clásica). Los valores resaltados en negrita indican las variables que explican mejor la varianza.

	Componentes Canónicos	
Variable	**CV1**	**CV2**
LT	22,88	**-26,188**
LE	-16,952	-7,396
AE	41,78	22,523
AF	-4,2714	5,9188
AL	0,96686	**-29,644**
AA	**-67,209**	-15,991
LA	32,807	21,003
NV	29,598	-5,6638

Abreviaturas: **LT**, longitud total; **LE**, longitud de la espira; **AE**, ancho de la espira; **AF**, ancho en vista frontal; **AL**, ancho en vista lateral; **AA**, ancho de la abertura; **LA**, longitud de la abertura; **NV**, número de vueltas.

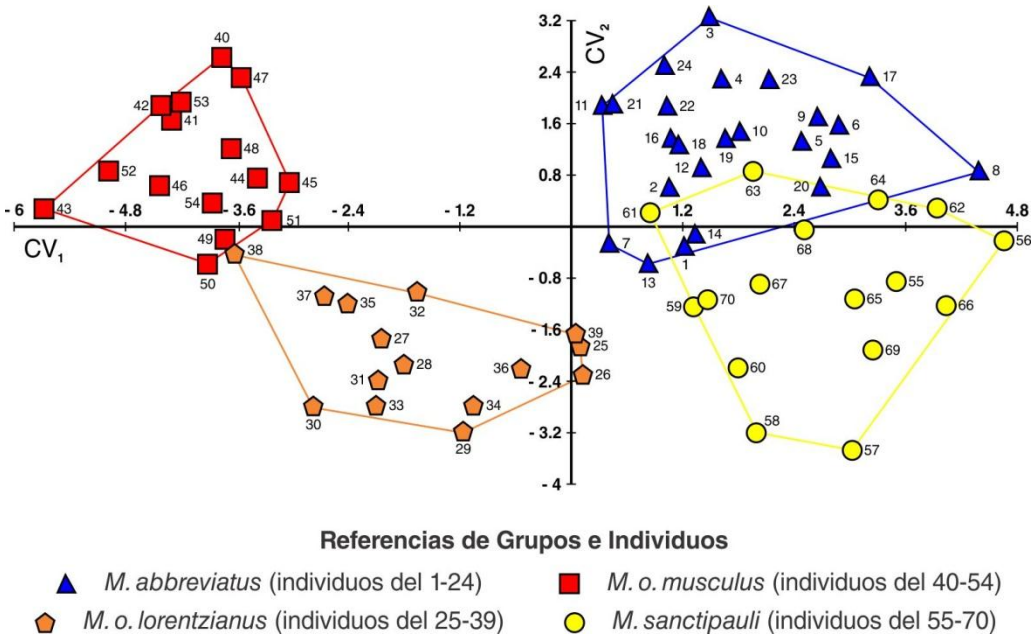

Figura 14. Morfometría clásica: representación de las dos variables canónicas principales del CVA. El eje horizontal corresponde al CV1 (68,48%) y el vertical al CV2 (19,09%). El ID de cada individuo corresponde al indicado en la Tabla III.

Del CVA, el 90,94% de los individuos fueron correctamente asignados a una entidad, de acuerdo al criterio de agrupamiento dado *a priori*. La asignación de los individuos a sus respectivas entidades se presenta en la Tabla VII. Según los valores obtenidos, solo *M. o. musculus* alcanzó el porcentaje ideal de asignación correcta de sus individuos (100%). *Megalobulimus o. lorentzianus* presentó un 86,67% de asignación correcta, pudiendo ser identificado erróneamente como *M. o. musculus*. *Megalobulimus sanctipauli* obtuvo un 93,75% de asignación correcta pudiendo ser identificado erróneamente como *M. abbreviatus*. Esta última entidad presentó un 83,33% de asignación correcta pudiendo ser mal clasificada como *M. o. lorentzianus* o *M. sanctipauli*.

Tabla VII. Asignación de individuos a las cuatro entidades identificadas a partir del CVA (Morfometría Clásica). Se muestra el número y porcentaje de individuos correctamente clasificados para cada entidad. Las columnas (2 a la 4) representan los grupos predichos y las filas (2 a la 4) los grupos determinados *a priori*.

	M. abbreviatus	*M. o. lorentzianus*	*M. o. musculus*	*M. sanctipauli*	TOTAL	%
M. abbreviatus	**20**	1	0	3	24	**83,33**
M. o. lorentzianus	0	**13**	2	0	15	**86,67**
M. o. musculus	0	0	**15**	0	15	**100**
M. sanctipauli	1	0	0	**15**	16	**93,75**
TOTAL					**70**	90,94

I.3.3 MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA

El abordaje de morfometría geométrica fue realizado a partir del mismo subconjunto de conchas presentado en la Tabla III.

El RWA mostró que los primeros cinco RWs explicaron independientemente el 5% o más de la variación local de las conchas (*i.e.* RW1= 37,02%; RW2= 21,49%; RW3= 11,98%; RW4= 8,69%; RW5= 5,91%), siendo el acumulado de estos del orden del 85%. La dispersión de los individuos de las cuatro entidades en función de las dos variables de mayor porcentaje acumulado (RW1 y RW2) se muestra en la Fig. 15.

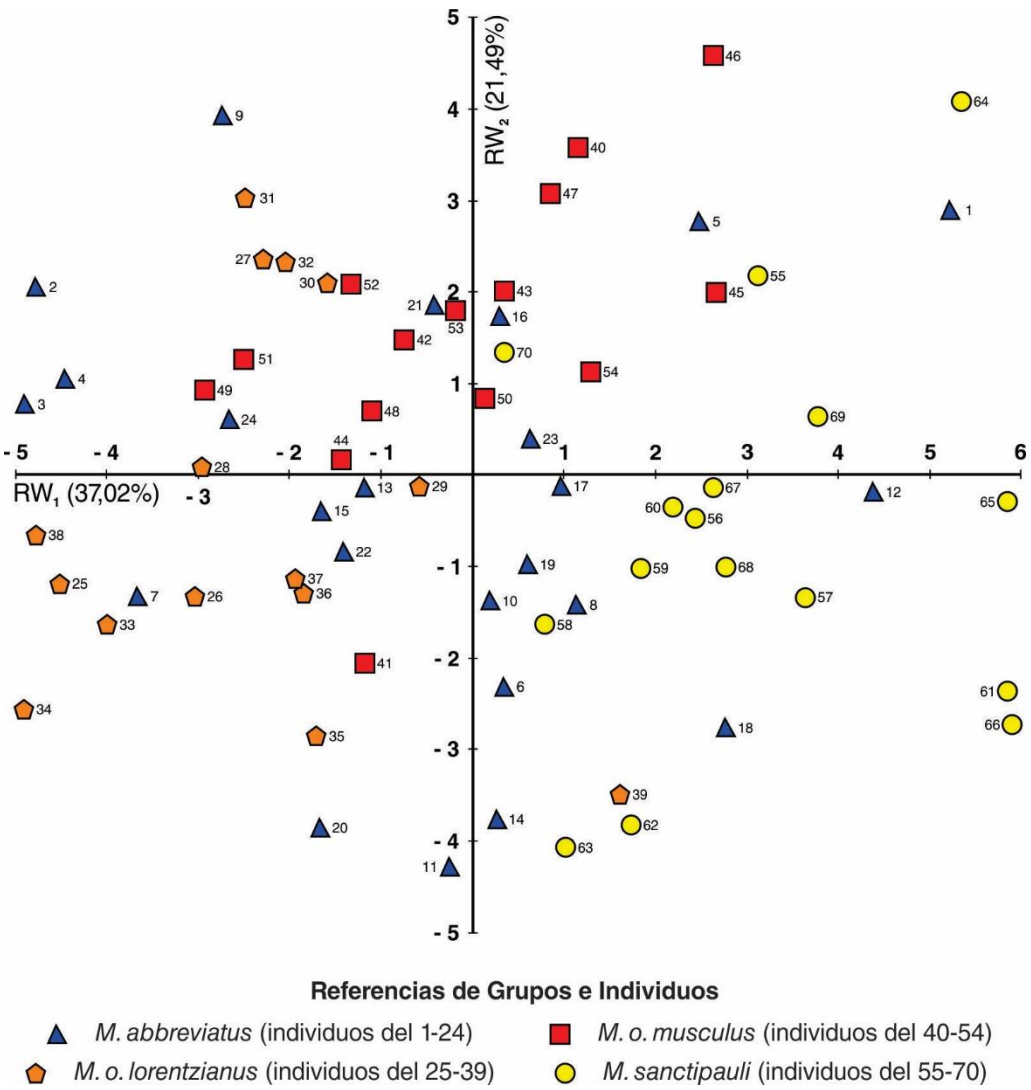

Figura 15. Morfometría geométrica: representación de los dos componentes locales principales de la forma (RW1 y RW2). El ID de cada individuo corresponde al indicado en la Tabla III.

Las retículas de deformación facilitaron la visualización del significado de las formas extremas de los ejes RW1 y RW2 (Fig. 16). Cuando el RW1 fue analizado desde los puntajes más bajos (negativos) a los puntajes más altos (positivos), se observaron diferencias en: i- última vuelta, con retracción antero-posterior y lateral de la concha e involucrando a los LM9 y LM12; ii- espira, con expansión en sentido antero-posterior de la concha e involucrando los LM1-5; y iii- abertura, con un acercamiento de los LM8 y LM10-12 (Fig. 16A, B). Cuando el RW2 fue analizado desde los puntajes más bajos a los más altos se observaron diferencias en: iv- última vuelta, con expansión perpendicular al eje vertical de la concha e involucrando los LM6 y LM9, con un desplazamiento del primero en sentido antero-posterior de la concha; v- abertura, con

expansión en ambos sentidos al eje vertical de la concha e involucrando los LM8 y LM10-12; y vi- inserción del labio externo en la última vuelta, con retracción en sentido antero-posterior de la concha e involucrando los LM7-8 (Fig. 16C, D).

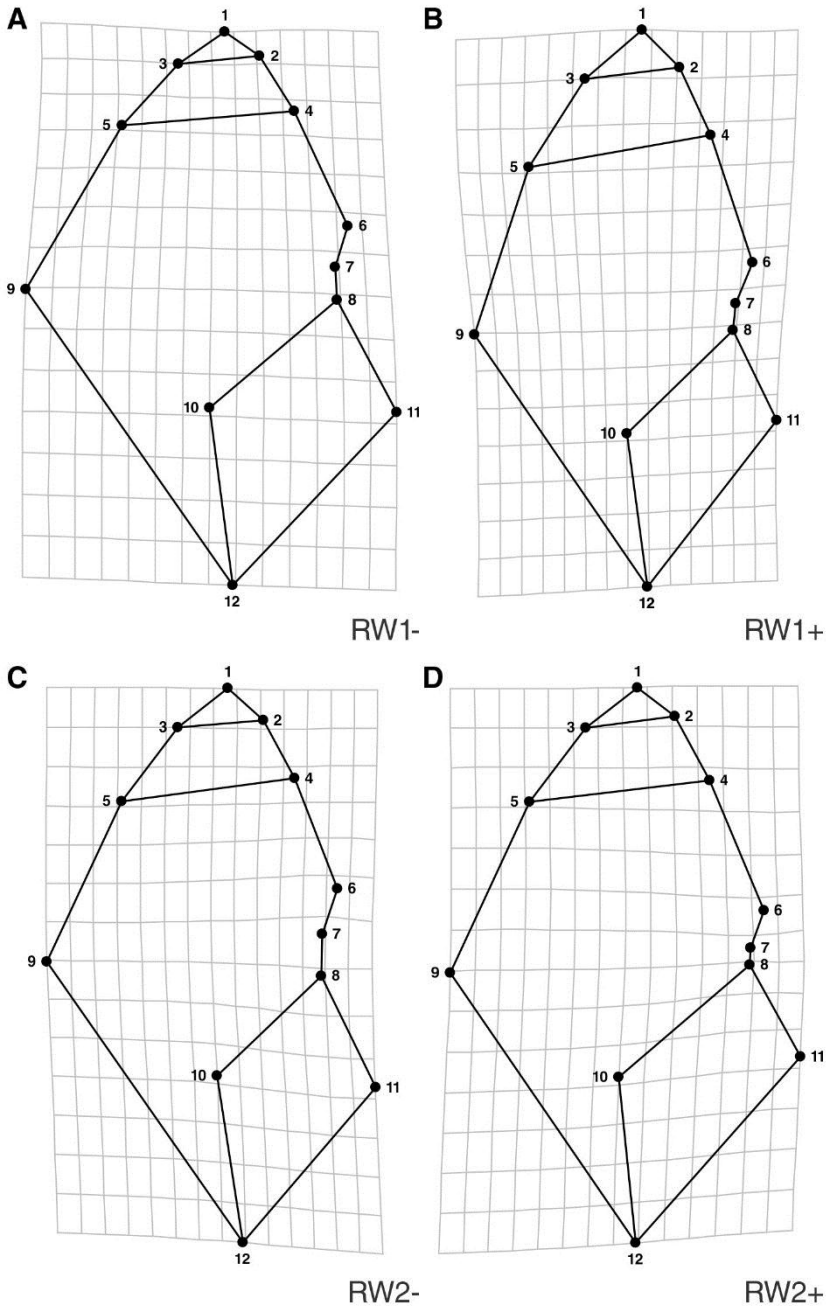

Figura 16. Retículas de deformación de componentes locales de forma. A, **B**: desviaciones más negativas (A) y positivas (B) del primer componente local de forma (RW1) respecto a la configuración de referencia; **C**, **D**: desviaciones más negativas (C) y positivas (D) del segundo componente local de forma (RW2) respecto a la configuración de referencia.

De acuerdo con la representación gráfica de los RW1 y RW2 (Fig. 15) los individuos de *M. o. lorentzianus* y *M. sanctipauli* se distribuyeron a lo largo de todo el RW2, sin embargo las dos entidades se diferenciaron sobre el RW1, donde *M. o. lorentzianus* ocupó la porción más negativa del eje, mientras que *M. sanctipauli* la porción más positiva. Por su parte, *M. o. musculus* se distribuyó a lo largo del RW1 con la mayoría de sus individuos hacia los valores más positivos del RW2, superponiéndose con *M. o. lorentzianus* y *M. sanctipauli*. Por último, *M. abbreviatus* se distribuyó a través de todo el morfoespacio de los RW1 y RW2, y solapó forma con las otras tres entidades. Así, al contemplar la superposición de formas en el RWA a partir de los RW1 y RW2, no fue posible discriminar las entidades mediante este análisis.

Por otra parte, el MANOVA realizado sobre los cinco primeros RWs (RW1-5) para evaluar la significación de la forma media de la concha de las cuatro entidades fue altamente significativo (λ de Wilks = 0,1451; $F_{(15,172)}$ = 11,58; P<0,0001). Las diferencias de forma entre las cuatro entidades fueron maximizadas mediante el CVA, donde las dos primeras variables canónicas (CV1 y CV2) explicaron el 94,76% de la variación (Fig. 17).

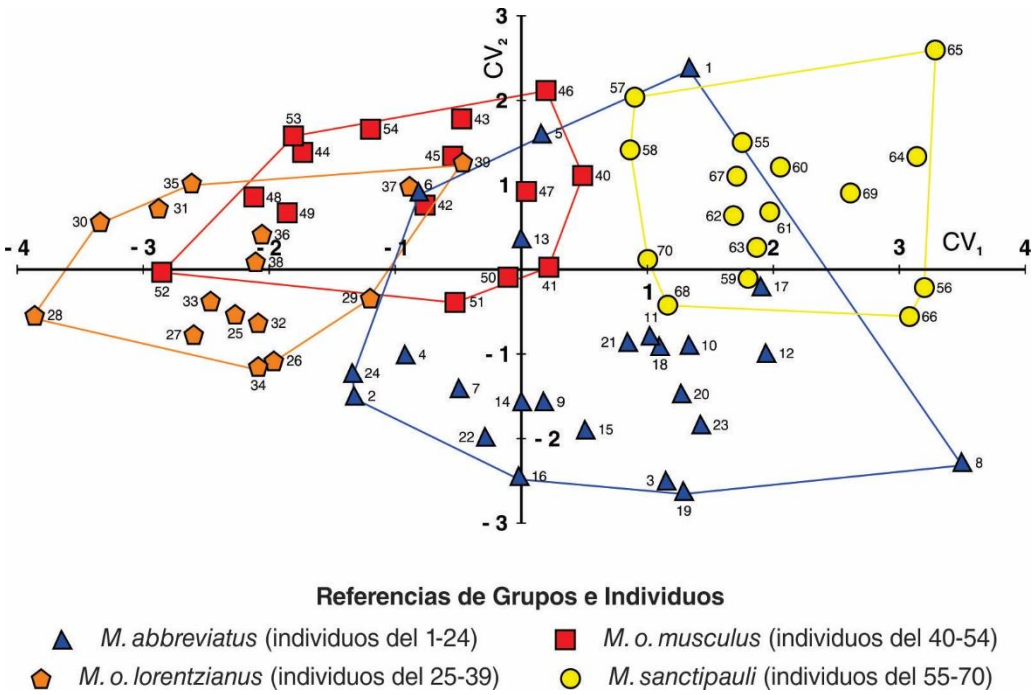

Figura 17. Morfometría geométrica: representación de las dos variables canónicas principales del CVA. El eje horizontal corresponde al CV1 (71,98%) y el vertical al CV2 (22.78%). El ID de cada individuo corresponde al indicado en la Tabla III.

Las retículas de deformación de los extremos de los CV1 y CV2 se muestran en la Fig. 18. Cuando el CV1 fue analizado desde los puntajes más bajos (negativos) a los puntajes más altos (positivos) se observaron diferencias en: i- última vuelta, con retracción perpendicular al eje vertical de la concha e involucrando al LM9; ii- espira, con una leve expansión en sentido antero-posterior de la concha e involucrando los LM1-5; iii- perfil izquierdo de la última vuelta de la espira, con un distanciamiento de los LM3 y LM5; y iv- abertura, con retracción perpendicular al eje vertical de la concha e involucrando los LM10-LM11 (Fig. 18A, B). Cuando el CV2 fue analizado desde los puntajes más bajos a los más altos también se evidenciaron diferencias en: v- última vuelta, con una retracción antero-posterior y lateral, involucrando los LM9 y LM12; vi- espira, con una pronunciada expansión en sentido antero-posterior de la concha, involucrando los LM1-5; y vii- inserción del labio externo en la última vuelta, involucrando una pronunciada retracción en sentido antero-posterior de la concha, con participación de los LM7-8 (Fig. 18C, D).

En el análisis realizado, se maximizaron las diferencias de forma entre las cuatro entidades y se evidenció que existen diferencias estadísticamente significativas en la forma media de la concha de cada entidad. Sin embargo, fue posible notar superposición parcial entre los morfoespacios de las entidades como consecuencia del solapamiento de formas entre los individuos de distintas entidades. Si bien el CVA permitió discriminar exitosamente *M. o. lorentzianus* de *M. sanctipauli*, también se observó que *M. o. musculus* comparte parcialmente morfoespacio con *M. o. lorentzianus* aunque no con *M. sanctipauli*. En el caso de *M. abbreviatus* se evidenció que su variación de forma solapa con las otras tres entidades.

Al evaluar los porcentajes de asignación correcta, se evidenció que el 77,92% de los individuos fueron correctamente asignados, de acuerdo al criterio de agrupamiento dado *a priori* (Tabla VIII). Se observó que *M. o. lorentzianus* puede ser identificado erróneamente como *M. o. musculus*, mientras que especímenes de esta última pueden ser identificados erróneamente como *M. o. lorentzianus* o *M. abbreviatus*. *Megalobulimus sanctipauli* puede confundirse con *M. abbreviatus*, mientras que esta última puede ser erróneamente identificada como cualquiera de las otras entidades.

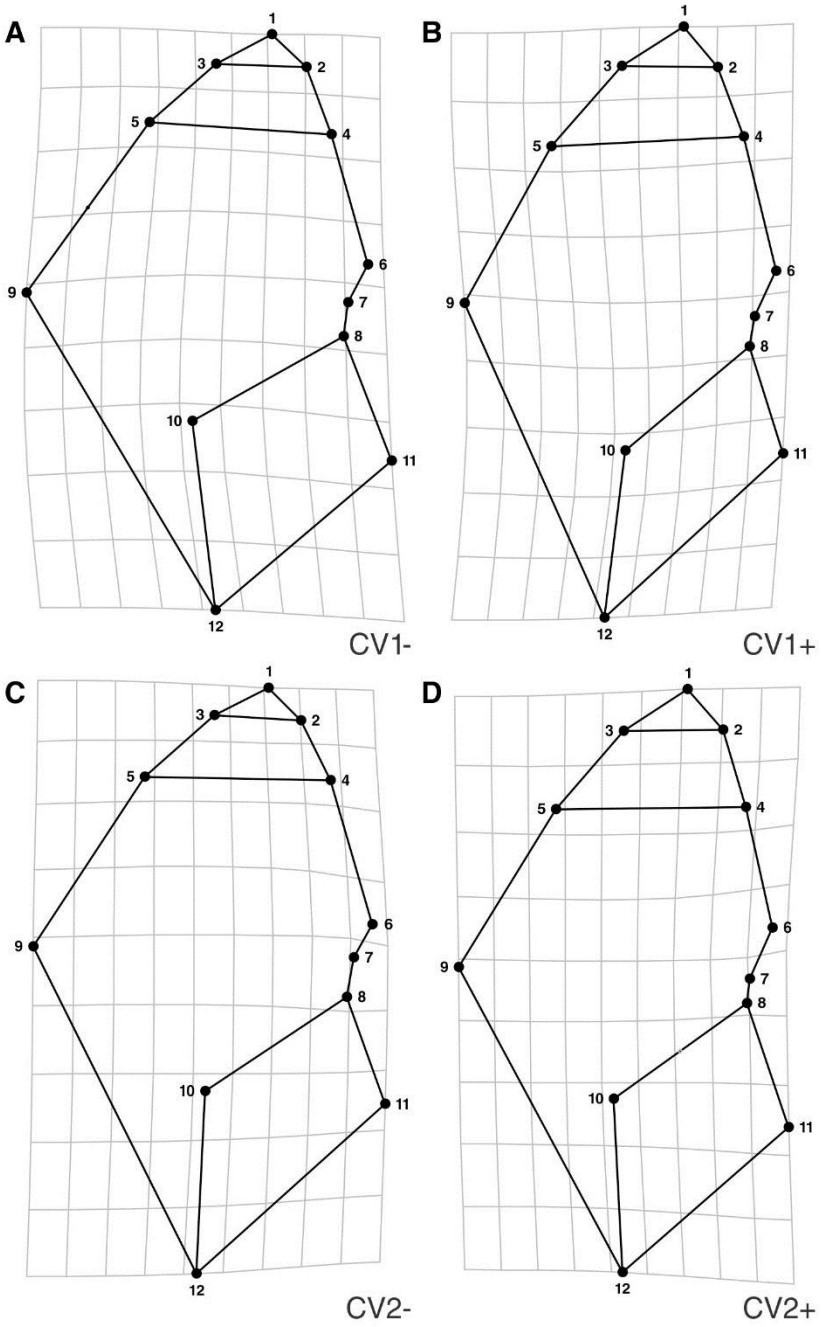

Figura 18. Retículas de deformación a lo largo de los dos ejes canónicos. A, **B**: desviaciones más negativas (A) y positivas (B) del CV1 respecto a la configuración de referencia; **C**, **D**: desviaciones más negativas (C) y positivas (D) del CV2 respecto a la configuración de referencia.

Tabla VIII. Asignación de individuos a las cuatro entidades identificadas a partir del CVA (Morfometría Geométrica). Se muestra el número y porcentaje de individuos correctamente clasificados para cada entidad. Las columnas (2 a la 4) representan los grupos predichos y las filas (2 a la 4) los grupos determinados *a priori*.

	M. abbreviatus	*M. o. lorentzianus*	*M. o. musculus*	*M. sanctipauli*	TOTAL	%
M. abbreviatus	**17**	3	2	2	24	**70.83**
M. o. lorentzianus	0	**13**	2	0	15	**86.67**
M. o. musculus	3	2	**10**	0	15	**66.67**
M. sanctipauli	2	0	0	**14**	16	**87.50**
TOTAL	-	-	-	-	-	77.92

I.3.4 Mapeo de la Distribución

En la Tabla I el material analizado fue introducido en función a su lugar de origen, *i.e.* provincia/localidad, al que le fuera asociado el repositorio. No obstante en este punto, los lotes ya cuentan con una identidad taxonómica basada en criterios conquiliológicos. Sobre esta base, los 57 lotes fueron organizados por entidades a los cuales se les asociaron coordenadas de geolocalización y un error esperado para dicho posicionamiento (Tabla IX). El mapeo de los lotes se presenta en la Fig. 19. En la misma, se remarcó mediante línea punteada roja, el área correspondiente a la provincia de Misiones. Debido a la gran concentración de registros, esta área se representó a mayor escala en la Fig. 20.

El mapeo de los lotes mostró que *M. o. lorentzianus* se distribuye a través de las provincias de Jujuy, Salta, Formosa, Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires (Fig. 19), mientras que *M. o. musculus* presentó una distribución solapante con *M. o lorentzianus* en el noroeste del país, registrándose en las provincias de Jujuy, Salta y Tucumán (Fig. 19). Ningún lote de esta última entidad presentó distribución en Corrientes y/o Misiones (Fig. 19, 20). Los lotes mapeados para la provincia de Corrientes correspondieron a *M. abbreviatus* (Fig. 19, 20), entidad que también se concentró en el sur de la provincia de Misiones, puntualmente en los departamentos de Apóstoles, Leandro N. Alem, Candelaria, Capital y San Ignacio (Fig. 20). En estos últimos tres distritos de la provincia de Misiones también fue registrado *M. sanctipauli*, el cual además presentó lotes en los departamentos de Cainguás, Guaraní, San Pedro, Gral. M. Belgrano e Iguazú (Fig. 20).

Tabla IX. Georreferenciación de los lotes analizados.

ID	Lote	Georreferencia	
		Coordenadas	Error
	M. o. lorentzianus		
1	IFML-Moll 15857	22°18'01"S - 64°41'32"O	3 km
2	MLP-Ma 14079	30°25'27"S - 64°20'57"O	5 km
3	MLP-Ma 14080	30°43'27"S - 62°00'27"O	1 km
4	MLP-Ma 14081	30°43'15"S - 61°58'52"O	1 km
5	MLP-Ma 14082	30°42'24"S - 62°01'23"O	1 km
6	MLP-Ma 14083	30°13'23"S - 61°52'35"O	2 km
7	MLP-Ma 14084	30°42'24"S - 62°01'23"O	1 km
8	MLP-Ma 14085	34°52'06"S - 61°31'45"O	3 km
9	MLP-Ma 14086	35°27'26"S - 60°52'56"O	4 km
10	MLP-Ma 14087	24°53'26"S - 59°18'11"O	3 km
11	MLP-Ma 14088	32°12'02,40"S - 64°15'17,36"O	1 km
12	MLP-Ma 14089	24°43'14"S - 65°30'49"O	1 km
13	MLP-Ma 14090	23°49'11"S - 64°11'50"O	3 km
	M. o. musculus		
14	IFML-Moll 15858	23°45'31"S - 64°51'01,47"O	1 km
15	MLP-Ma 14091	26°49'52"S - 65°13'18"O	1 km
16	MLP-Ma 14092	24°06'34"S - 64°24'10"O	5 km
17	MLP-Ma 14093	24°47'16,21"S - 65°23'45,23"O	1 km
18	MLP-Ma 14094	24°12'33"S - 64°24'18"O	10 km
19	MLP-Ma 14095	23°07'06,87"S - 64°18'30,74"O	1 km
20	MLP-Ma 14096	23°06'40,42"S - 64°13'45,83"O	1 km
	M. sanctipauli		
21	MLP-Ma 14097	25°35'48,83"S - 54°35'29,60"O	1 km
22	MLP-Ma 14098	26°46'12"S - 53°54'49"O	1 km
23	MLP-Ma 14099	27°09'09"S - 53°53'58"O	2 km
24	MLP-Ma 14100	27°07'04"S - 55°00'53"O	9 km
25	MLP-Ma 14101	25°35'46,83"S - 54°35'31,51"O	1 km
26	MLP-Ma 14102	25°40'59"S - 54°27'31"O	1 km
27	MLP-Ma 14103	27°03'48"S - 54°49'38"O	1 km
28	MLP-Ma 14104	27°23'48"S - 55°38'02"O	6 km

MLP-Ma, Colección Malacológica del Museo de La Plata; **IFML-Moll**, Colección Malacológica del Instituto Fundación Miguel Lillo - Tucumán. **km**, kilómetros.

Tabla IX. Continuación.

ID	Lote	Georreferencia	
		Coordenadas	Error
	M. sanctipauli		
29	MLP-Ma 14105	27°33'31,04"S - 55°42'32,93"O	1 km
30	MLP-Ma 14106	27°23'09"S - 55°57'38"O	2 km
31	MLP-Ma 14107	27°14'53"S - 55°32'47"O	4 km
32	MLP-Ma 14108	25°48'31"S - 54°0'51"O	1 km
33	MLP-Ma 14109	25°51'34"S - 54°10'06,2"O	1 km
34	MLP-Ma 14110	26°25'55"S - 53°50'33"O	1 km
	M. abbreviatus		
35	MLP-Ma 14111	27°33'31,04"S - 55°42'32,93"O	1 km
36	MLP-Ma 14112	27°34'5,34"S - 55°41'44,98"O	1 km
37	MLP-Ma 14113	27°23'14"S - 55°35'38"O	1 km
38	MLP-Ma 14114	27°35'44,52"S - 55°19'40,77"O	1 km
39	MLP-Ma 14115	27°44'35,09"S - 55°33'56,84"O	1 km
40	MLP-Ma 14116	28°05'25"S - 55°41'27"O	1 km
41	MLP-Ma 14117	27°38'11,46"S - 55°43'33,66"O	1 km
42	MLP-Ma 14118	27°36'30,43"S - 55°42'17,48"O	1 km
43	MLP-Ma 14119	27°24'23,21"S - 55°33'36,67"O	1 km
44	MLP-Ma 14120	27°25'19"S - 56°15'53"O	2 km
45	MLP-Ma 14121	29°48'16,61"S - 58°04'44,48"O	1 km
46	MLP-Ma 14125	27°39'50,11"S - 55°26'25,63"O	1 km
47	MLP-Ma 14126	27°39'11,07"S - 55°26'0,71"O	1 km
48	MLP-Ma 14127	27°22'25"S - 55°57'32"O	1 km
49	MLP-Ma 14128	27°22'25"S - 55°55'17"O	1 km
50	MLP-Ma 14129	27°25'33"S - 55°53'01"O	2 km
51	MLP-Ma 14130	27°21'37"S - 55°53'20"O	1 km
52	MLP-Ma 14131	27°22'26"S - 55°57'37"O	1 km
53	MLP-Ma 14132	27°39'55,34"S - 55°27'23,96"O	1 km
54	MLP-Ma 14133	27°16'11,20"S - 55°29'35,05"O	1 km

MLP-Ma, Colección Malacológica del Museo de La Plata; **IFML-Moll**, Colección Malacológica del Instituto Fundación Miguel Lillo - Tucumán. **km**, kilómetros.

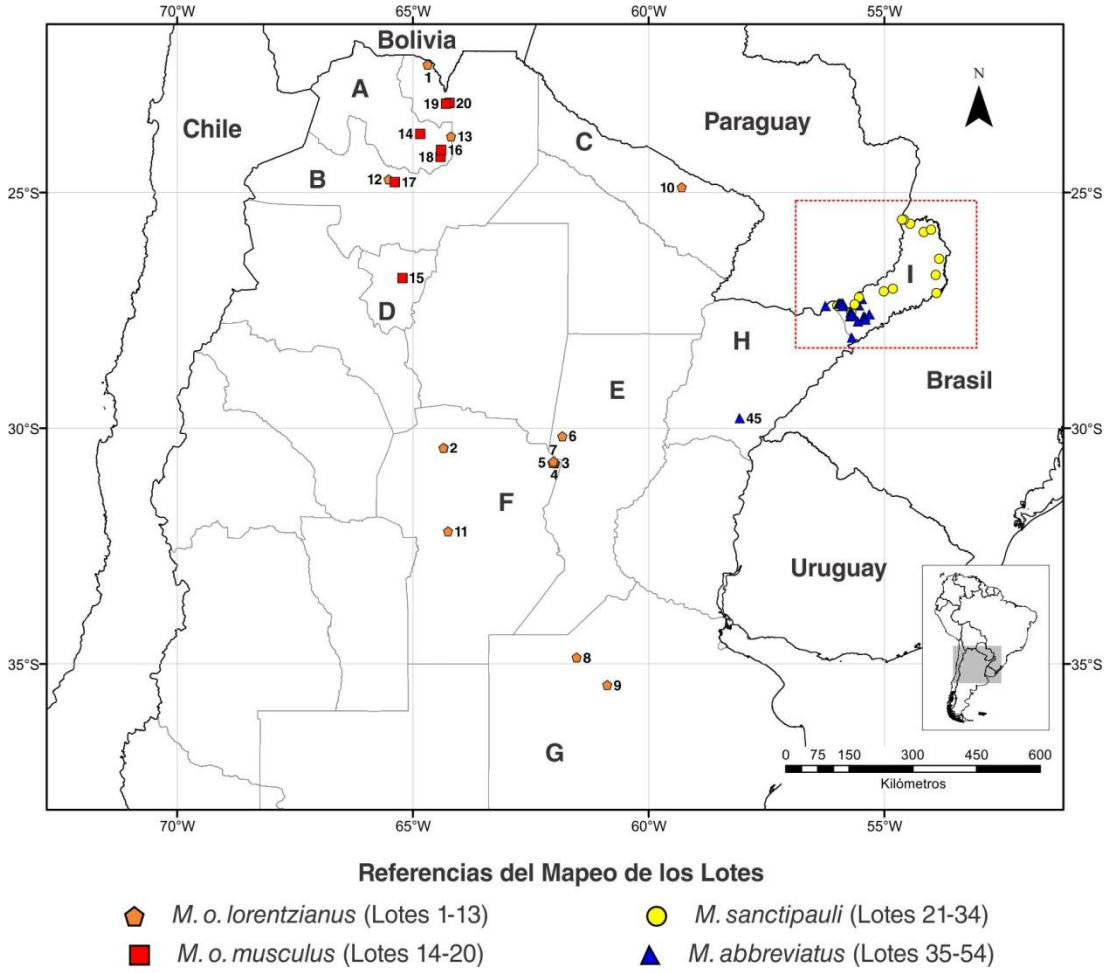

Figura 19. Distribución de entidades de *Megalobulimus* identificadas en la Argentina. El ID de cada Lote corresponde al indicado en la Tabla IX.

Provincias: **A**, Jujuy; **B**, Salta; **C**, Formosa; **D**, Tucumán; **E**, Santa Fe; **F**, Córdoba; **G**, Buenos Aires; **H**, Corrientes; **I**, Misiones.

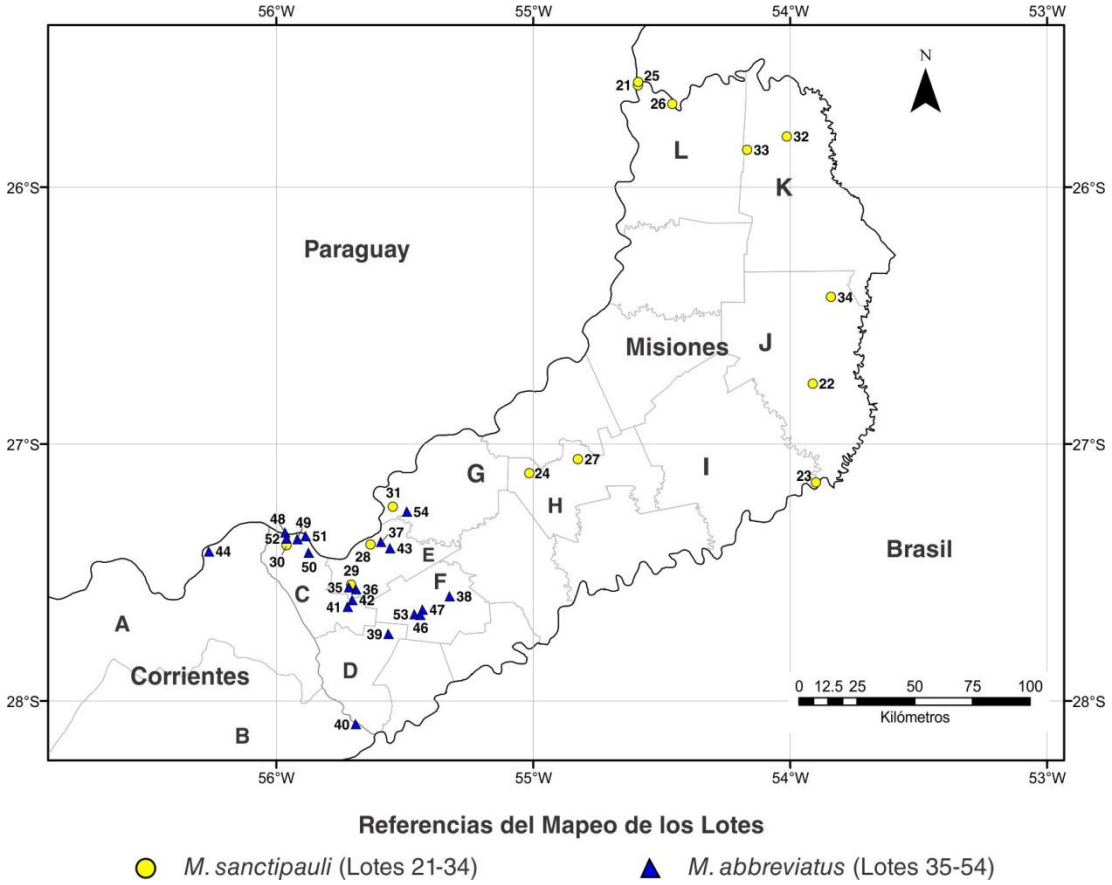

Figura 20. Distribución de las entidades de *Megalobulimus* identificadas para la provincia de Misiones. El ID de cada Lote corresponde al indicado en la Tabla IX.

Departamentos de la provincia de Corrientes: **A**, Ituzaingó; **B**, Santo Tomé. Departamentos de la provincia de Misiones: **C**, Capital; **D**, Apóstoles; **E**, Candelaria; **F**, Lenadro N. Alem; **G**, San Ignacio; **H**, Cainguás; **I**, Guaraní; **J**, San Pedro; **K**, Gral. M. Belgrano; **L**, Iguazú.

I.4 DISCUSIÓN

Los caracteres cualitativos de la concha propuestos por Bequaert (1948) permitieron delimitar en el material analizado cuatro entidades del género *Megalobulimus*. De estas, tres correspondieron a entidades cuya distribución para la Argentina era esperada, *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus* y *M. sanctipauli* (Bequaert, 1948; Parodiz, 1957; Fernández, 1973). Sin embargo, parte del material no condijo con las especies y subespecies mencionadas para el territorio nacional, el cual fue identificado como *M. abbreviatus*, especie informada hasta la fecha solo para el sur de Brasil (Bequaert, 1948; Simone, 2006; Fontenelle *et al.*, 2014).

Megalobulimus o. lorentzianus y *M. o. musculus* presentaron una protoconcha con costillas distribuidas muy regularmente, numerosas, finas, casi rectas, que van de sutura a sutura, separadas por intervalos de casi el doble del ancho de una costilla. Esta descripción concuerda con la dada para *M. oblongus* típico, estando entonces en lineamiento con el criterio de Bequaert (1948) para tratarlas como subespecies de la misma. Sin embargo, con base en los caracteres de la protoconcha, *M. o. lorentzianus* puede diferenciarse de *M. o. oblongus* y *M. o. musculus* por no presentar microgranulación (Bequaert, 1948). Si bien especímenes de *M. o. oblongus* no pudieron ser identificados dentro del material analizado, las dos subespecies aquí presentadas cuentan con caracteres adicionales que permiten discriminarlas de la forma típica. A pesar de presentar una concha cónica-oval, *M. o. oblongus* posee una espira alta y de ápice puntiagudo (Doering, 1876; Cockerell, 1926; Hylton Scott, 1939; Bequaert, 1948; Deisler y Stange, 1982; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014), mientras que en *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* la espira es baja, ancha y de ápice redondeado. Además, *M. o. musculus* presenta una banda subsutural clara muy angosta a diferencia de la ancha banda subsutural casi siempre presente en *M. o. oblongus*, la cual está constantemente ausente en *M. o. lorentzianus*. Adicionalmente, esta última entidad presenta un callo espeso y de margen bien definido, que la diferencia de *M. o. musculus* y *M. o. oblongus* (Doering, 1876; Cockerell, 1926; Hylton Scott, 1939; Bequaert, 1948; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). Otra de las principales diferencias entre estas tres entidades se encuentra en el labio externo, el cual es muy ancho y espeso en *M. o. lorentzianus*, mientras que en *M. o. musculus* el ancho y espesor es mínimo; en *M. o. oblongus* se presenta como un intermedio entre ambas subespecies, más próxima a *M. o.*

lorentzianus (Bequaert, 1948). Sin embargo, en *M. o. lorentzianus* la reflexión del labio termina de forma muy apretada sobre la última vuelta, mientras que *M. o. oblongus* presenta un canal entre este y la última vuelta, más angosto que el observado en *M. o. musculus* (Doering, 1876; Hylton Scott, 1939; Bequaert, 1948).

Megalobulimus o. lorentzianus fue descripto originalmente como especie por Doering (1876), y posteriormente caracterizada anatómicamente por Hylton Scott (1939) quien la comparó solo desde lo conquiliológico con *M. oblongus* típico. En la comparación, Hylton Scott (1939) incluyó conchas de *M. o. lorentzianus* del noroeste de la Argentina y de *M. oblongus* identificadas por Ihering de San Pablo, Brasil. De su análisis, la autora concluyó que existían diferencias notables principalmente en la espira, banda subsutural, callo parietal y labio, tal como fuera previamente descripto (Doering, 1876; Cockerell, 1926; Hylton Scott, 1939; Bequaert, 1948). Casi una década después, Bequaert (1948) basado en las características de la procotoncha, encuentra evidencia para considerar a *M. lorentzianus* muy similar a *M. oblongus*, y por tanto subordinarla como subespecie de esta última. Asimismo, al describir a *M. o. musculus*, este autor considera a la nueva subespecie como parte de *M. oblongus* por sus características de la protoconcha, aunque basado en el resto de los caracteres cualitativos de la concha la encuentra más estrechamente relacionada a *M. o. lorentzianus* que a la forma típica de *M. oblongus* (Bequaert, 1948).

Por otra parte, a diferencia de *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* presenta una concha elíptica-oval y una protoconcha cuya distinción radica en sus costillas gruesas, más bien altas con bordes definidos y que si bien están distribuidas regularmente de sutura a sutura no son rectas ni abundantes, con el ancho de los intervalos entre las costillas equivalentes a las mismas. Además presenta granulación, la cual no manifiesta un patrón definido. La misma es conspicua y fina en la protoconcha, no tapizando las costillas, en caso de hacerlo es de forma débil (Bequaert, 1948). Es oportuno mencionar, que en la revisión de Bequaert (1948), el autor describe dos nuevas subespecies para *M. sanctipauli*; *i.e. M. s. pygmaeus* y *M. s. eyerdami*. Ambas subespecies fueron descriptas sobre la base de un único espécimen, la primera con localidad tipo "Brasil", mientras que la segunda fue informada para la "Argentina, Prov. de Salta, cerca de la frontera con Bolivia" (Bequaert, 1948). Si bien *M. s. eyerdami* ha sido mencionada para la Argentina por diversos autores (Parodiz,

1957; Fernández, 1973; Fernández y Castellanos, 1973; Beltramino *et al.*, 2012a, 2015a), siempre fue haciendo referencia al registro dado por Bequaert (1948), y al igual que *M. s. pygmaeus* para Brasil, no han vuelto a ser registradas (Simone y Leme, 1993; Simone, 2006; Beltramino *et al.*, 2012a, 2015a; Beltramino, 2013). Vale destacar que *M. s. eyerdami* tampoco pudo ser identificada en el presente trabajo a partir del material analizado procedente de la provincia de Salta u otras áreas adyacentes.

Hasta este punto de la discusión, solo se da cuenta de aproximadamente 2/3 de los lotes analizados, los que pudieron ser identificados como *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus* y *M. sanctipauli*. El material restante, procedente de las provincias de Misiones y Corrientes, estuvo constituido por especímenes cuya concha fue más bien oval y con espira baja, ancha y de ápice redondeado, asemejándose a *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*, aunque la presencia de banda subsutural y la granulación las hacía más afines a *M. o. musculus*, el cual además fue referido para Misiones y Corrientes por Parodiz (1957) y Fernández (1973). Sin embargo, la última vuelta oval-alargada, la banda subsutural gruesa y el espeso y ancho del labio hacían a estos especímenes más bien semejantes a *M. sanctipauli*. Al analizar la protoconcha de estos lotes, se encontró que la misma presentaba costillas axiales anchas, bajas y con intervalos del ancho de las costillas, lo que permitió descartar su pertenencia a *M. oblongus* típico o algunas de sus subespecies (Bequaert, 1948). Si bien estas características se asemejaban a *M. sanctipauli*, las costillas difirieron de esta entidad por no respetar el patrón de forma constante y regular en toda la protoconcha, dado que en la mitad o 2/3 finales de la tercera vuelta las costillas fueron más anchas, bajas, con contorno difuso, distribuidas irregularmente, sin patrón aparente en el ancho de los intervalos; las costillas de sutura a sutura presentaron el tercio final desvanecido, con la presencia de costillas accesorias. Además, la característica más distintiva de este grupo de especímenes fue la presencia de una microgranulación en la protoconcha muy conspicua, dispuesta en un patrón espiral ininterrumpido entre las costillas y su intervalo. Según Bequaert (1948), *M. sanctipauli* presenta características conquiliológicas que en su conjunto le son propias, sin embargo advierte que concuerda en algunos de sus caracteres conquiliológicos con *M. granulosus* y sus subespecies, *i.e. M. g. paranaguensis*, *M. g. abbreviatus* y *M. g. foreli*, todas ellas presentes en Brasil (Bequaert, 1948). Al analizar este subconjunto de lotes bajo esta premisa, se encontró que las características de la protoconcha, *i.e.* costillas y microgranulación, concordaron con las dadas por Bequaert (1948) para *M.*

granulosus y las subespecies subordinadas a esta. Es así que las características conquiliológicas encontradas como similares por un lado a *M. o. musculus* y por otro a *M. sanctipauli*, concordaron con las dadas en su conjunto para *M. g. abbreviatus* (Bequaert, 1948; Fontenelle, 2012), a la cual se asignaron finalmente estos especímenes de Misiones y Corrientes. Como ya fuera mencionado, *M. abbreviatus* fue originalmente descripta por Bequaert (1948) como subespecie de *M. granulosus*. Pocos años después, las tres subespecies de *M. granulosus* fueron elevadas al estatus específico por Morretes (1952), y solo recientemente fueron abordadas de manera comparativa desde lo conquiliológico y lo anatómico, como el "complejo *M. granulosus*" (Fontenelle, 2012).

Hasta aquí se ha hecho mención de cómo el material analizado ha sido asignado a cuatro entidades del género basado principalmente en las características cualitativas de la concha. Si bien Bequaert (1948) argumentó que los caracteres específicos de *Megalobulimus* se encuentran en la escultura de la protoconcha, el autor consideró útiles también la forma de la concha y su tamaño para delimitar subespecies. Así, describió diversas variables continuas, sin embargo, a los efectos descriptivos y comparativos solo empleó la longitud total (LT), ancho en vista frontal (AF) y número de vueltas (NV). Las medias de estas mismas variables obtenidas aquí para cada una de las entidades permitieron compararlas con las descriptas por Bequaert (1948), quien anotó las siguientes medidas: *M. o. oblongus* (N=18) presenta en promedio una LT = 101,72 (± 20,47), AF= 56,92 (± 12,28) y NV= 6,20 (± 0,285); *M. o. lorentzianus* (N= 8) una LT= 84,75 (± 9,06), AF= 53,38 (± 6,18) y NV= 5,36 (± 0,18), y *M. o. musculus* (N= 18) una LT= 67,58 (± 9,08), AF= 40,19 (± 5,07) y NV= 5,32 (± 0,22). Las medias obtenidas aquí para *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* concuerdan con las referidas más arriba y permiten diferenciar estas dos subespecies de *M. oblongus* típico (Hylton Scott, 1939; Bequaert, 1948; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014).

Para *M. sanctipauli*, Bequaert (1948) refiere sobre la base de seis individuos una LT= 89,67 (± 8,04), AF= 46,92 (± 4,15) y NV= 5,61 (± 0,31). Fontenelle (2012) informa estas mismas variables al revisar aproximadamente 100 conchas de la especie para Brasil, en donde las medias informadas para LT y AF concuerdan, al igual que las presentadas en este trabajo; mientras que la media del NV obtenida aquí es algo superior a la informada por Bequaert (1948), aunque en concordancia con Fontenelle (2012). Por

otra parte, Bequaert (1948) propone para *M. s. pygmaeus* (N= 1) una LT= 62,50, AF= 33,00 y NV= 5,33 y *M. s. eyerdami* (N= 1) una LT= 69,00, AF= 34,00 y NV= 5,25; considerando a las variables LT y AF caracteres útiles para diferenciar a estas dos subespecies de su tipo, mientras que el NV no presentaría valor diagnóstico subespecífico. No obstante esto, los especímenes identificados en los lotes analizados concuerdan con la forma típica de *M. s. sanctipauli*, y no con las otras subespecies.

Para *M. granulosus* típico y sus tres subespecies, Bequaert (1948) también informa la media de la LT, AF y NV. Particularmente para cada caso puntual indica: *M. g. granulosus* (N= 8) una LT= 93,25 (± 8,14), AF= 49,94 (± 7,32) y NV= 5,25 (± 0,19); *M. g. abbreviatus* (N= 5) una LT= 69,90 (± 4,478), AF= 39,10 (± 2,22) y NV= 5,00 (± 0,000); *M. g. paranaguensis* (N= 3) una LT= 102,17 (± 7,25), AF= 61,83 (± 3,01) y NV= 5,36 (± 0,13); y *M. g. foreli* (N= 2) una LT= 92,25 (± 2,48), AF= 50,25 (± 3,89) y NV= 5,50 (± 0,00). Fontenelle (2012) tratando a estas cuatro entidades como especies del "complejo *M. granulosus*", informa sobre la base de aproximadamente 470 conchas las mismas tres variables, las cuales difieren levemente de las presentadas por Bequaert (1948). A pesar de ello, *M. abbreviatus* continúa caracterizándose por presentar una LT menor que las otras tres especies del complejo, lo que se refleja en una espira más baja y ancha y una forma general de la concha menos elíptica (Bequaert, 1948; Fontenelle, 2012). Es así que el subconjunto de conchas medidas aquí procedentes de los lotes asignados en este capítulo a *M. abbreviatus*, presentan una media de la LT, AF y NV dentro del espectro presentado por Bequaert (1948) y Fontenelle (2012). Sin embargo, la media de la LT aquí informada sigue siendo mucho menor que la obtenida por dichos autores para *M. granulosus*, *M. g. foreli* y *M. paranaguensis* (Bequaert, 1948; Fontenelle, 2012).

Complementariamente a lo mencionado, los análisis morfométricos efectuados permitieron valorar estadísticamente la significación de la variación conquiliológica de las cuatro entidades de *Megalobulimus* identificadas para la Argentina. Estos abordajes ya han sido empleados en distintos grupos de moluscos terrestres con el objeto de analizar la utilidad taxonómica de dichas herramientas a efectos de discriminar entre especies y/o subespecies. Solo a modo de ejemplificar dicha situación se citan algunos casos: Madec *et al.* (2003: *Cornu aspersum*), Madec y Bellido (2007: *Notodiscus hookeri*), Pizá y Cazzaniga (2010: *Plagiodontes daedaleus* y *P. strobelii*), Buckleya *et*

al. (2011: *Placostylus ambagiosus*, *P. hongii*, *P. bollonsi* y sus subespecies), Díaz *et al.* (2012: *Bulimulus bonariensis bonariensis* y *B. b. sporadicus*), Borda y Ramírez (2013: *Megalobulimus separabilis*, *M. capillaceus* y *M. florezi*), Miranda y Cuezzo (2014: especies de *Bostryx stelzneri*) y Borda y Ramírez (2014: *Megalobulimus leucostoma* y sus subespecies).

El ACP realizado sobre las ocho medidas mostró que la variable que explicó mejor la varianza acumulada fue la longitud de la espira y el RWA evidenció que las principales diferencias de forma interindividuales están concentradas en la última vuelta, espira y abertura. Esta información concuerda con lo hallado para seis especies y subespecies de *Megalobulimus* del Perú por Borda y Ramírez (2013, 2014), donde la aplicación de técnicas de MC y MG no permitieron separar completamente las entidades, debido al solapamiento de los morfoespacios más allá de existir diferencias estadísticamente significativas en la forma media de algunas de las entidades. En esta línea, el MANOVA realizado en los abordajes de MC y MG para los especímenes de la Argentina da cuenta de diferencias significativas entre las cuatro entidades. A diferencia del ACP y RWA donde se maximiza la varianza entre individuos sin considerar una estructura de grupo *a priori*, el CVA resultó de mayor utilidad para discriminar las entidades tanto en MC y MG, por cuanto maximiza la varianza entre grupos y minimiza la varianza dentro de cada grupo, habiendo sido considerada las estructura de grupo *a priori* establecida por las características de la protoconcha que permitió la asignación de los individuos a las entidades. Este mayor poder de discriminación empleando el CVA, también fue evidenciado para las formas presentes en Perú (Borda y Ramírez, 2014).

A diferencia de los abordajes de MC y MG realizados por Borda y Ramírez (2013, 2014), en este trabajo se obtuvieron también matrices de asignación y confusión que permitieron evaluar el éxito de los abordajes morfométricos para la asignación de especímenes a entidades, donde la MC parecería ser de mayor utilidad que la MG, con un éxito en la asignación correcta del 90,94% y 77,92%, respectivamente. Esto sugiere que el tamaño de la concha, el cual está contenido en el análisis de MC, tendría implicancia en la mejor separación entre las entidades, que la forma por sí misma la cual está independizada del tamaño en MG. Más allá de lo mencionado, ambos abordajes morfométricos concuerdan en que existe un solapamiento entre *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*. El análisis de los valores de asignación sugiere que el solapamiento entre

estas subespecies, y la asignación incorrecta de individuos estaría más bien vinculada a la forma de la concha, mientras que el tamaño permitiría una mejor asignación de los individuos a cada entidad. En *M. o. lorentzianus* la asignación incorrecta indicada tanto en MC como en MG, se debe a la asignación de individuos de esta entidad a *M. o. musculus*; mientras que esta última sobre la base de MC no presenta asignación incorrecta de sus individuos a alguna de las entidades aquí analizadas, al tiempo que sobre la base de MG sus individuos pueden ser asignados incorrectamente a *M. o. lorentzianus* y *M. abbreviatus*. En el caso de *M. sanctipauli*, el porcentaje de asignación correcto fue más alto para MC que MG, presentando individuos cuya forma y tamaño pueden ser asignados incorrectamente a *M. abbreviatus*. Por último, para *M. abbreviatus* también el porcentaje de asignación correcto fue más alto para MC que MG. Esta entidad resultó ser la de mayor diversidad en forma y tamaño de las analizadas, cuyos individuos pueden ser asignados incorrectamente a *M. sanctipauli* en función del tamaño y a *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus* y *M. sanctipauli* en función de la forma.

Así, de los análisis efectuados se desprende que las cuatro entidades pueden ser discriminadas con base en la forma y el tamaño, independientemente del abordaje morfométrico que se siga, aunque se debe admitir la superposición como ya fuera evidenciado por Borda y Ramírez (2013, 2014). En este sentido, es posible discriminar las entidades de *Megalobulimus* basados en caracteres conquiliológicos siempre y cuando se tenga presente y se admita un solapamiento de caracteres (Leme, 1973; Mansur y Leme, 1996). No obstante, a nivel conquiliológico y a partir de la evidencia de la entidades analizadas para la Argentina es posible confirmar que la escultura de la protoconcha propuesta por Bequaert (1948) resulta de mayor utilidad para la diagnosis de estas entidades, por sobre el tamaño y la forma.

En relación con la distribución de las cuatro entidades identificadas para la Argentina, el mapeo de los lotes de *M. o. lorentzianus* concuerda en gran parte con la distribución esperada según Bequaert (1948), Parodiz (1957), Fernández (1973) y la reconstrucción de la distribución histórica presentada por Beltramino (2014), *i.e.* desde Salta hasta el norte de Córdoba. Sin embargo, parte del material analizado indica una distribución más austral que la previamente informada, alcanzando el sur de la provincia de Córdoba y norte de Buenos Aires. Al mismo tiempo, el material informado aquí para

Formosa y Santa Fe, representa el primer registro para estas provincias y suplementan aquellas mencionadas previamente (Bequaert, 1948; Parodiz, 1957; Fernández, 1973). Si bien la entidad parecería exclusiva de la provincia biogeográfica de la Yunga según los antecedentes, la distribución mapeada incluye además la provincia biogeográfica Chaqueña (Morrone, 2014; Beltramino, 2014). Adicionalmente, los registros del norte de la provincia de Buenos Aires, evidenciados aquí por primera vez, sugieren que la entidad se encuentra también en la provincia biogeográfica Pampeana (Morrone, 2014). El mapeo de los lotes identificados como *M. sanctipauli*, indican que esta especie se encuentra restringida a la provincia de Misiones en concordancia con Parodiz (1957) y Fernández (1973), además de ajustarse a la distribución histórica presentada por Beltramino (2013). La información aquí expuesta, junto a los antecedentes preexistentes, sugiere que *M. sanctipauli* se distribuye en la Argentina en toda la provincia de Misiones y en una pequeña área limítrofe de la provincia de Corrientes. En su conjunto, esta región se corresponde a la provincia biogeográfica del Bosque Atlántico (Parodiz, 1957; Fernández, 1973; Di Bitetti *et al.*, 2003; Morrone, 2014; Beltramino *et al.*, 2015a). La ajustada concordancia de la distribución de *M. sanctipauli* a esta provincia biogeográfica podría resultar en una disminución de su área de ocupación a futuro como consecuencia del calentamiento global (Beltramino *et al.*, 2015a). Por otra parte, el mapeo de los lotes identificados como *M. o. musculus* se restringe a una pequeña región del noroeste de la Argentina, en el contexto de la distribución esperada para esta entidad según Bequaert (1948), la cual solapa distribución con *M. o. lorentzianus*. La distribución aquí propuesta para *M. o. musculus* no está en total concordancia con la indicada por Parodiz (1957) y Fernández (1973). El primer autor amplió la distribución mencionada por Bequaert (1948) a la provincia de Corrientes, mientras que la segunda convalida la presencia en Corrientes y extiende su rango de distribución a una pequeña región del sur de la provincia de Misiones. Si bien no se pudieron identificar especímenes de *M. o. musculus* procedentes del área Corrientes-Misiones, al mapear los lotes identificados como *M. abbreviatus* se encontró que presentan un área de distribución equivalente a la propuesta por Parodiz (1957) y Fernández (1973) para *M. o. musculus* en el sur de Misiones y Corrientes. A partir de esta evidencia, se sugiere que *M. abbreviatus* probablemente se mantuvo en el anonimato todo este tiempo, pasando sus especímenes como *M. sanctipauli* y/o *M. o. musculus* debido a la similitud de la protoconcha con la primera especie y a su forma y

tamaño solapante con ambas, como ya fuera previamente mencionado. Este argumento encuentra evidencia a su favor si se considera que *M. abbreviatus* hasta la fecha ha sido informada para el sur de Brasil, principalmente para los estados de Santa Catarina (zona costera) y Rio Grande do Sul, este último limítrofe con el sur de las provincias de Misiones y este de Corrientes (Bequaert, 1948; Bruschi-Figueiró y Veitenheimer-Mendes, 2002; Agudo-Padrón, 2011c; Agudo-Padrón y Lenhard, 2011; Fontenelle, 2012).

Para finalizar, es importante destacar que *M. o. musculus* y *M. sanctipauli* no habían sido re-caracterizadas conquiliológicamente desde Bequaert (1948), a diferencia de *M. o. lorentzianus* y *M. abbreviatus* (Hylton Scott, 1939; Thomé *et al.*, 1994; Fontenelle, 2012). Además, la distribución propuesta por Parodiz (1957) y Fernández (1973) sigue vigente para cualquier entidad del género en la Argentina, a excepción *M. sanctipauli* y *M. o. lorentzianus* que cuentan con una reconstrucción de su distribución histórica (Beltramino, 2013, 2014). En este contexto, los abordajes conquiliológicos y de distribución de los lotes aquí estudiados parecerían suficientes para otorgar identidad y delimitar la ocupación de las cuatro entidades en nuestro país. Sin embargo, tal como se evidencia a partir del controversial caso de *M. o. musculus* y *M. abbreviatus*, es menester complementar las diagnosis conquiliológicas con otro tipo de información (*e.g.* anatómica y genética) que permita refinar el entendimiento del rango de variación conquiliológica dentro del área de distribución de cada entidad. Esta información es aportada en los capítulos subsiguientes.

CAPÍTULO II: ANATOMÍA

II.1 INTRODUCCIÓN

Leme (1973) crea la familia monogenérica Megalobulimidae, definiéndola sobre la base de cinco características anatómicas, a saber: i- presencia de palpos bucales desarrollados y lobulados; ii- un tabique pulmonar, que separa el techo de la cavidad pulmonar en un área excretora y una esencialmente respiratoria; iii- presencia de una válvula prerrectal en el intestino; iv- riñón con nefrostoma simple, sin vestigios de uréter, localizado en la pared lateral libre, a mitad camino entre el extremo anterior y caudal del surco uretral; y v- presencia de una glándula genital accesoria en el trayecto longitudinal del espermoviducto.

Los conocimientos actuales de la anatomía de entidades de *Megalobulimus* se limitan a unos pocos antecedentes. Algunos de estos realizan un abordaje anatómico parcial o de órganos individuales, *e.g.* Semper (1870: morfología externa del reproductor de *M. oblongus*), Ihering (1891: morfología externa del reproductor de *M. oblongus*), Baker (1926: morfología interna del reproductor de *M. oblongus*), Leme (1973: complejo paleal de *M. bronni*, morfología externa e interna del estómago de *M. popelairianus* y *M. granulosus*, morfología interna del intestino anterior y posterior de *M. abbreviatus* e interna del espermoviducto de *M. gummatus*; 1989: rádula de *M. grandis* y *M. lopesi*, y morfología externa del reproductor de *M. ovatus* y *M. lopesi*), Jaramillo Roldán *et al.* (2014: morfología externa e interna del reproductor de *M. oblongus*). Otros antecedentes anatómicos presentan una descripción más exhaustiva; en la mayoría de los casos la caracterización fue dada para el complejo paleal, sistema digestivo y reproductor, y en una minoría además los sistemas nervioso, muscular y circulatorio. Estos incluyen a Hylton Scott (1939: *M. lorentzianus*), Leme e Indrusiak (1990: *M. parafragilior*), Leme (1993: *M. auritus*), Thomé *et al.* (1994: *M. abbreviatus*), Fontenelle (2012: *M. paranaguensis*, *M. granulosus* y *M. abbreviatus*), Leme e Indrusiak (1995: *M. proclivis*), Simone y Leme (1998: *M. mogianensis* y *M. riopretensis*), Borda y Ramírez (2013: *M. capillaceus*, *M. florezi* y *M. separabilis*).

De las entidades descriptas de manera exhaustiva, ocho pertenecen a las 49 entidades caracterizadas por Bequaert (1948) desde lo conquiliológico (cuatro especies

y cuatro subespecies), complementando los abordajes anatómicos a la diagnosis conquiliológica de cada entidad (Hylton Scott, 1939; Leme, 1993; Thomé *et al.*, 1994; Leme e Indrusiak, 1995; Fontenelle, 2012; Borda y Ramírez, 2013). Desde lo anatómico *M. auritus*, *M. proclivis*, *M. capillaceus* y *M. separabilis* fueron respaldadas en su estatus específico, mientras que *M. granulosus*, *M. paranaguensis* y *M. abbreviatus*, descriptas originalmente como subespecies por Bequaert (1948) y posteriormente elevadas al estatus especifico por Morretes (1952) desde lo conquiliológico, fueron sostenidas como especies desde lo anatómico. La excepción la constituye *M. o. lorentzianus*, que es la única entidad del género *Megalobulimus* descripta conquiliológicamente como especie, y que a pesar de contar con un abordaje anatómico extensivo (Hylton Scott, 1939), fue subordinada posteriormente a subespecie de *M. oblongus* por Bequaert (1948). Las restantes entidades que cuentan con un abordaje anatómico exhaustivo (*i.e. M. mogianensis*, *M. riopretensis*, *M. parafragilior* y *M. florezi*) constituyeron nuevas especies para el género, posteriores a Bequaert (1948) y Morretes (1952), en la que se combinaron los criterios de diagnosis conquiliológicos seguidos por Bequaert (1948) con la evidencia anatómica (Leme e Indrusiak, 1990; Simone y Leme, 1998; Borda y Ramírez, 2013).

A la fecha, solo presentan antecedentes anatómicos 12 de las 84 especies reconocidas para el género *Megalobulimus* por Borda y Ramírez (2013) y Fontenelle *et al.* (2014). Este bajo número de descripciones completas hace difícil aún definir un conjunto de órganos o caracteres de preferencia para la diagnosis de las entidades, ya que en la mayoría de los casos estos son constantes y homogéneos (Leme, 1973; Borda y Ramírez, 2013). De todos estos antecedentes Simone y Leme (1998) y Borda y Ramírez (2013) son probablemente los que más se aproximan en la definición de caracteres de utilidad que en su conjunto permiten una eficaz delimitación de las especies por ellos abordadas. Desde una óptica comparativa, estos autores encuentran evidencia para discriminar especies sobre la base del complejo paleal (*e.g.* vasos, proporción del riñón en relación al tabique pulmonar, pliegues del surco uretral, extensión del tabique pulmonar sobre el riñón -plexo epirrenal-), sistema digestivo (*e.g.* pliegues internos del intestino anterior, región prevalvular) y sistema reproductor (*e.g.* inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca, proporción del saco anexo del oviducto en relación al oviducto, proporción de la vagina en relación al oviducto, presencia o ausencia de flagelos en la

inserción del conducto deferente y el epífalo, e internamente pliegues de la porción femenina y masculina) (Simone y Leme, 1998; Borda y Ramírez, 2013).

Para la Argentina, la única entidad del género que cuenta con antecedentes es *M. o. lorentzianus* (Hylton Scott, 1939). Esta descripción anatómica en particular, junto a la de Baker (1926), se han considerado obras influyentes en los subsiguientes abordajes anatómicos de los integrantes de la familia Megalobulimidae e incluso para especies de los géneros de la familia Strophocheilidae (*e.g.* Indrusiak y Leme 1985; Leme, 1973, 1989; Pena *et al.*, 2004; Borda *et al.*, 2010; Borda y Ramírez, 2013; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). Sin embargo, Hylton Scott (1939) en su descripción no aborda la morfología interna del sistema digestivo ni el sistema reproductor femenino. Por su parte, *M. o. musculus* y *M. sanctipauli* aún continúan sin descripciones anatómicas.

Por lo expuesto, el presente capítulo tiene como objeto evaluar anatómicamente a *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*; explorando principalmente el complejo paleal, sistema digestivo y reproductor, tanto su morfología externa como interna, en busca de caracteres anatómicos que, en su conjunto, le sean propios y complementen su diagnosis conquiliológica.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 MATERIAL DE ESTUDIO Y ACONDICIONAMIENTO

Como fuera mencionado en la sección "I.2.1 Material de Estudio" capítulo I, aquí se indica el procedimiento de sacrificio de aquellos ejemplares vivos resultantes de las prospecciones malacológicas llevadas a cabo entre 2011 y 2015. Además, se describe el procedimiento que permitió la separación de las partes blandas de la concha de estos ejemplares como de aquellos que precedían a este estudio.

Los individuos fueron sacrificados por inmersión y reducción de su metabolismo modificando el procedimiento de Leme (1973) y Thomé *et al.* (1994). Para esto, cada ejemplar fue introducido en un recipiente de vidrio con agua y abundantes cristales de mentol. El recipiente fue sellado de forma hermética con parafilm asegurando la ausencia de cámaras de aires internas. Se dejó a temperatura ambiente durante 6 a 10 hs, hasta que el cuerpo del animal estuviera fuera de la concha y posteriormente el recipiente fue mantenido a 4°C durante 26 a 30 hs.

Las partes blandas fueron separadas de la concha teniendo la precaución de no perforar y/o desgarrar la masa visceral. En un principio, por fricción y asistido con un punzón curvo de punta roma se desprendió la porción anterior de la inserción del músculo columelar (porción del músculo inserta en la última vuelta alcanzable desde la abertura del animal). Seguidamente, se forzó el desgarro de la porción restante del músculo columelar (inserto en la última vuelta de la espira y en dorsal al eje columelar). Para ello, se rodeó con la parte media de una pinza de punta recta la porción muscular inferior al collar del manto, intercalando movimientos de palanca con ambos extremos de la pinza (*i.e.* punta y mango) sobre el peristoma. A medida que estos progresaron, fueron acompañados con un movimiento en espiral en sentido del crecimiento de la concha. Al lograr el desprendimiento de la última porción del músculo columelar, que se percibe como el desgarro de una tela dura, con una pinza de punta curva se acompañó el desenrrollamiento de la masa visceral alojada en la espira de la concha. Posteriormente, las partes blandas fueron colocadas en frascos plásticos con cierre hermético, y fijadas en solución de Railliet-Henry modificada (agua destilada 93%, ácido acético 2%, formol 5% y 6 gr de cloruro de sodio por lt de solución) o en alcohol

70%. El fijador fue remplazado semanalmente hasta eliminar los restos de moco. Las conchas vacías se dejaron orear por un par de horas a temperatura ambiente, y luego se colocaron en bolsas herméticas, para su abordaje conquiliológico, tal como se presentó en el capítulo I. Todos los contenedores de cada unidad biológica (*e.g.* bolsa con la concha, frascos con partes blandas) fueron rotulados debidamente para asegurar la trazabilidad futura de cada espécimen y/o sus partes.

De las cuatros entidades identificadas conquiliológicamente en el capítulo I, el presente abordaje anatómico contó con 27 individuos adultos de *Megalobulimus* (Tabla X). Todos fueron utilizados para realizar las descripciones anatómicas, excepto para la caracterización del arco mandibular y rádula, para lo cual se emplearon dos individuos de cada entidad. La trazabilidad de los individuos incluidos en este capítulo se especifica en la Tabla X.

II.2.2 Disección Anatómica

II.2.2.1 Procedimiento de Disección

La disección externa del cuerpo de los especímenes, para evitar el desgarro o ruptura de las estructuras internas de interés de estudio, fue realizada según las propuestas de Leme (1973) y Thomé *et al.* (1994). El tratamiento y la disección de los sistemas digestivo, reproductor y complejo paleal se basaron en Hylton Scott (1939) con aportes de Leme (1973) y Borda y Ramírez (2013). Particularmente para el sistema digestivo y reproductor se complementó este abordaje siguiendo a Simone y Leme (1998). La preparación de los arcos mandibulares y rádulas se realizó siguiendo la propuesta de Holznagel (1998): las estructuras fueron separadas de la masa de tejido y colocadas en microtubos de 1,5 ml; se agregaron 500 µl de *buffer* NET (1 ml Tris pH 8.0, 2 ml 0,5 M EDTA, 1 ml 5M NaCl, 20 ml 10% SDS, 76 ml agua) y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Posteriormente fueron incubadas a 57°C; con renovación de *buffer* NET y proteinasa K hasta verificar la ausencia de tejido. Se prosiguió con dos lavados de agua destilada y posterior preservación en alcohol 25% hasta el montaje. Finalmente las rádulas y arcos mandibulares se revisaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL 6360) perteneciente al Museo de La Plata.

Tabla X. Material empleado en el análisis anatómico. ID$^{MC/MG\ (Tabla\ III)}$ indica el número que identifica a la concha que fue incluida en el análisis de morfometría (MC y MG), Tabla III del capítulo I; * indica una concha perteneciente al mismo lote que el individuo analizado anatómicamente. ID$^{D\ (Tabla\ IX)}$ indica el número de lote que fue incluido en el mapeo de la distribución, Tabla IX del capítulo I. # indica el individuo que fue empleado para caracterizar el arco mandibular y rádula.

ID	Lote / Individuo	ID$^{MC/MG\ (Tabla\ III)}$	ID$^{D\ (Tabla\ IX)}$
	M. o lorentzianus		
1	MLP-Ma 14079/1#	25, 26*	2
2	MLP-Ma 14080/1	27	3
3	MLP-Ma 14081/1	28	4
4	MLP-Ma 14082/1	29	5
5	MLP-Ma 14083/1	30	6
6	MLP-Ma 14084/1	31	7
7	MLP-Ma 14084/2	-	7
8	IFML-Moll 15857/1	32	1
9	MLP-Ma 14085/1#	33	8
10	MLP-Ma 14086/1	34	9
11	MLP-Ma 14086/2	-	9
12	MLP-Ma 14087/1	35	10
13	MLP-Ma 14088/1	36	11
	M. o. musculus		
14	IFML-Moll 15858/1#	40	14
15	IFML-Moll 15858/2	41	14
16	MLP-Ma 14091/1	42	15
17	MLP-Ma 14092/1#	43	16
	M. sanctipauli		
18	MLP-Ma 14097/2#	55*, 56	21
19	MLP-Ma 14097/3#	55*	21
20	MLP-Ma 14098/1	57	22
21	MLP-Ma 14099/1	58	23
	M. abbreviatus		
22	MLP-Ma 14125/1	1	46
23	MLP-Ma 14126/1#	2	47
24	MLP-Ma 14128/1	-	49
25	MLP-Ma 14129/1#	3	50
26	MLP-Ma 14129/2	4	50
27	MLP-Ma 14130/2	22*	51

MLP-Ma, Colección Malacológica del Museo de La Plata. **IFML-Moll**, Colección Malacológica del Instituto Fundación Miguel Lillo - Tucumán.

La terminología empleada para la descripción anatómica estuvo principalmente basada en Hylton Scott (1939). El formato descriptivo se realizó siguiendo a Hylton Scott (1939) y Simone y Leme (1998), con aportes tomados de Borda y Ramírez (2013) y Miranda y Cuezzo (2014). *Megalobulimus o. lorentzianus* constituyó la entidad de referencia para las descripciones, mientras que las restantes entidades fueron descriptas referenciando a esta y haciendo hincapié en los caracteres en que se diferencian. Además, se consideró a este acápite el más apropiado para presentar y compilar los principales caracteres diagnósticos (conquiliológicos y anatómicos) de *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*.

La disección general y aislamiento de las estructuras anatómicas se hicieron bajo agua en cajas de Petri conteniendo paraplast, siguiendo la metodología empleada por Leme (1973). Para sostener y fijar las partes blandas se emplearon agujas de acupuntura. Cada sistema objeto de estudio fue aislado, analizado visualmente y conservado en frascos plásticos con cierre hermético conteniendo fijador o conservante (Railliet-Henry o alcohol 70% según el caso). Para la disección se empleó una lupa flexo (2X) y cuando fue requerido un microscopio binocular estereoscópico (LEICA MZ6 y LABOMED Luxeo 4D). Las estructuras analizadas fueron fotodocumentadas empleando una cámara Nikon Coolpix P500 36X y microscopio binocular estereoscópico LABOMED Luxeo 4D. La edición, referenciación y composición de láminas se hizo mediante los programas Corel PHOTO-PAINT X7 y CorelDRAW X7.

II.2.2.2 Abreviaturas

a, ano; **acb**, abertura del conducto de la bolsa espermática; **ai**, asa intestinal; **am**, arco mandibular; **b**, boca; **bb**, bulbo bucal; **be**, bolsa espermática; **bfce**, bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **bp**, base del pie; **bss1**, borde del surco seminal; **bss2**, borde del surco seminal; **c**, collar; **ca**, cámara del albumen; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **cda**, conducto de la glándula digestiva anterior; **cdp**, conducto de la glándula digestiva posterior; **cgs**, conducto de las glándulas salivares; **ch**, conducto hermafrodita; **cp**, cavidad pulmonar; **dc**, diente central; **dl**, dientes laterales; **ea**, esófago anterior; **ef**, epífalo; **em**, esófago medio; **eo**, espermoviducto; **ep**, esófago posterior; **es**, estómago; **fcp**, fondo de la cavidad paleal; **fl**, flagelo; **g**, gonoporo; **ga**, glándula del albumen; **gda**, glándula digestiva anterior; **gdp**, glándula digestiva posterior; **gga**, glándula genital accesorio; **gs**, glándula salival; **h**,

heces; **ia**, intestino anterior; **im**, intestino medio; **ip**, intestino posterior; **m**, manto; **mc**, músculo columelar; **mr**, músculo retractor del pene; **n**, neumostoma; **nf**, nefrostomo; **o**, ovotestis; **ov**, oviducto; **p**, pericardio; **pl - p5**, pliegues del intestino prevalvular; **p6 - p7**, pliegues del intestino posvalvular; **p8 - p9**, pliegues del intestino preanales; **p10**, pliegues del ano; **pb**, pliegues del buche; **pbe**, pliegues de la bolsa espermática; **pcbe**, pliegues del conducto de la bolsa espermática; **pd**, paladar; **pe**, plexo epirrenal; **pg**, poro genital; **pgf**, poro genital femenino; **pgm**, poro genital masculino; **plb**, palpo bucal; **plp**, pliegues longitudinales del pene; **plu**, pliegues lisos del útero; **pmu**, pliegues membranosos del útero; **pn**, pene; **pov**, pliegues del oviducto; **pso**, pliegues del saco anexo del oviducto; **pt**, próstata; **ptp**, pliegue transversal del pene; **ptu**, pliegues transversales del útero; **pv**, pliegues vaginales; **py**, pliegue en Y del epífalo; **r**, riñón; **rc**, región cefálica; **rt**, recto; **sg**, saco glandular anexo; **sga**, surco de plegamiento de la glándula genital accesoria; **sipt**, surco interno de la próstata; **so**, saco anexo del oviducto; **su**, surco uretral; **te**, tiflosol esofágico; **teg**, tegumento; **ti**, tiflosol intestinal; **tp**, tabique pulmonar; **tro**, tentáculo retráctil portador del omatóforo; **trs**, tentáculo retráctil sensorial; **u**, útero; **v**, vagina; **vap**, vasos accesorios del pericardio; **var**, vasos adrectales; **vc**, vena periférica del collar; **vp**, válvula prerrectal; **vsp**, vaso satélite del pericardio; **vvp**, vasos accesorios de la vena pulmonar.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 *Megalobulimus oblongus lorentzianus*

II.3.1.1 Principales Caracteres Diagnósticos

Concha: longitud total 85,72 mm (±5,64), ancho en vista frontal 51,72 mm (±3,56) y número de vueltas 5,85 (±0,12). Color marfil opaco sin lustre; internamente blanco nacarado uniforme; banda subsutural completamente ausente. Última vuelta obesa-oval de contorno convexo. Ausencia de microgranulación en la tercera vuelta de la protoconcha. Reflexión del labio externo apretada sobre la última vuelta. Partes blandas: animal de color gris oscuro a gris claro uniforme. Tiflosol intestinal bilobulado longitudinalmente. Mitad posterior del oviducto con pliegues anchos y altos, intercalados por pliegues finos y bajos, superficie de ambos tipos de pliegues lisa; en mitad anterior del oviducto estos pliegues se separan por amplios surcos y forman una red parcialmente anastomosada. Mitad posterior de la vagina con pliegues anchos intercalados por pliegues finos, todos bajos y lisos, separados por amplios surcos y formando una red parcialmente anastomosada. Ningún pliegue longitudinal del pene se fusiona con el pliegue transversal del pene.

II.3.1.2 Morfología del Animal Vivo y Masa Visceral

El tegumento que recubre los tejidos blandos de la masa cefalopedal está superficialmente dividido por surcos, formando patrones geométricos irregulares (Fig. 21E: teg), con excepción del borde del manto (Fig. 21B, C: m) y la base del pie que son de superficie lisa (Fig. 21B: bp). Distribución del pigmento en la región cefalopedal uniforme, dependiendo del espécimen entre gris oscuro a gris claro. La región cefálica presenta en posición antero-ventral la abertura bucal (Fig. 21B: b); hacia los laterales se proyectan dos pares de tentáculos retractiles (Fig. 21A, B, C, E). El par de posición más dorsal corresponde a los portadores de los omatóforos (Fig. 21A, B: tro); el otro par, tentáculos sensoriales, tienen una posición anterior apical y su longitud es de aproximadamente la mitad del par anterior (Fig. 21A, B: trs). Debajo de cada tentáculo sensorial se encuentran los palpos bucales, uno a cada lado de la boca (Fig. 21B: plb); estos palpos tienen su borde apical lobulado. A la derecha de la región cefálica, por debajo del tentáculo portador del omatóforo y posterior al tentáculo sensorial y palpo

bucal se halla el gonoporo o abertura sexual del sistema reproductor (Fig. 21A: g), que constituye una pequeña depresión en la cual confluyen el poro genital femenino y masculino a través de un corto atrio genital común.

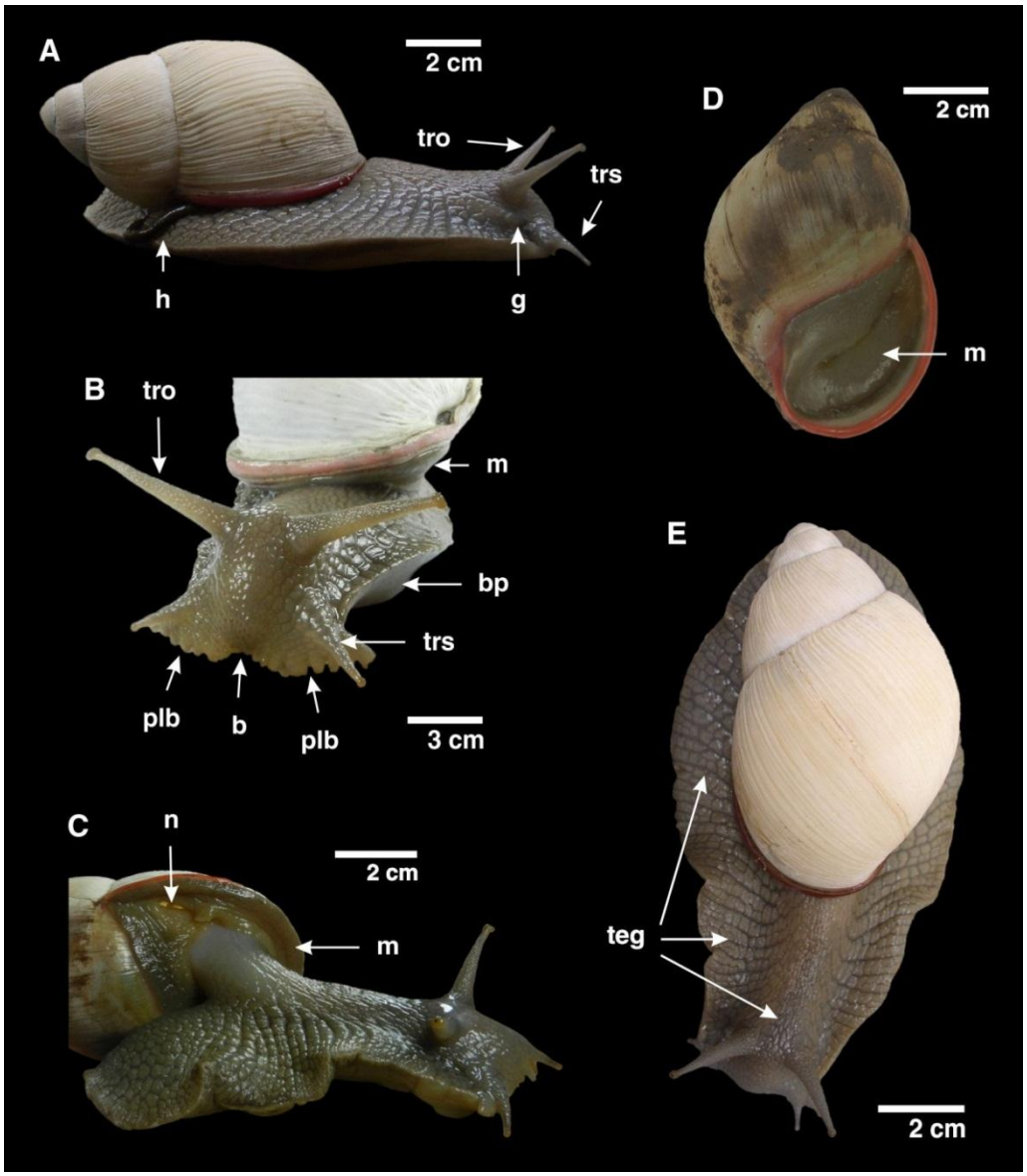

Figura 21. Animal vivo adulto de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*. A: vista lateral derecha; **B**: vista frontal; **C**: vista ventral de la concha y lateral de la región cefalopedal del animal; **D**: vista ventral de la concha con hipertrofia del manto; **E**: vista dorsal.

b, boca; **bp**, base del pie; **g**, gonoporo; **h**, heces; **m**, manto; **n**, neumostoma; **plb**, palpo bucal; **teg**, tegumento; **tro**, tentáculo retráctil portador del omatóforo; **trs**, tentáculo retráctil sensorial.

En posición lateral derecha y debajo del labio externo de la concha se encuentra el neumostoma (Fig. 21C: n) e inmediatamente y hacia su parte posterior el ano; en la Fig. 21A se puede observar su posición mediante la ristra de heces liberadas al exterior (Fig. 21A: h). Durante el período en que el gasterópodo se encuentra enterrado y después de un tiempo de inactividad, con la retracción cefalopedal ocurre la hipertrofia del borde del manto (Fig. 21D: m), el que actúa de tampón entre el animal y el exterior, en ningún caso se encontró vestigio o presencia de formación de epifragma.

Con la remoción de la concha, se observa en anterior el techo de la cavidad pulmonar (Fig. 22A, B: cp), limitada anteriormente por el borde del manto (Fig. 22A, B, C: c). Este, se extiende desde el neumostoma (Fig. 22C: n) a la derecha de la región cefálica del animal (Fig. 22A, B, C: rc) hasta el lateral izquierdo de la cavidad; hacia la región posterior de la cavidad pulmonar se dispone el pericardio y el riñón (Fig. 22A, B: p, r). Por debajo y hacia la zona posterior del complejo paleal se encuentra la glándula digestiva anterior (Fig. 22A: gda), ocupa la última vuelta y en ella discurre el intestino (Fig. 22A: ia, ip). A la derecha de la cavidad pulmonar, el pericardio y el riñón se dispone el surco uretral (Fig. 22B, C: su) y por encima de este la porción final del intestino posterior (Fig. 22B, C: ip), el cual constituye el límite derecho y fondo del complejo paleal, haciendo su recorrido hacia la parte anterior del animal, por debajo y paralelo a la línea de sutura de la última vuelta de la concha. La espira de la concha del animal aloja enteramente a la glándula digestiva posterior (Fig. 22A, B: gdp). Sobre las vueltas de la columela se apoya parte del sistema reproductor (Fig. 22C); al exponer esta superficie, forzando el desenrollamiento de las vueltas del cuerpo, se puede observar la glándula hermafrodita u ovotestis (Fig. 22C: o) íntimamente asociada a la glándula digestiva posterior (Fig. 22C: gdp); el ovotestis se continúa con el conducto hermafrodita (Fig. 22C: ch) que desemboca en el saco glandular anexo (Fig. 22C: sg); este último descansa en la porción cóncava de la glándula del albumen (Fig. 22C: ga) y se abre paso en su porción anterior; la glándula del albumen se continúa con el espermoviducto (Fig. 22C: eo). Este último es poco visible ya que en esta zona el tegumento pierde su fino espesor y transparencia debido a la localización del fuerte y macizo músculo columelar (Fig. 22C: mc).

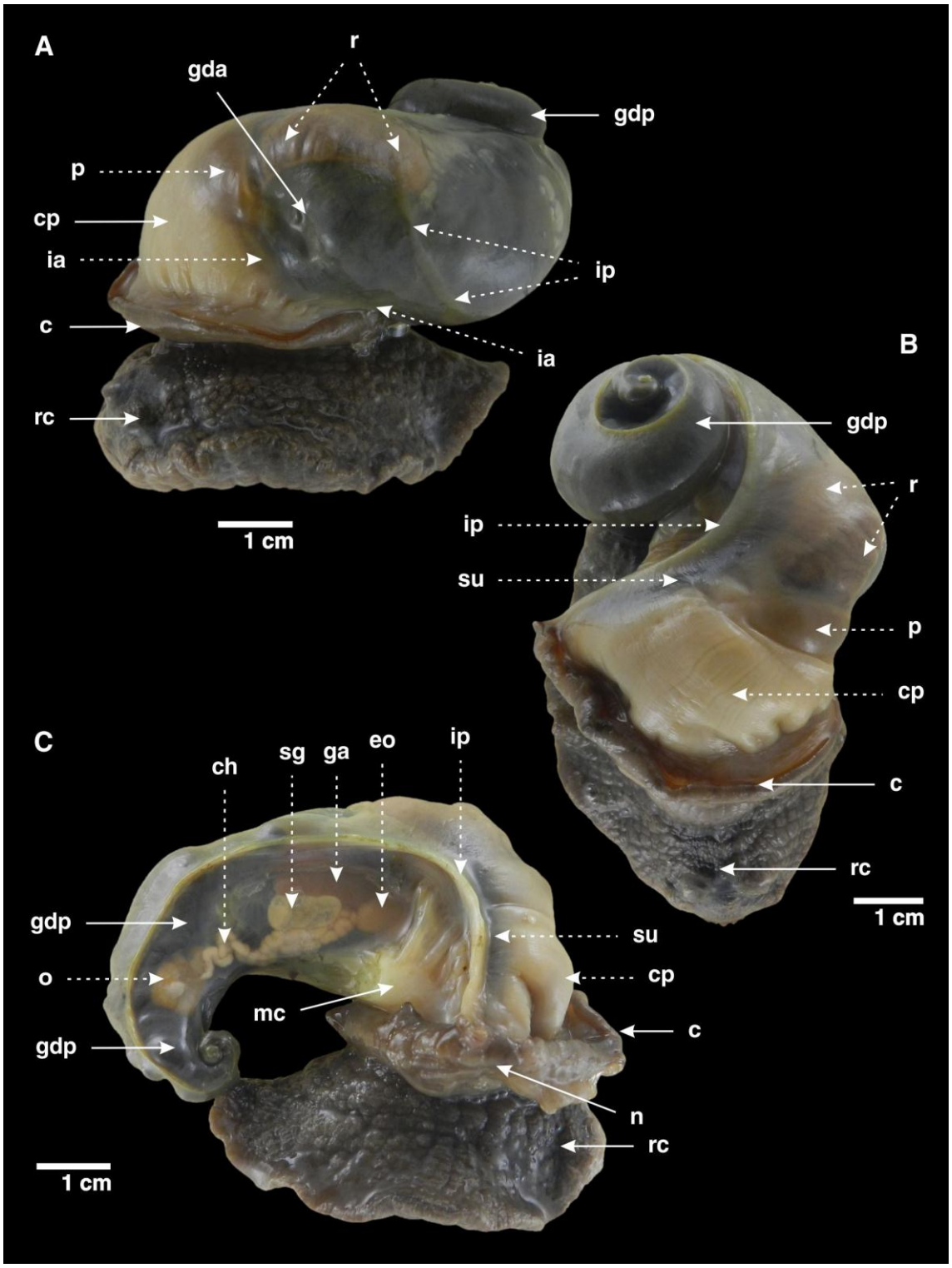

Figura 22. Región visceral de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*. A: vista lateral izquierda; **B**: vista dorsal; **C**: vista lateral derecha con las vueltas corporales de la espira desenrolladas.

c, collar; **cp**, cavidad pulmonar; **ch**, conducto hermafrodita; **eo**, espermoviducto; **ga**, glándula del albumen; **gda**, glándula digestiva anterior; **gdp**, glándula digestiva posterior; **ia**, intestino anterior; **ip**, intestino posterior; **n**, neumostoma; **o**, ovotestis; **p**, pericardio; **r**, riñón; **rc**, región cefálica; **sg**, saco glandular anexo; **su**, surco uretral.

II.3.1.3 Complejo Paleal

Cavidad Pulmonar. Un plegamiento longitudinal de la pared interna forma un tabique suspendido del techo, el tabique pulmonar (Fig. 23A, B: tp); sobre el cual se concentra la porción más vascularizada, constituyéndose en una red de vasos anastomosados, donde los mayores se resuelven en una vena pulmonar que corre por dentro del tabique pulmonar hasta desembocar en la aurícula; una red de vasos accesorios a la vena pulmonar (Fig. 23A, B: vvp) se disponen a cada lado del tabique pulmonar, en su porción anterior y próxima al collar del manto (Fig. 23A: c); en su otro extremo el tabique se prolonga sobre la región reno pericárdica, formando el plexo epirrenal (Fig. 23A: pe). Una segunda red de vasos no anastomosados al tabique pulmonar, los vasos accesorios del pericardio (Fig. 23A: vap), corren paralelos al tabique, con un recorrido sinuoso, parcialmente bifurcados o ramificados, de calibre decreciente a medida que se alejan del tabique pulmonar, y en general menor al de los vasos accesorios de la vena pulmonar (Fig. 23A, B: vvp). Estos últimos vasos y los vasos accesorios del pericardio (Fig. 23A: vap), surgen desde la vena periférica del collar (Fig. 23A, B: vc); pero a diferencia de los vasos accesorios de la vena pulmonar que se anastomosan al tabique pulmonar, los vasos accesorios del pericardio desembocan en la parte posterior, en el vaso satélite del pericardio (Fig. 23A: vsp); dicho vaso, de curso transversal, contornea la región anterior del pericardio (Fig. 23A: p).

Pericardio. La cavidad pericárdica (Fig. 23A: p) es de contorno aproximadamente elíptico, siendo su diámetro mayor el transversal. En anterior se extiende hasta la curva que traza el vaso satélite del pericardio (Fig. 23A: vsp). En posterior descansa sobre la concavidad que forma la cara anterior del riñón (Fig. 23A: r). Por la izquierda alcanza la misma línea que el riñón, mientras que por la derecha determina su límite el tabique pulmonar, que parcialmente lo cubre.

Sistema Renal. Riñón (Fig. 23A: r) alargado, su extensión antero-posterior aproximadamente equivalente a la del tabique pulmonar, en una relación 1:1 (Fig. 23A: tp). En anterior limita con el pericardio; su lado izquierdo es cóncavo y limita íntimamente con el intestino medio intrincado a la glándula digestiva anterior; a su derecha se encuentra el surco uretral (Fig. 23A, B: su) donde el riñón encuentra salida en su tercio anterior por un poro excretor, el nefrostoma (Fig. 23A: nf). El plexo epirrenal (red de vasos del tabique pulmonar que se extienden sobre el riñón; Fig. 23A,

B: pe) se dispone en la superficie ventral del riñón, ocupando una pequeña región, aproximadamente 1/4 de la extensión total del riñón, siendo el restante de su superficie lisa.

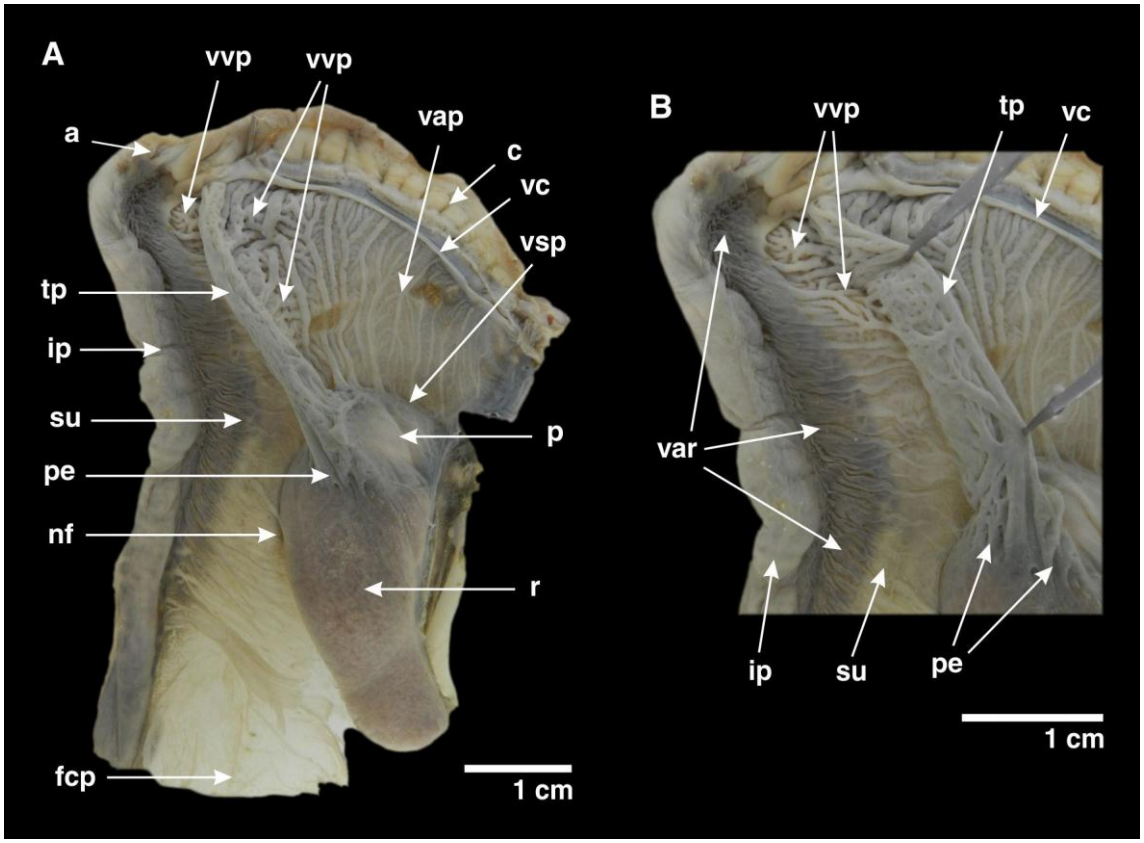

Figura 23. Complejo paleal de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*. A: vista interna del complejo paleal; **B**: detalle de la superficie del surco uretral, traccionado con pinzas al tabique pulmonar.

a, ano; **c**, collar; **fcp**, fondo de la cavidad paleal; **ip**, intestino posterior; **nf**, nefrostomo; **p**, pericardio; **pe**, plexo epirrenal; **r**, riñón; **su**, surco uretral; **tp**, tabique pulmonar; **vap**, vasos accesorios del pericardio; **var**, vasos adrectales; **vc**, vena periférica del collar; **vsp**, vaso satélite del pericardio; **vvp**, vasos accesorios de la vena pulmonar.

Hacia la derecha del tabique pulmonar y la cara convexa del riñón se dispone el surco uretral (Fig. 23A, B: su). Este se extiende desde el fondo de la cavidad paleal (Fig. 23A: fcp), limitando a su derecha en todo su recorrido con el intestino posterior (Fig. 23A, B: ip), hasta alcanzar el collar del manto (Fig. 23A: c); comunicándose con el exterior inmediatamente a la derecha del ano (Fig. 23A: a). El surco uretral presenta vasos adrectales perpendiculares a su eje mayor (Fig. 23B: var); estos inician en la intersección entre el surco uretral y el intestino posterior. En la región anterior del surco uretral, la que flanquea con el tabique pulmonar, los vasos tienen forma de laminillas sinuosas apiladas unas a otras hasta la línea media del surco; los vasos adrectales

próximos al neumostoma se fusionan a los vasos accesorios de la vena pulmonar (Fig. 23A, B: vvp), mientras que hacia la parte posterior los vasos adrectales en forma de laminillas cruzan la mitad izquierda del surco uretral como vasos discretos, algo dendriformes, para desembocar lateralmente en el tabique pulmonar. En la región posterior del surco uretral, la que flanquea con el riñón, los vasos adrectales continúan con el mismo patrón, aunque su intensidad y densidad decrece hasta llegar a la altura del nefrostoma (Fig. 23A: nf); a partir del cual cruzan el surco uretral como vasos de bordes rectilíneos, desapareciendo definitivamente en el último tercio del riñón y hacia el fondo de la cavidad paleal (Fig. 23A: fc).

II.3.1.4 Sistema Digestivo

Descripción de la Morfología Externa

El sistema digestivo se inicia con la boca (Fig. 24A: b), que se abre ventralmente en el extremo cefálico, entre los palpos bucales. Esta se continúa inmediatamente con el **bulbo bucal** (Fig. 24A: bb), que presenta forma oval-elíptica y se extiende hacia la parte posterior de la región cefálica en la línea media; aloja en su porción anterior el arco mandibular y el paladar, este último actúa de techo de la porción anterior del bulbo bucal; su mitad posterior aloja el órgano radular. La región posterior y dorsal del bulbo bucal se continúa con el **esófago**, en él se pueden reconocer tres regiones, *i.e.* anterior (Fig. 24A: ea), medio (o buche) (Fig. 24A: em) y posterior (Fig. 24A: ep). La anterior corre paralela a la línea media de la cavidad cefálica y está recubierta por las glándulas salivales (Fig. 24A: gs); en su conjunto alcanzan el límite posterior de la cavidad cefalopedal. El esófago medio (Fig. 24A: em) se caracteriza por una dilatación abrupta, se sitúa en la cavidad visceral, extendiéndose por debajo del diafragma (piso de la cavidad paleal); el esófago posterior (Fig. 24A: ep) se extiende por la masa visceral hasta desembocar en el estómago (Fig. 24A: es); en su porción distal, recibe el conducto de la glándula digestiva anterior (Fig. 24B: cda, gda). El **estómago** (Fig. 24A: es), de forma oval, es la parte del sistema digestivo que presenta una curvatura de 180°, pasando de tener una dirección dorso-posterior, dada por el esófago, para continuar en una dirección antero-ventral, mediante su continuidad con el intestino. El estómago recibe el conducto de la glándula digestiva posterior (Fig. 24B: cdp, gdp). El **intestino** se divide en tres regiones (Fig. 24A: ia, im, ip). La anterior (Fig. 24A: ia) inicia su recorrido a la izquierda y paralelo al esófago posterior, bordeando ventralmente parte de

la glándula digestiva anterior; su recorrido final es ascendente y culmina en la región renopericárdica. En este punto la válvula prerrectal establece el límite con el intestino medio (Fig. 24A: im), y externamente se percibe como dos bultos con bordes lobulados (Fig. 24A: vp). El intestino medio (Fig. 24A: im) cambia su dirección hacia la parte posterior del animal; su porción descansa, íntimamente asociada a la glándula digestiva anterior, sobre el borde cóncavo izquierdo del complejo renopericárdico. A partir del límite caudal del riñón el intestino se continúa en su porción posterior (Fig. 24A: ip), que inicia su recorrido en forma descendente hacia ventral-posterior, bordeando la glándula digestiva anterior, para luego formar una gran curva (o asa intestinal) (Fig. 24A: ai), culminando esta en el fondo de la cavidad paleal; luego se continúa hacia la parte anterior y derecha del complejo renopericárdico, en todo su trayecto delimita el extremo derecho de la cavidad paleal, finalizando en el ano (Fig. 24A: a).

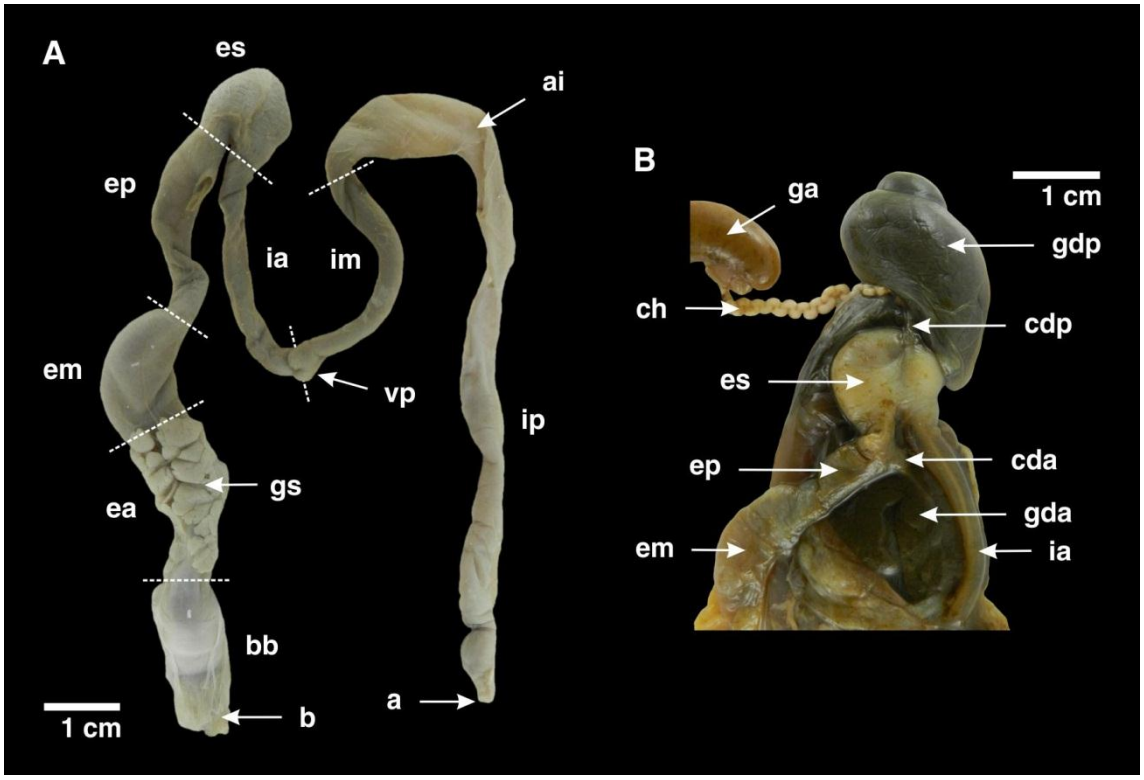

Figura 24. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*, estructura externa. A: vista externa del sistema digestivo completo; **B**: vista externa del esófago medio, posterior, estómago e intestino anterior y su asociación con las glándulas digestivas anterior y posterior. En A las líneas puntuadas delimitan las secciones del sistema digestivo.

a, ano; **ai**, asa intestinal; **b**, boca; **bb**, bulbo bucal; **cda**, conducto de la glándula digestiva anterior; **cdp**, conducto de la glándula digestiva posterior; **ch**, conducto hermafrodita; **ea**, esófago anterior; **em**, esófago medio; **ep**, esófago posterior; **es**, estómago; **ga**, glándula del albumen; **gda**, glándula digestiva anterior; **gdp**, glándula digestiva posterior; **gs**, glándula salival; **ia**, intestino anterior; **im**, intestino medio; **ip**, intestino posterior; **vp**, válvula prerrectal.

Descripción de la Morfología Interna

Mandíbula. Formada por el paladar (Fig. 25: pd) y el arco mandibular (Fig. 25: am; 26C), ambos ventralmente cóncavos; paladar de naturaleza cartilaginosa y forma la bóveda que sostiene el techo de la porción anterior de la cavidad bucal; arco mandibular (Fig. 26C) marrón rojizo oscuro, formado por placas axiales de espesor y distribución irregular. **Rádula**. Forma de cinta, constituida por aproximadamente 112 (± 7) hileras de dientes. Cada hilera se compone de un diente central y aproximadamente 44 (± 3) dientes laterales a cada lado del central, los que disminuyen de tamaño hacia los márgenes. Diente central (Fig. 26A, B: dc) rectangular unicúspide. La cúspide inicia como una proyección de la placa basal en anterior elevándose hacia la zona posterior del diente, rematando en punta roma; el borde anterior de la placa basal descansa sobre el borde posterior de la placa basal del diente contiguo, formando un sistema solapado. Dientes laterales (Fig. 26A, B: dl) similares al central en la forma, excepto en que son de mayor tamaño y el ápice de la cúspide sobrepasa el diente contiguo. **Glándulas salivales** (Fig. 25: gs). Planas y alargadas, su contorno es irregularmente lobulado; en su línea media dorsal la cruza el conducto glandular mayor (Fig. 25: cgs), el que previo a desembocar lateralmente en la región posterior del bulbo bucal, queda desprovisto de la masa glandular; ventralmente ambos lóbulos glandulares están cubiertos por una fina membrana transparente, la cual es fijada a la pared externa del esófago anterior (Fig. 25A, C: ea) por medio de finas trabéculas musculares. **Esófago**. Superficie interna del esófago anterior (Fig. 25A, C: ea) con pequeños pliegues longitudinales, casi imperceptibles, bajos, borde liso, muy separados uno de otro. En la línea de transición entre el esófago anterior y medio (Fig. 25A: ea, em) los pliegues se hacen gruesos, altos, con borde crenulado (Fig. 25A, B: pb) tapizando longitudinalmente toda la superficie del esófago medio o buche (Fig. 25A, B: em), los surcos son anchos y sinuosos. Alcanzada la zona de transición entre el esófago medio y posterior (Fig. 25A: em, ep) los pliegues nuevamente se hacen casi imperceptibles, teniendo la misma apariencia y disposición a lo largo del esófago posterior (Fig. 25A: ep) que la que presentan en el esófago anterior (Fig. 25A, C: ea). El tercio distal del esófago posterior recibe el conducto de la glándula digestiva anterior (Fig. 25A: cda), a partir de este surge el tiflosol esofágico (Fig. 25A: te), el que recorre el trayecto final del esófago posterior para introducirse en el estómago (Fig. 25A: es), en su recorrido aumenta progresivamente de grosor.

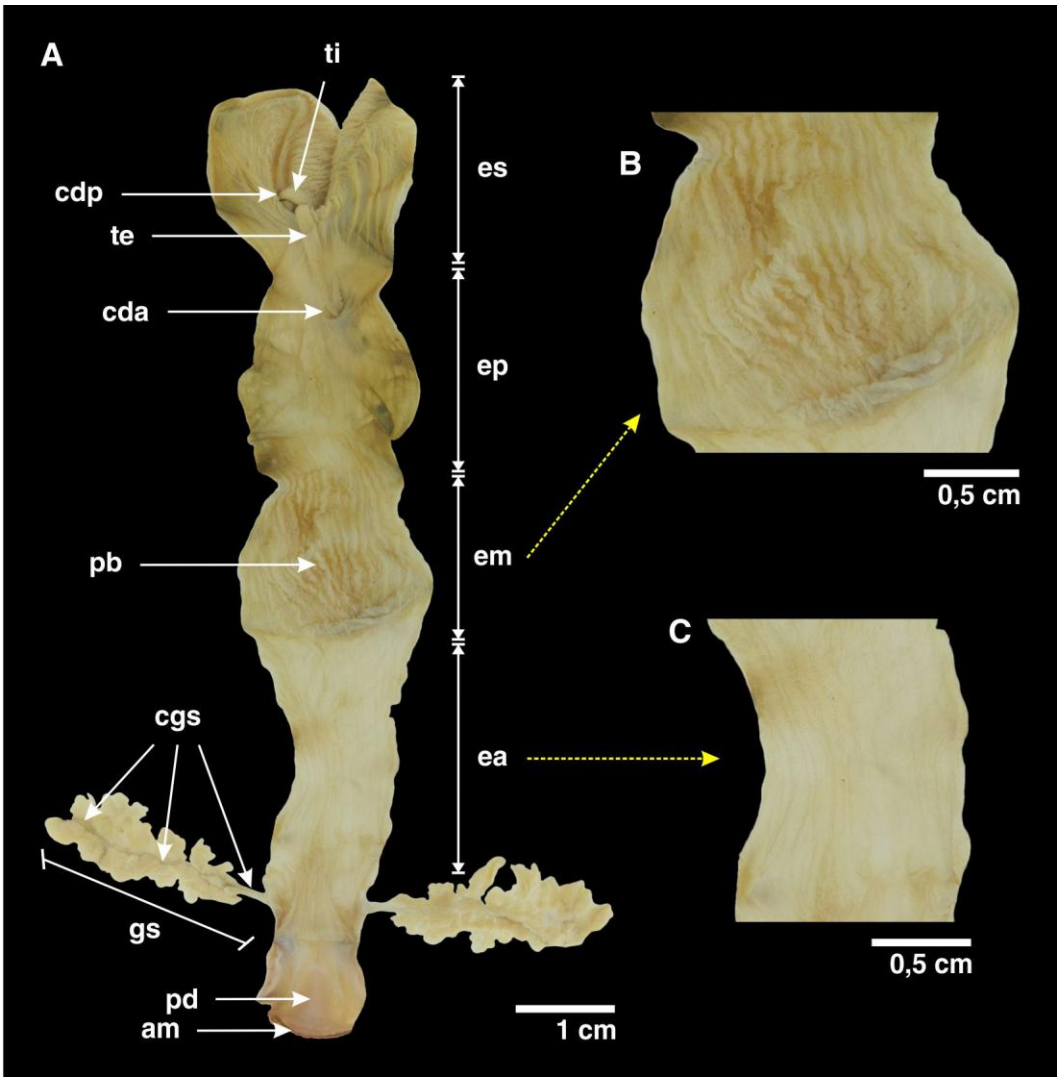

Figura 25. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna del esófago y estómago. A: vista interna del esófago y estómago; **B**: vista ampliada del esófago medio; **C**: vista ampliada del esófago anterior.

am, arco mandibular; **cda**, conducto de la glándula digestiva anterior; **cdp**, conducto de la glándula digestiva posterior; **cgs**, conducto de las glándulas salivares; **ea**, esófago anterior; **em**, esófago medio; **ep**, esófago posterior; **es**, estómago; **gs**, glándula salival; **pb**, pliegues del buche; **pd**, paladar; **te**, tiflosol esofágico; **ti**, tiflosol intestinal.

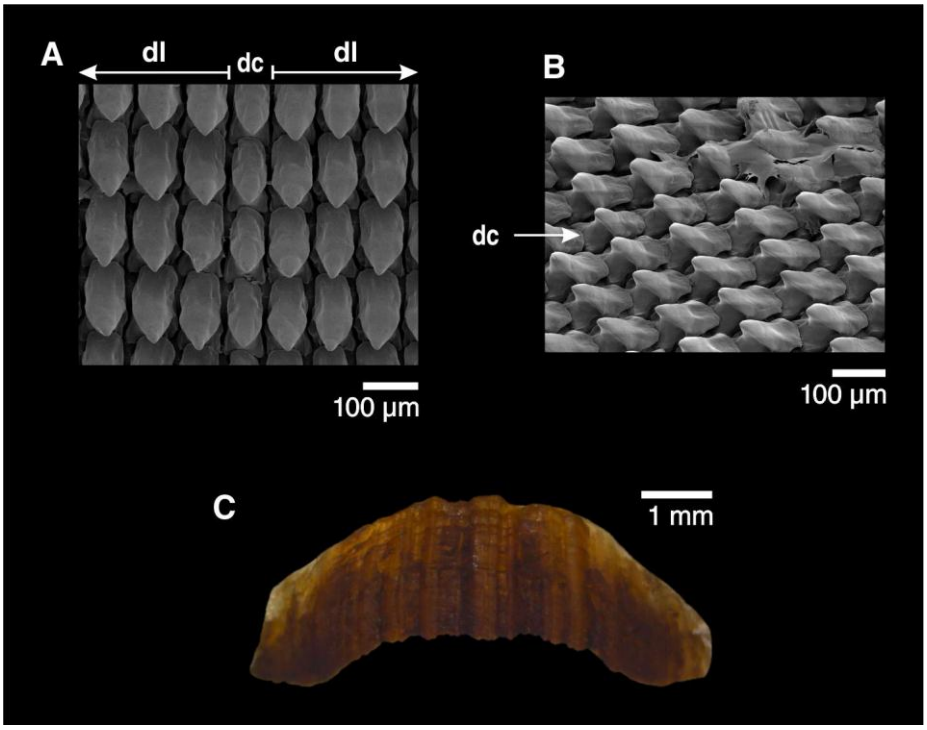

Figura 26. Rádula y arco mandibular de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*. **A**: segmento radular mostrando dientes centrales y laterales; **B**: vista dorsolateral de los dientes centrales y laterales; **C**: vista superior del arco mandibular.

dc, diente central; **dl**, dientes laterales.

Estómago (Fig. 25A, 27A: es). Tapizado por pliegues, los que presentan el mismo trayecto que la curvatura de 180°; siendo los del área del estómago próxima al esófago posterior (Fig. 25A: es, ep) más gruesos, con bordes definidos, separados por surcos profundos y anchos; mientras que los del área próxima al intestino anterior (Fig. 27A: es, ia) son finos, con borde crenulado, y densamente dispuestos sobre la superficie del estómago. El tiflosol esofágico e intestinal convergen en el estómago (Fig. 25A, 27A: te, ti); el primero ingresa desde el esófago, y se continúa sobre la curvatura menor del estómago (Fig. 25A, 27A: te), finalizando inmediatamente antes que el estómago se continúe con el intestino anterior (Fig. 27A: es, ia). El tiflosol intestinal (Fig. 25A, 27A: ti) se inicia en la desembocadura del conducto de la glándula digestiva posterior (Fig. 25A, 27A: cdp), en la región lateral próxima a la curvatura mayor del estómago; a partir de aquí se extiende por el estómago continuándose en el intestino (Fig. 27A, 28A: ti). **Intestino**. El intestino anterior (Fig. 27A: ia) finaliza en la válvula prerrectal (Fig. 27A, 28B: ti, vp), la que marca el fin de este y el inicio del intestino medio (Fig. 27A: im). El tiflosol intestinal (Fig. 28A, B: ti) es alto, ancho, bilobulado a causa de un surco

profundo longitudinal en su ápice, su trayectoria es ondulante y culmina poco antes de llegar a la válvula prerrectal (Fig. 28A, B: ti, vp); paralelos al tiflosol intestinal hacen el mismo trayecto numerosos y diversos pliegues del intestino prevalvular (Fig. 28A: p1 - p5), los que se caracterizan a continuación: i- un pliegue alto, fino, con surcos oblicuos, paralelo e inmediato al tiflosol (Fig. 28A, B: p1); ii- un pliegue alto, ancho (el doble que el tiflosol), con crestas transversales intercaladas por surcos finos y poco profundos (Fig. 28A, B: p2); iii- pliegues bajos, finos, lisos y de trayecto sinuoso (Fig. 28A, B: p3); iv- un pliegue alto, ancho (equivalente al tiflosol), con superficie irregular dada por surcos transversales incompletos pero profundos, de trayecto lineal (Fig. 27A, 28A, B: p4); v- pliegues bajos, finos y lisos, con trayectoria sinuosa, algunos de los cuales se anastomosan entre sí (Fig. 28A, B: p5). El fin del intestino anterior lo marca la válvula prerrectal (Fig. 28B: vp); poco antes de alcanzarla el tiflosol intestinal, y los pliegues p1 y p2 (Fig. 28B: ti, p1, p2) finalizan su recorrido sobre el intestino anterior sin alterar sus características; solamente los pliegues p3, p4 y p5 (Fig. 28B: p3, p4, p5) se continúan hasta el borde lobulado de la válvula prerrectal manteniendo sus características. El intestino medio (Fig. 27A, B: im) presenta dos tipos de pliegues, *i.e.* pliegues del intestino posvalvular (Fig. 27, 28B: p6 - p7). Un único pliegue recorre longitudinalmente al intestino medio (Fig. 27, 28B: p6), surge desde la válvula prerrectal (Fig. 27A, 28B: vp) y como continuación del pliegue p4 del intestino anterior (Fig. 28B); p6 presenta las mismas características que p4, con la salvedad de ser algo más fino; hacia p6 convergen pliegues bajos, finos, lisos y de trayectoria oblicua que toman disposición de V (Fig. 27, 28B: p7). El intestino posterior (Fig. 27B: ip), en su primer tramo, se continúa con el mismo patrón de pliegues que el intestino medio (Fig. 27B: p6 y p7), aunque estos van perdiendo definición a medida que se alejan de la zona de intersección entre el intestino medio y posterior; el resto de la superficie del intestino posterior presenta un pliegue longitudinal (Fig. 27B: p8) y numerosos pliegues parcialmente oblicuos (Fig. 27B: p9); p8 y p9 son pliegues bajos, de trayecto sinuoso y borde crenulado, lo que hace a los surcos poco definidos. El último tramo del intestino posterior corresponde al recto (Fig. 27B: rt), en el cual los pliegues p8 y p9 se fusionan para constituirse en 5 a 7 pliegues del recto (Fig. 27B: p10); estos son muy altos, gruesos, bordes lisos y bien definidos, con surcos profundos.

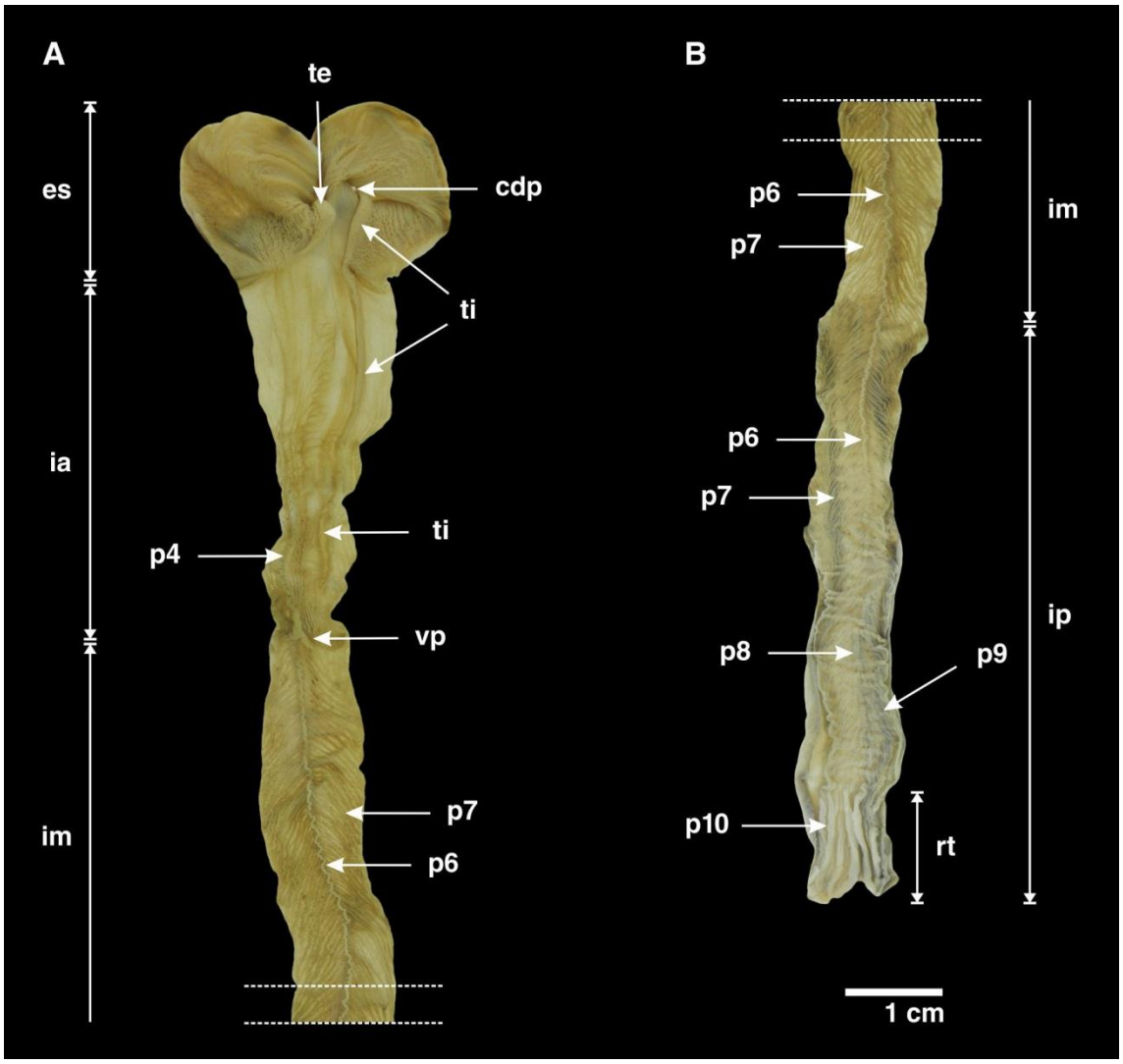

Figura 27. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna del estómago e intestino. A: vista interna del estómago, intestino anterior y primera porción del intestino medio; **B**: vista interna de la porción terminal del intestino medio e intestino posterior. La región del intestino medio comprendida entre las líneas punteadas de A y B indica la misma zona anatómica.

cdp, conducto de la glándula digestiva posterior; **es**, estómago; **ia**, intestino anterior; **im**, intestino medio; **ip**, intestino posterior; **p4**, pliegue del intestino prevalvular; **p6 - p7**, pliegues del intestino posvalvular; **p8 - p9**, pliegues del intestino preanales; **p10**, pliegues del ano; **rt**, recto; **te**, tiflosol esofágico; **ti**, tiflosol intestinal; **vp**, válvula prerrectal.

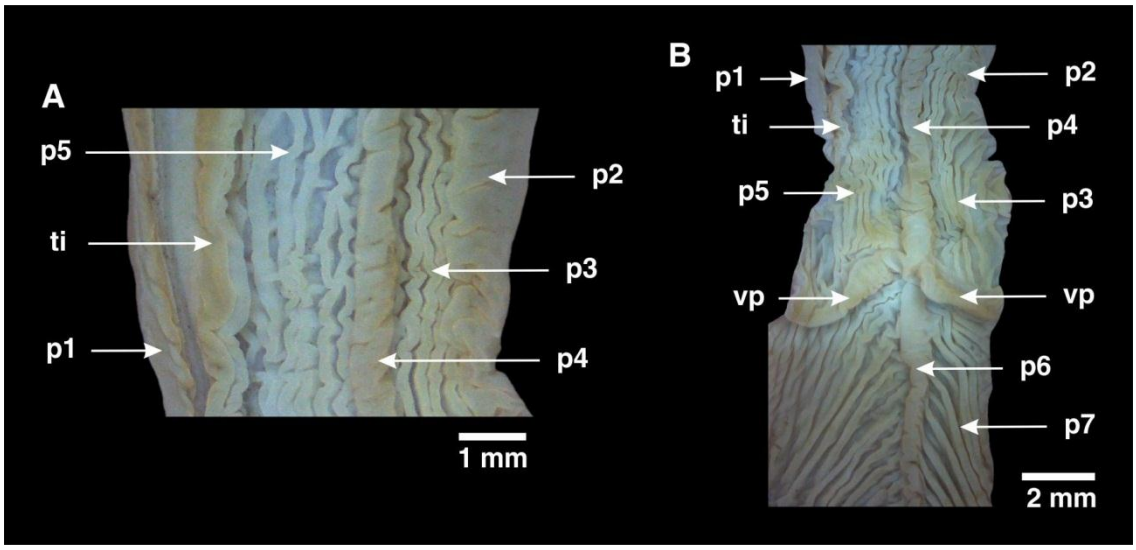

Figura 28. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna de la válvula prerrectal y pliegues intestinales pre y pos valvulares. A: vista interna de la porción del intestino anterior previo a la zona de la válvula prerrectal, se muestra en detalle los pliegues del intestino prevalvular; **B**: vista interna de la válvula prerrectal y de sus pliegues prevalvular y posvalvular.

pl - p5, pliegues del intestino prevalvular; **p6 - p7**, pliegues del intestino posvalvular; **ti**, tiflosol intestinal; **vp**, válvula prerrectal.

II.3.1.5 Sistema Reproductor

Descripción de la Morfología Externa

El sistema reproductor tiene salida al exterior del animal a través del gonoporo (Fig. 21A: g), desde este el sistema reproductor se bifurca. Por un lado, la **vagina** y la porción anterior del **oviducto** (Fig. 29A: v, ov) se sitúan en la cavidad cefalopedal, lateralmente y a la derecha del bulbo bucal y esófago anterior; el **oviducto** posterior y la porción anterior del **espermoviducto** (Fig. 29A, B: ov, eo), hasta donde finaliza el conducto de la **bolsa espermática** (Fig. 29B: cbe), se apoyan dorso-lateralmente y a la derecha del esófago medio, por debajo del diafragma (o piso de la cavidad paleal); la porción posterior del **espermoviducto**, la **bolsa espermática** y la **glándula del albumen** (Fig. 29B: eo, be, ga) descansan sobre el esófago posterior; el **conducto hermafrodita** (Fig. 29A: ch) cruza sobre el estómago y lo supera hasta alcanzar la porción final de la glándula digestiva posterior donde se inserta en el **ovotestis** (Fig. 29A: o). La segunda bifurcación del sistema reproductor la constituyen el **pene** y el **epífalo** (Fig. 29A, B: pn, ef), estos se ubican en la cavidad cefalopedal a la derecha del

bulbo bucal; la zona acodada de intersección entre el pene y el epífalo se tuerce hacia la línea media de la cavidad cefalopedal, apoyándose sobre el límite del bulbo bucal y el esófago anterior; el **músculo retractor del pene** (Fig. 29A, B: mr) cruza hacia la izquierda del sistema digestivo e inserta en el diafragma.

El **ovotestis** (Fig. 29A: o) es racimoso y de forma lobulada; el **conducto hermafrodita** (Fig. 29A: ch) en su inicio angosto y de trayectoria lineal, dilatándose hacia adelante y plegándose un gran número de veces describiendo zigzags cortos; antes de su inserción en el lateral de la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca (Fig. 29B, 30A, ch, bfce) nuevamente retoma su estructura angosta y trayectoria lineal. La bolsa de fertilización-complejo de la espermateca es una pequeña evaginación del cuello del **saco glandular anexo** (Fig. 29A, B, 30A: bfce, sg), el que se inserta en la región anterior ventral de la glándula del albumen (Fig. 29A, B: ga). Esta última es reniforme, compacta y homogénea; su extremo anterior se continúa, junto con la cámara del albumen (Fig. 29B: ca), en el **espermoviducto** (Fig. 29B: eo). Este último es cilíndrico, ligeramente curvado; en él se reconocen dos estructuras: el útero (Fig. 29A: u), que corresponde a la porción tubular más voluminosa, y la próstata (Fig. 29A: pt) que se asocia íntimamente en la porción dorso-lateral izquierda del útero, distinguiéndose de este por tener superficie lobulada con surcos transversales y contorno parcialmente lobulado. El espermoviducto en anterior se continúa con el **oviducto** (Fig. 29A: ov); la separación de ambos externamente la marca el inicio del **conducto deferente** (Fig. 29A: cd). El **oviducto** es cilíndrico y liso; en su extremo posterior se encuentra el **saco anexo del oviducto** (Fig. 29A: so), este surge como una evaginación cilíndrica de extremo redondeado, cuya extensión es aproximadamente 1/3 a 1/4 de la del oviducto. Este último se continúa con la **vagina** (Fig. 29A: v), la que es del mismo diámetro y de extensión equivalente (en una relación de 1:1); en posterior desemboca en el **poro genital** (Fig. 29A: pg). El límite externo entre el oviducto y la vagina lo marca el inicio del **conducto de la bolsa espermática** (Fig. 29A, B: cbe) que remata en una pequeña vesícula piriforme, la **bolsa espermática** (Fig. 29B: be).

El **conducto deferente** (Fig. 29A, B: cd) es cilíndrico y de diámetro uniforme; inicia su recorrido entre el espermoviducto y el oviducto (Fig. 29A: cd), constituyéndose en este punto en la continuación exterior del surco seminal interno del

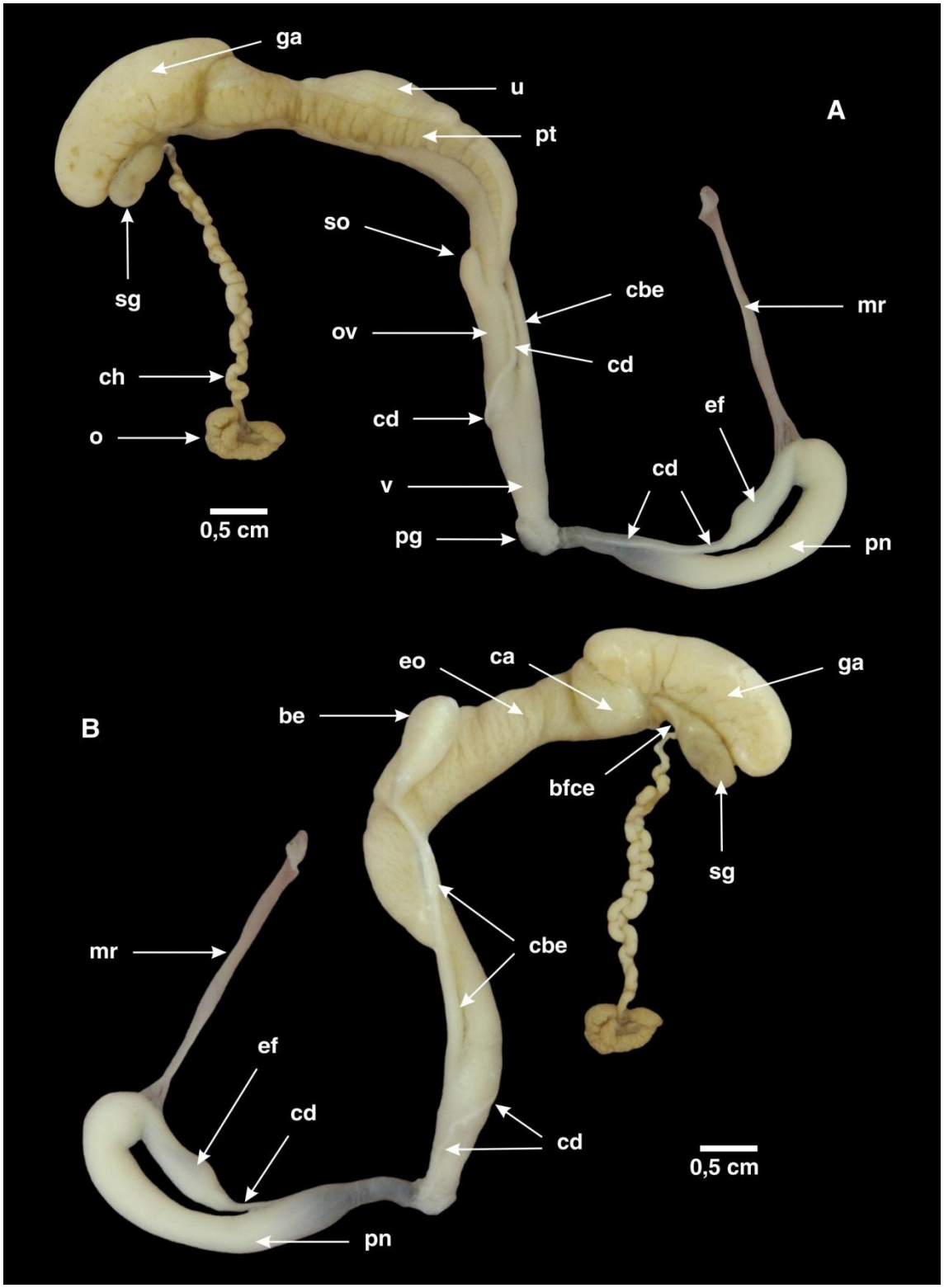

Figura 29. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*, estructura externa. A: vista externa izquierda; **B**: vista externa derecha.

be, bolsa espermática; **bfce**, bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **ca**, cámara del albumen; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **ch**, conducto hermafrodita; **ef**, epífalo; **eo**, espermoviducto; **ga**, glándula del albumen; **mr**, músculo retractor del pene; **o**, ovotestis; **ov**, oviducto; **pg**, poro genital; **pn**, pene; **pt**, próstata; **sg**, saco glandular anexo; **so**, saco anexo del oviducto; **u**, útero; **v**, vagina.

espermoviducto (ver descripción de la morfología interna más adelante); luego corre adherido paralelamente a la superficie externa del oviducto (Fig. 29A: cd); previo a terminar su recorrido sobre el oviducto cambia su trayectoria de lineal a espiral, extendiéndose desde el extremo anterior del oviducto (Fig. 29A: cd) y sobre la vagina (Fig. 29B: cd) en forma espiral descendente hasta alcanzar el extremo más anterior de la vagina; en este punto bordea la zona de confluencia entre la vagina y el pene, para continuarse sobre la porción anterior de este último, hasta desembocar en el extremo del epífalo (Fig. 29A, B, 30B: cd, ef). El **epífalo** (Fig. 29A, B: ef), más delgado y corto que el pene, se apoya sobre la porción cóncava del mismo; en su inserción con el conducto deferente no presenta apéndice o flagelo (Fig. 30B); se continúa en su extremo posterior con el **pene** (Fig. 29A, B: pn). Este último, es ligeramente curvo y de diámetro constante excepto en el último tramo que se hace más fino antes de alcanzar el poro genital (Fig. 29A: pg). En la zona donde el epífalo se continúa con el pene se inserta el **músculo retractor del pene** (Fig. 29A, B: mr), 1/3 sobre la región del pene y 2/3 sobre el epífalo.

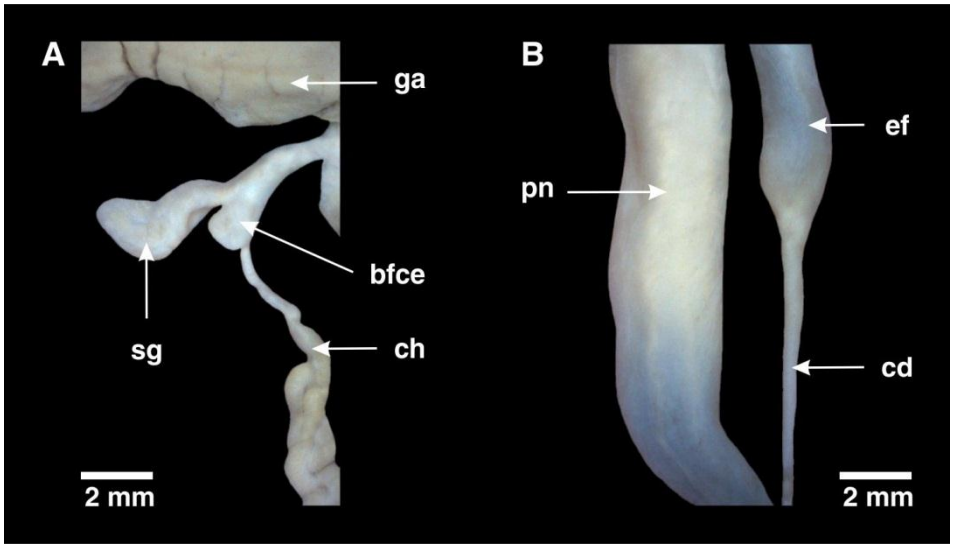

Figura 30. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; saco glandular anexo y epífalo. A: vista externa del saco glandular anexo, se muestra en detalle la inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **B**: vista externa parcial del pene y epífalo, se muestra en detalle la inserción del conducto deferente en el epífalo.

bfce, bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **cd**, conducto deferente; **ch**, conducto hermafrodita; **ef**, epífalo; **ga**, glándula del albumen; **pn**, pene; **sg**, saco glandular anexo.

Descripción de la Morfología Interna

Espermoviducto. El **útero** forma una amplia cámara cilíndrica, con dos regiones en su superficie interna. La mayor corresponde al útero propiamente dicho (Fig. 31A, B: u) y la más angosta a la sección de este donde externamente se asienta la próstata (Fig. 31A, B: pt). Los pliegues del útero inician en el borde de la **glándula genital accesoria** (Fig. 31A, B: gga) de forma perpendicular; en su corto tramo son altos, de borde liso y redondeado (Fig. 31B: plu), apreciándose finos surcos entre ellos. Inmediatamente estos pliegues se orientan hacia la parte posterior del espermoviducto modificando su estructura lisa a zigzags (Fig. 31B: pmu), quedando tan solapados entre sí que no se distinguen a simple vista los surcos que separan un pliegue del otro. En anterior, los pliegues que no se inician en el borde de la glándula genital accesoria, surgen como continuación de los del oviducto (Fig. 31A: ov), y presentan la misma características antes dadas (Fig. 31B: plu, pmu). La superficie menor del útero, sobre la que corre longitudinalmente la próstata en el exterior, presenta pliegues transversales (Fig. 31B: ptu), finos y muy encimados, percibiéndose solo una fina línea de separación entre uno y otro. La **glándula prostática** presenta el surco interno de la próstata (Fig. 31A: sipt) que discurre longitudinalmente a lo largo de la glándula; sobre este surco descansa la glándula genital accesoria (Fig. 31A: gga); debido a que esta última glándula se pliega a la mitad por medio de un surco de plegamiento (Fig. 31B: sga), es su cara externa la que apoya sobre el surco interno de la próstata. Esta disposición hace que los extremos libres de la glándula prostática (Fig. 31A: bss1) y la glándula genital accesoria (Fig. 31A: bss2) queden hacia el mismo lado e interno al espermoviducto. En este punto ambos extremos libres se enrollan entre sí, conformando el cierre longitudinal del espermoviducto y constituyéndose en el surco seminal, el que luego se continúa por fuera como conducto deferente (Fig. 31A: cd).

El **oviducto** (Fig. 31A: ov) presenta en su mitad posterior pliegues (Fig. 31C: pov) anchos, altos y lisos, intercalados con pliegues finos, bajos y lisos; entre ambos tipos de pliegues los surcos son muy angostos. Los pliegues de la mitad anterior del oviducto (Fig. 31C: pov) y la mitad posterior de la **vagina** (Fig. 31C: pv) conforman una zona de transición en torno a la abertura del conducto de la bolsa espermática (Fig. 31A, C: acb); los pliegues en esta región se distribuyen irregularmente con amplios surcos, formando una red parcialmente anastomosada; este patrón solo alcanza la base del

conducto de la bolsa espermática (Fig. 31A, C: cbe). Los pliegues de la porción anterior de la vagina (Fig. 31C: pv) alcanzan el borde del poro genital femenino (Fig. 31C: pgf), éstos presentan las mismas características que los descriptos para la mitad posterior del oviducto, al igual que el saco anexo del oviducto (Fig. 31A: so, 31C: pso). Los pliegues del conducto de la bolsa espermática (Fig. 31C: pcbe) son longitudinales, finos, de borde liso, paralelos, con surcos angostos y bien definidos; disminuyen proporcionalmente sus dimensiones y pierden definición a medida que el conducto se acerca a la base de la **bolsa espermática** (Fig. 31A, C: be); en esta solo se continúan en su primer mitad algunos de los pliegues del conducto (Fig. 31C: pbe), haciéndose gruesos y bajos, siendo el resto de la superficie de la bolsa totalmente lisa.

El **epífalo** (Fig. 32A, B: ef) presenta un pliegue muy grueso y alto en forma de Y (Fig. 32A, B: py); este inicia como un único pliegue a continuación del conducto deferente (Fig. 32A, B: cd); en los 2/3 de su recorrido hacia la inserción del epífalo con el pene (Fig. 32A: ef, pn) se divide en dos pliegues paralelos de menor calibre, separados por un surco angosto y profundo. El **pene** (Fig. 32A: pn) presenta pliegues longitudinales (Fig. 32A: plp) irregulares, anchos, altos, con surcos tapizados con una granulación muy densa y conspicua; estos pliegues no alcanzan la región del pene próxima al epífalo, la superficie de esta zona presenta una granulación fina y densa; además en la línea del orificio que comunica al epífalo con el pene se encuentra un pliegue pequeño, corto y alto (Fig. 32A, B: ptp), el cual es más fino que los pliegues longitudinales del pene (Fig. 32A: plp) y se encuentra aislado de estos. En el extremo del pene próximo al poro genital (Fig. 32A: pgm) los pliegues longitudinales del pene (Fig. 32A: plp) presentan cierto grado de dicotomía, haciéndose lisos y más bajos en su trayecto final, hasta desaparecer por completo en la superficie del último tramo del pene previo al poro genital (Fig. 32A: pgm).

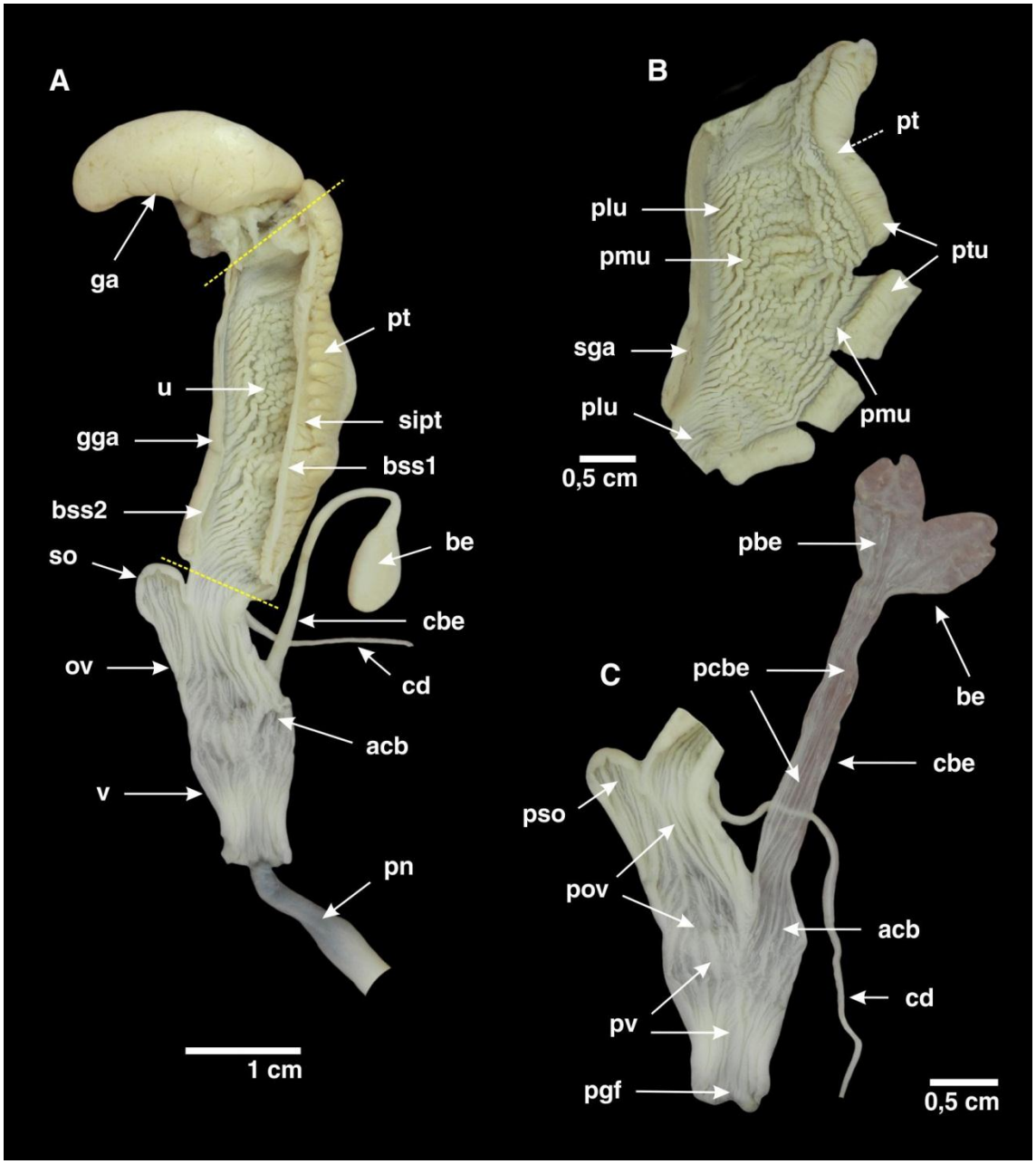

Figura 31. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna del espermoviducto y porción femenina. A: vista interna del espermoviducto (parcial), oviducto y vagina; **B**: vista interna de la superficie completa del espermoviducto; **C**: vista interna del oviducto, vagina, bolsa espermática y su conducto homónimo. Líneas punteadas amarillas en A indica la región del espermoviducto que se muestra en B; flecha punteada en B indica una estructura no visible en la imagen, pero que se encuentra inmediatamente en dorsal.

acb, abertura del conducto de la bolsa espermática; **be**, bolsa espermática; **bss1**, borde del surco seminal; **bss2**, borde del surco seminal; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **ga**, glándula del albumen; **gga**, glándula genital accesorio; **ov**, oviducto; **pbe**, pliegues de la bolsa espermática; **pcbe**, pliegues del conducto de la bolsa espermática; **pgf**, poro genital femenino; **plu**, pliegues lisos del útero; **pmu**, pliegues membranosos del útero; **pn**, pene; **pov**, pliegues del oviducto; **pso**, pliegues del saco anexo del oviducto; **pt**, próstata; **ptu**, pliegues transversales del útero; **pv**, pliegues vaginales; **sga**, surco de plegamiento de la glándula genital accesoria; **sipt**, surco interno de la próstata; **so**, saco anexo del oviducto; **u**, útero; **v**, vagina.

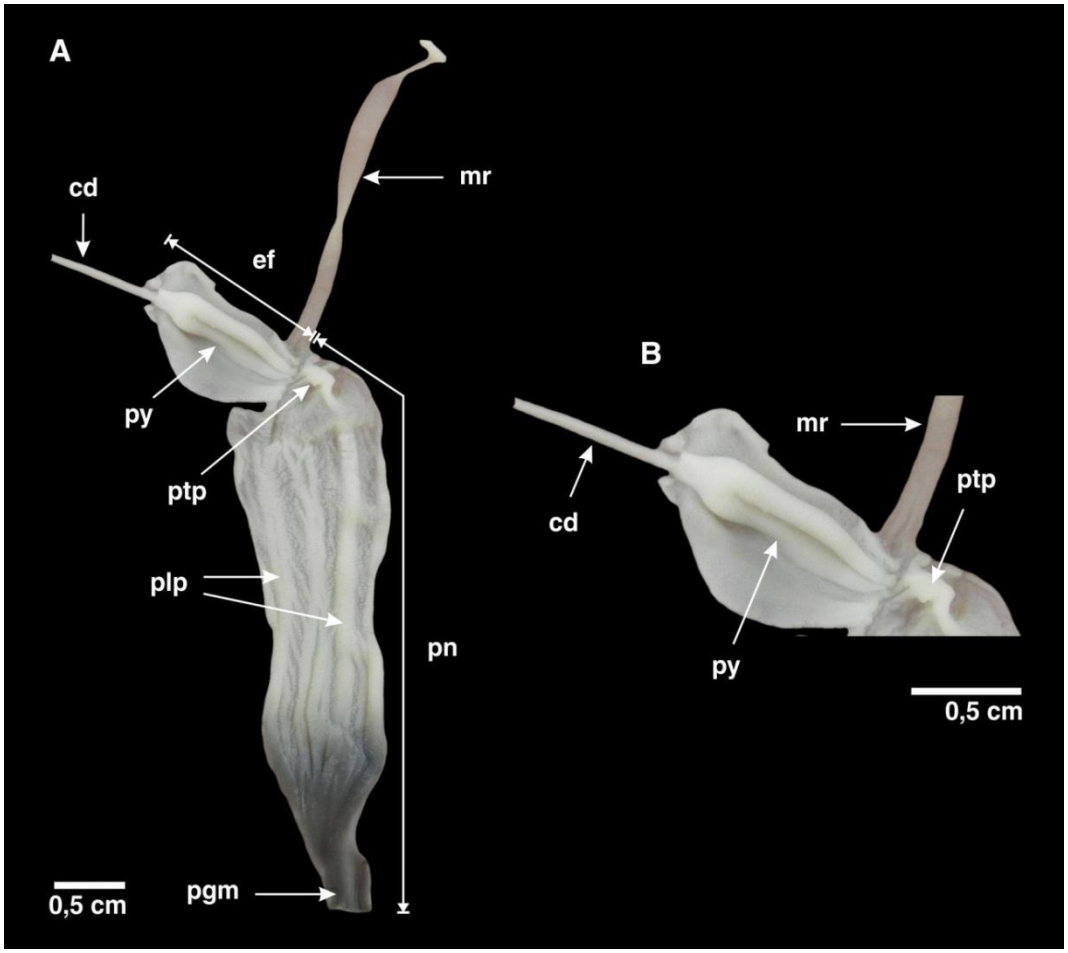

Figura 32. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus lorentzianus*; estructura interna de la porción masculina. A: vista interna del pene y epífalo; **B**: vista interna ampliada del epífalo.

cd, conducto deferente; **ef**, epífalo; **mr**, músculo retractor del pene; **pgm**, poro genital masculino; **plp**, pliegues longitudinales del pene; **pn**, pene; **ptp**, pliegue transversal del pene; **py**, pliegue en Y del epífalo.

II.3.2 *Megalobulimus oblongus musculus*

II.3.2.1 Principales Caracteres Diagnósticos

Concha: longitud total 68,82 mm (±4,96), ancho en vista frontal 39,88 mm (±3,20) y número de vueltas 5,60 (±0,12). De estar presente el periostraco marrón verdoso, con franjas más oscuras paralelas al eje mayor; internamente marrón pálido; banda subsutural clara, fina (no mayor a 2 mm). Última vuelta oval-alargada de contorno convexo. Tercera vuelta de la protoconcha con microgranulación fina dispuesta en espiral. Partes blandas: animal de color gris claro uniforme. Vasos adrectales se extienden hasta el ápice del riñón. Pliegue intestinal p4 tres a cuatro veces

más ancho que el tiflosol intestinal. Oviducto con pliegues anchos, altos y lisos. Mitad posterior de la vagina con pliegues finos, bajos y de borde fuertemente crenulado.

II.3.2.2 Morfología del Animal Vivo y Masa Visceral

Arquitectura del tegumento, borde del manto, pie y región cefálica (incluyendo tentáculos, boca y palpos bucales) semejantes a *M. o. lorentzianus* (Fig. 33A: plb, teg; B: bp; C: b, m, plb, tro, trs). También comparte con esta última la distribución uniforme de la pigmentación en toda la región cefalopedal; pero se diferencia en que todos los individuos analizados muestran un color gris claro. Posición del gonoporo (Fig. 33B: g), neumostoma y ano equivalente a la especie antes descripta. La hipertrofia del borde del manto, como la ausencia de formación de epifragma pudo ser constatada en esta entidad.

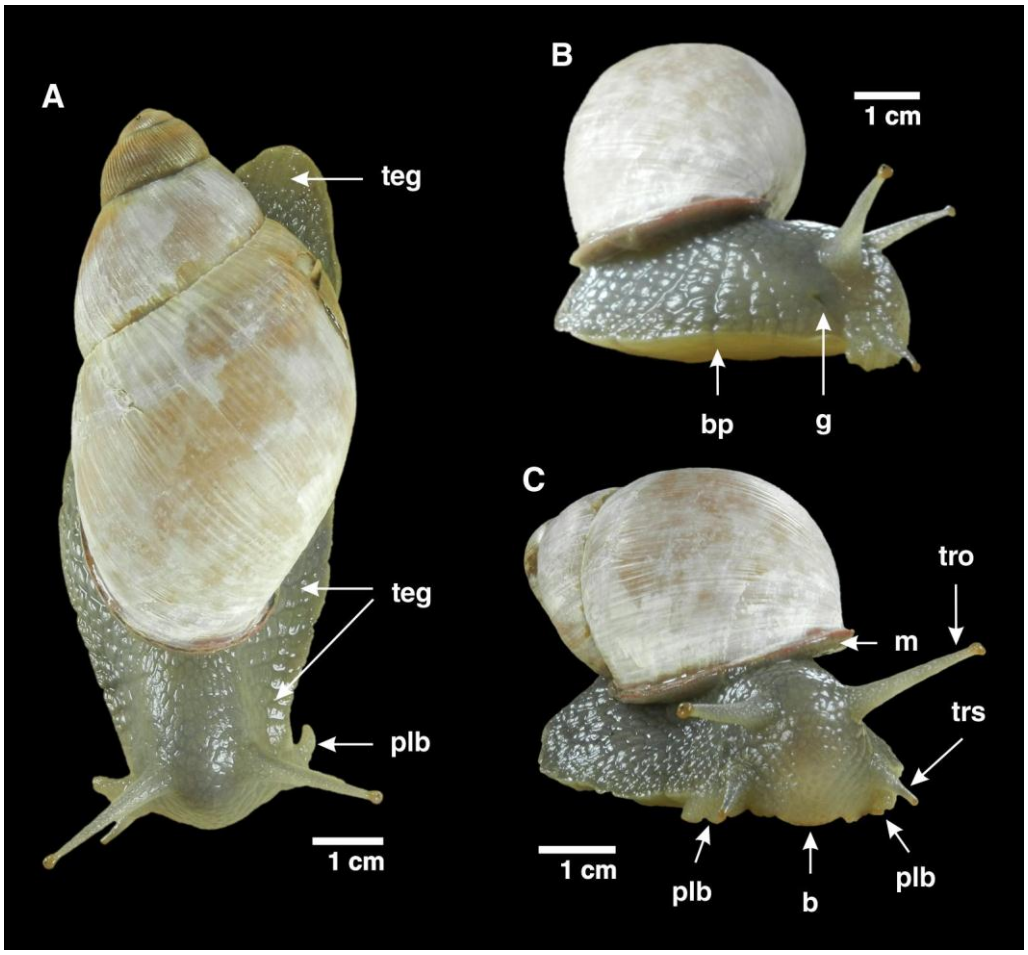

Figura 33. Animal vivo adulto de *Megalobulimus oblongus musculus*. A: vista dorsal; **B**: vista lateral derecha; **C**: vista frontal.

b, boca; **bp**, base del pie; **g**, gonoporo; **m**, manto; **plb**, palpo bucal; **teg**, tegumento; **tro**, tentáculo retráctil portador del omatóforo; **trs**, tentáculo retráctil sensorial.

Con la remoción de la concha, las estructuras observables (*e.g.* cavidad pulmonar, pericardio, riñón, glándula digestiva anterior y posterior, intestino, surco uretral, sistema reproductor, músculo columelar) y su disposición en el contexto de la masa visceral es equivalente a *M. o. lorentzianus*.

II.3.2.3 Complejo Paleal

En general, la arquitectura y disposición de la cavidad pulmonar, pericardio y sistema renal es semejante a la especie antes descripta.

Cavidad Pulmonar. El tabique pulmonar, vasos accesorios a la vena pulmonar, vena periférica del collar y vaso satélite del pericardio (Fig. 34: tp, vvp, vc, vsp, respectivamente) semejantes a los de la entidades antes descripta. Sin embargo, y comparativamente, los vasos accesorios del pericardio (Fig. 34: vap) tienen un recorrido más bien rectilíneo, las ramificaciones secundarias son numerosas, de trayecto corto, con calibre constante a medida que se alejan del tabique pulmonar, y mucho menor al de los vasos accesorios de la vena pulmonar.

Pericardio. Características de la cavidad pericárdica (Fig. 34: p) similares a la descriptas anteriormente para *M. o. lorentzianus*.

Sistema Renal. Riñón (Fig. 34: r) triangular, extensión antero-posterior del riñón algo menor a la del tabique pulmonar (Fig. 34: tp); el plexo epirrenal cubre aproximadamente la mitad de la longitud total del riñón (Fig. 34: pe). La disposición del surco uretral (Fig. 34: su), las estructuras que lo delimitan (*i.e.* tabique pulmonar, riñón, intestino posterior; Fig. 34: tp, r, ip, respectivamente) y su trayecto (*i.e.* Fig. 34: fcp, a, respectivamente) es concordante con la descripción dada para *M. o. lorentzianus*. Los vasos adrectales (Fig. 34: var) comparten también parte de las características descriptas anteriormente para esta entidad; excepto que los vasos adrectales perpendiculares al tabique pulmonar (Fig. 34: tp) y que alcanzan hasta posterior el nefrostoma (Fig. 34: nf) están bien definidos, fuertemente entramados y su aspecto es muy semejante a los vasos accesorios del pericardio (Fig. 34: vap); mientras que los vasos adrectales posteriores al nefrostoma, también de contorno bien definido, se extienden hasta alcanzar el ápice del riñón, incluso en algunos especímenes lo supera y se extienden por el fondo de la cavidad paleal (Fig. 34: fcp).

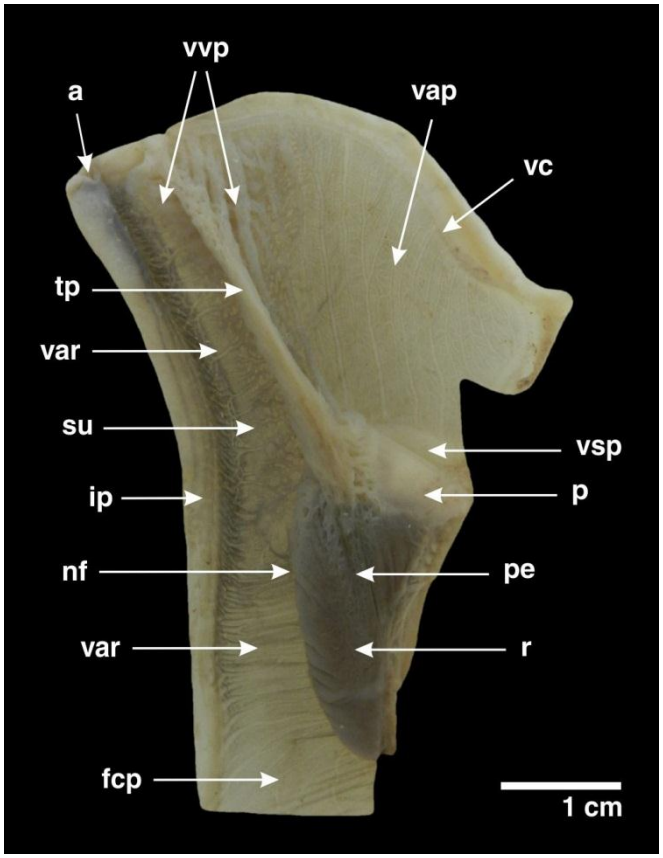

Figura 34. Complejo paleal de *Megalobulimus oblongus musculus*. Vista interna del complejo paleal.

a, ano; **fcp**, fondo de la cavidad paleal; **ip**, intestino posterior; **nf**, nefrostoma; **p**, pericardio; **pe**, plexo epirrenal; **r**, riñón; **su**, surco uretral; **tp**, tabique pulmonar; **vap**, vasos accesorios del pericardio; **var**, vasos adrectales; **vc**, vena periférica del collar; **vsp**, vaso satélite del pericardio; **vvp**, vasos accesorios de la vena pulmonar.

II.3.2.4 Sistema Digestivo

Descripción de la Morfología Externa

Disposición y características semejantes a las dadas para *M. o. lorentzianus*.

Descripción de la Morfología Interna

Mandíbula. Arco mandibular (Fig. 35C) marrón claro, formado por placas axiales finas y de distribución regular. **Rádula**. Constituida por aproximadamente 99 (± 2) hileras de dientes. Cada hilera se compone de un diente central y aproximadamente 37 (± 1) dientes laterales a cada lado del central (Fig. 35A, B: dc, dl). El resto de las características de la rádula, mandíbula, **glándulas salivales**, **esófago** (anterior, medio y

posterior) y **estómago** similares a *M. o. lorentzianus*; de igual manera sucede con el intestino medio y posterior, no así con el intestino anterior y la válvula prerrectal, a saber: tiflosol intestinal (Fig. 36A,: ti) alto, fino, de trayectoria ondulante; de los pliegues del intestino prevalvular (Fig. 36A: p1 - p5) p1 es bajo, ancho (3 a 4 veces el ancho del tiflosol) y liso (Fig. 36A: p1); p2 es bajo, ancho (2 a 3 veces el ancho del tiflosol), con crestas transversales bien definidas e intercaladas por surcos profundos (Fig. 36A: p2); p4 es alto, ancho (3 a 4 veces el ancho del tiflosol), con superficie irregularmente multilobulada por causa de surcos longitudinales sinuosos cortos y profundos (Fig. 36A: p4). Poco antes de alcanzar la válvula prerrectal (Fig. 36B: vp) el tiflosol intestinal, los pliegues p1 y p2 finalizan su recorrido sobre el intestino anterior (Fig. 36B: ti, p1, p2) y, los pliegues p3, p4 y p5 se continúan hasta el borde lobulado de la válvula prerrectal (Fig. 36B: p3, p4, p5); comparte con *M. o. lorentzianus* que todos los pliegues mantienen sus características cuando alcanzan la región del intestino anterior prevalvular (Fig. 36A *vs.* B: p1 - p5), excepto que los pliegues p3 y p5 sobre la región de la válvula prerrectal se anastomosan entre sí (Fig. 36B: p3, p5).

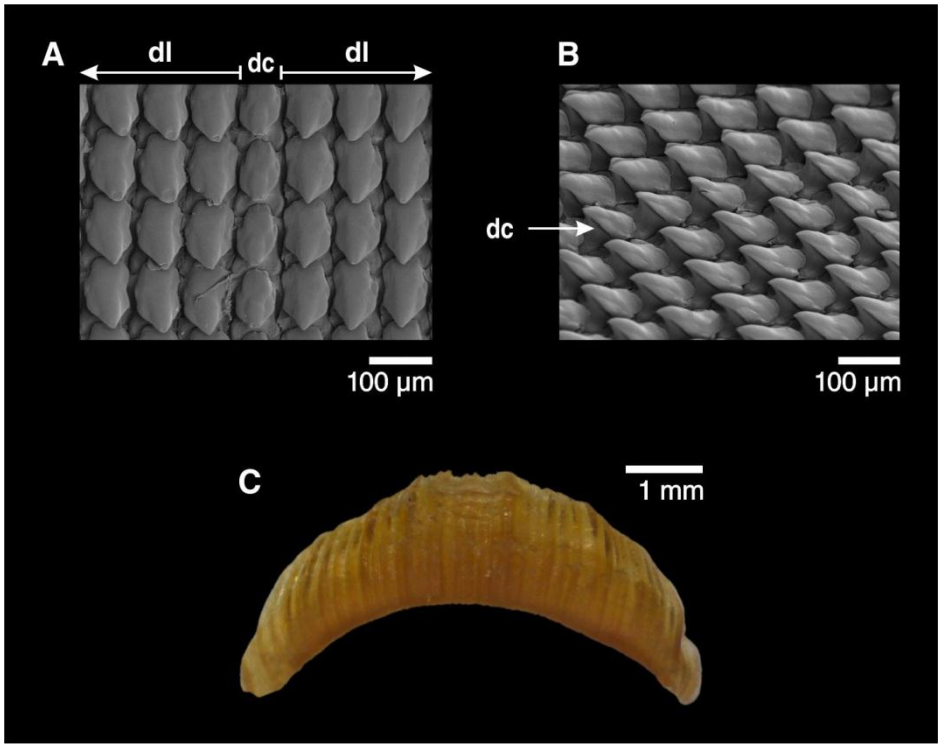

Figura 35. Rádula y arco mandibular de *Megalobulimus oblongus musculus*. A: segmento radular mostrando dientes centrales y laterales; **B**: vista dorsolateral de los dientes centrales y laterales; **C**: vista superior del arco mandibular.

dc, diente central; **dl**, dientes laterales.

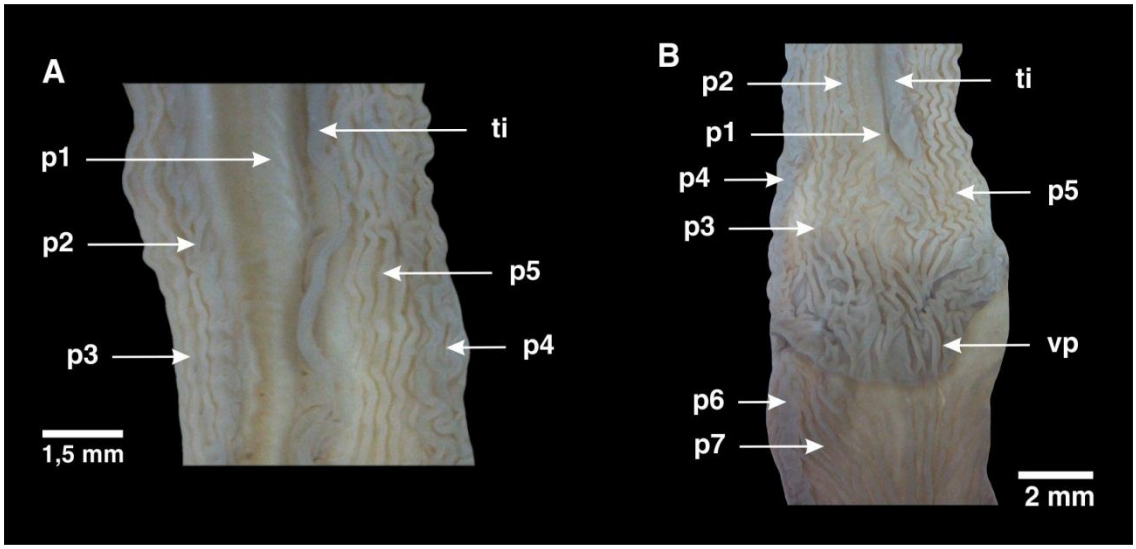

Figura 36. Sistema digestivo de *Megalobulimus oblongus musculus*; estructura interna de la válvula prerrectal y pliegues intestinales pre y pos valvulares. A: vista interna de la porción del intestino anterior previo a la zona de la válvula prerrectal, se muestra en detalle los pliegues del intestino prevalvular; **B**: vista interna de la válvula prerrectal y de sus pliegues prevalvular y posvalvular.

pl - p5, pliegues del intestino prevalvular; **p6 - p7**, pliegues del intestino posvalvular; **ti**, tiflosol intestinal; **vp**, válvula prerrectal.

II.3.2.5 Sistema Reproductor

Descripción de la Morfología Externa

Disposición del sistema reproductor dentro del cuerpo del animal semejante a *M. o. lorentzianus*.

Las características del **ovotestis** (Fig. 37A: o), el **conducto hermafrodita** (Fig. 37A: ch), el **saco glandular anexo**, la **bolsa de fertilización-complejo de la espermateca** (Fig. 37A, B, 38A: sg, bfce), la **glándula del albumen** (Fig. 37A, B: ga) y **cámara del albumen** (Fig. 37B: ca), el **espermoviducto** (Fig. 37B: eo) y sus partes: **útero** (Fig. 37A: u) y **próstata** (Fig. 37A: pt), el **oviducto** (Fig. 37A: ov) y su **saco anexo** (Fig. 37A: so), la **vagina** (Fig. 37A: v), **poro genital** (Fig. 37A: pg), el **conducto de la bolsa espermática** (Fig. 37A, B: cbe) y la **bolsa espermática** (Fig. 37A, B: be), la posición de la inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca (Fig. 38A, ch, bfce), la relación de la extensión del **saco anexo del oviducto** y el oviducto (Fig. 37A: so, ov) y la relación de la extensión de la vagina *vs.* el oviducto, semejantes a las dadas en *M. o. lorentzianus*.

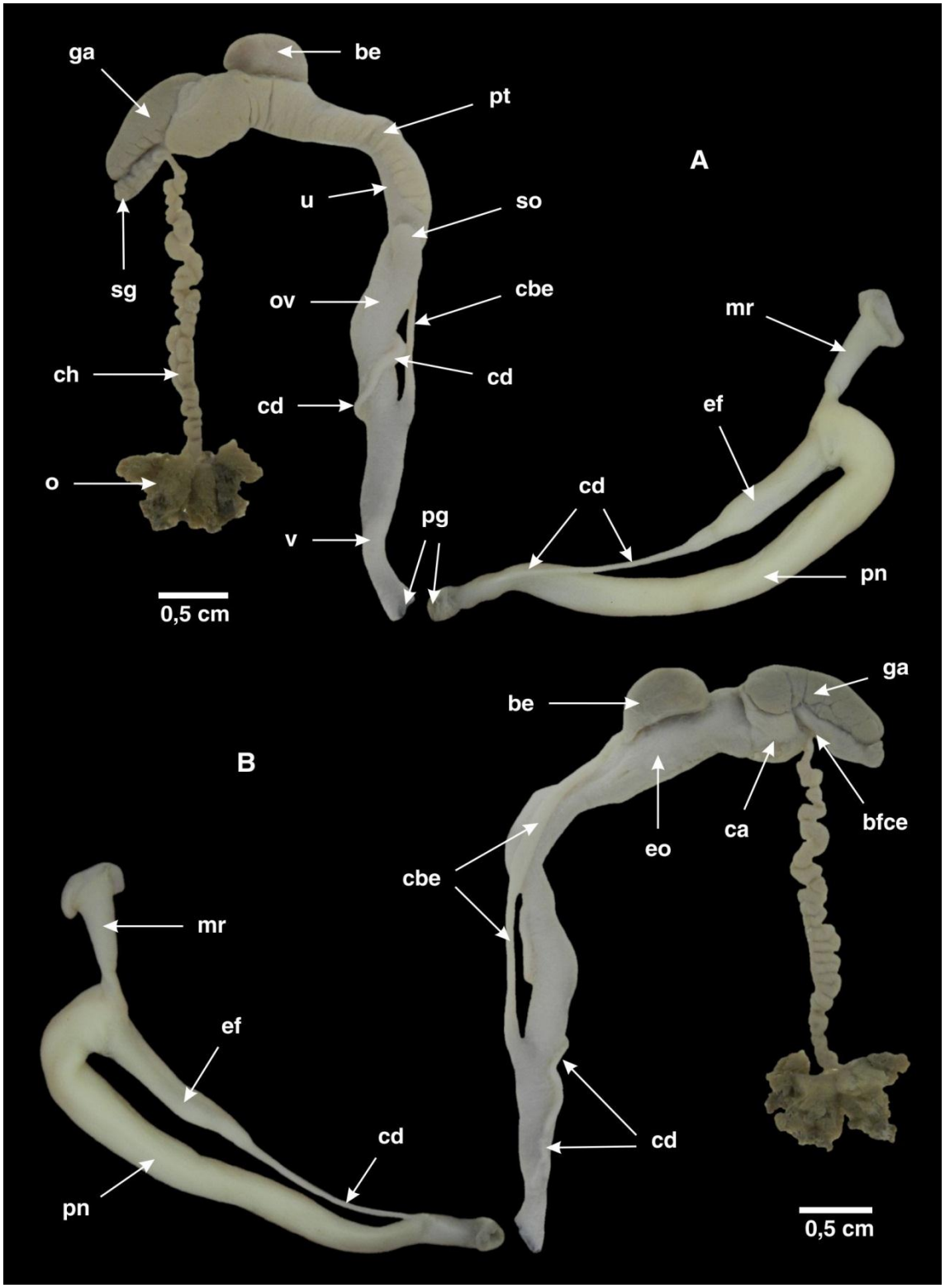

Figura 37. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus musculus*, estructura externa. A: vista externa izquierda; **B**: vista externa derecha.

be, bolsa espermática; **bfce**, bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **ca**, cámara del albumen; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **ch**, conducto hermafrodita; **ef**, epífalo; **eo**, espermoviducto; **ga**, glándula del albumen; **mr**, músculo retractor del pene; **o**, ovotestis; **ov**, oviducto; **pg**, poro genital; **pn**, pene; **pt**, próstata; **sg**, saco glandular anexo; **so**, saco anexo del oviducto; **u**, útero; **v**, vagina.

El **conducto deferente** (Fig. 37A, B: cd), el **epífalo** (Fig. 37A, B, 38B: ef), el **pene** (Fig. 37A, B: pn) y el **músculo retractor del pene** (Fig. 37A, B: mr) presentan características semejantes a las dadas para *M. o. lorentzianus*.

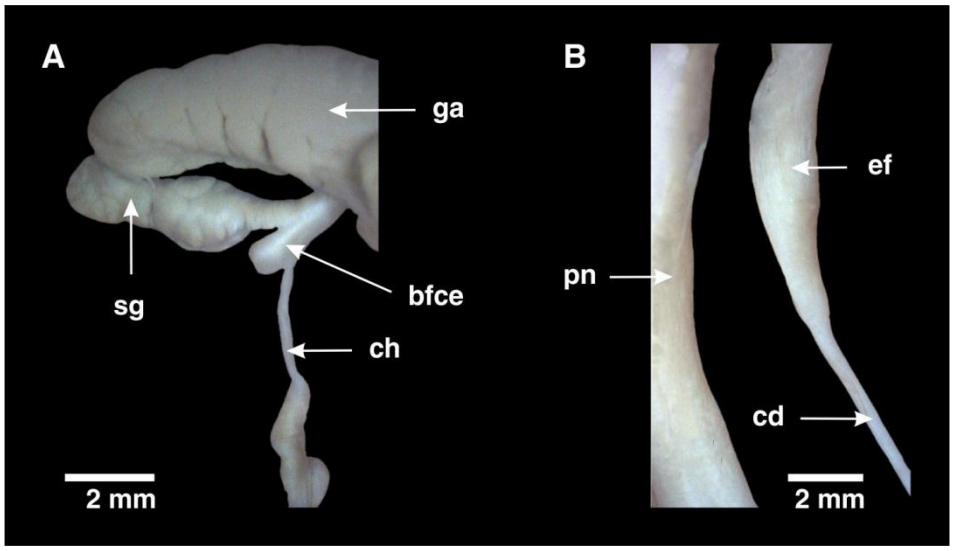

Figura 38. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus musculus*; saco glandular anexo y epífalo. A: vista externa del saco glandular anexo, se muestra en detalle la inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **B**: vista externa parcial del pene y epífalo, se muestra en detalle la inserción del conducto deferente en el epífalo.

bfce, bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **cd**, conducto deferente; **ch**, conducto hermafrodita; **ef**, epífalo; **ga**, glándula del albumen; **pn**, pene; **sg**, saco glandular anexo.

Descripción de la Morfología Interna

El **espermoviducto** (Fig. 39A) y sus partes: **útero** y **próstata**, y el **conducto de la bolsa espermática** (Fig. 39B: cbe) semejantes a *M. o. lorentzianus*; difiriendo de é sta en los pliegues de la **bolsa espermática** (Fig. 39B: pbe, be), los cuales son gruesos, ondulantes y están anastomosados entre ellos formando un entramado. Además, el **oviducto** (Fig. 39B: ov) y su **saco anexo** presentan pliegues (Fig. 39B: pov, pso) anchos, altos y lisos, con surcos de grosor irregular. Sobre la mitad posterior de la **vagina** (Fig. 39B: v) estos pliegues se continúan como pliegues finos, más bajos y de borde fuertemente crenulado (Fig. 39B: pv), mientras que sobre la mitad anterior de la vagina, hasta el poro genital (39B: pgf), se hacen bajos y lisos (Fig. 39B: pv).

El **epífalo** (Fig. 39C: ef) y el **pene** (Fig. 39C: pn) son semejantes a *M. o. lorentzianus*, sin embargo los pliegues longitudinales del pene (Fig. 39C: plp) alcanzan la región próxima al epífalo, y el pliegue transversal del pene (Fig. 39C: ptp) es alto y

más grueso que los pliegues longitudinales del pene (Fig. 39C: plp), a la vez que se encuentra fusionado a uno de ellos.

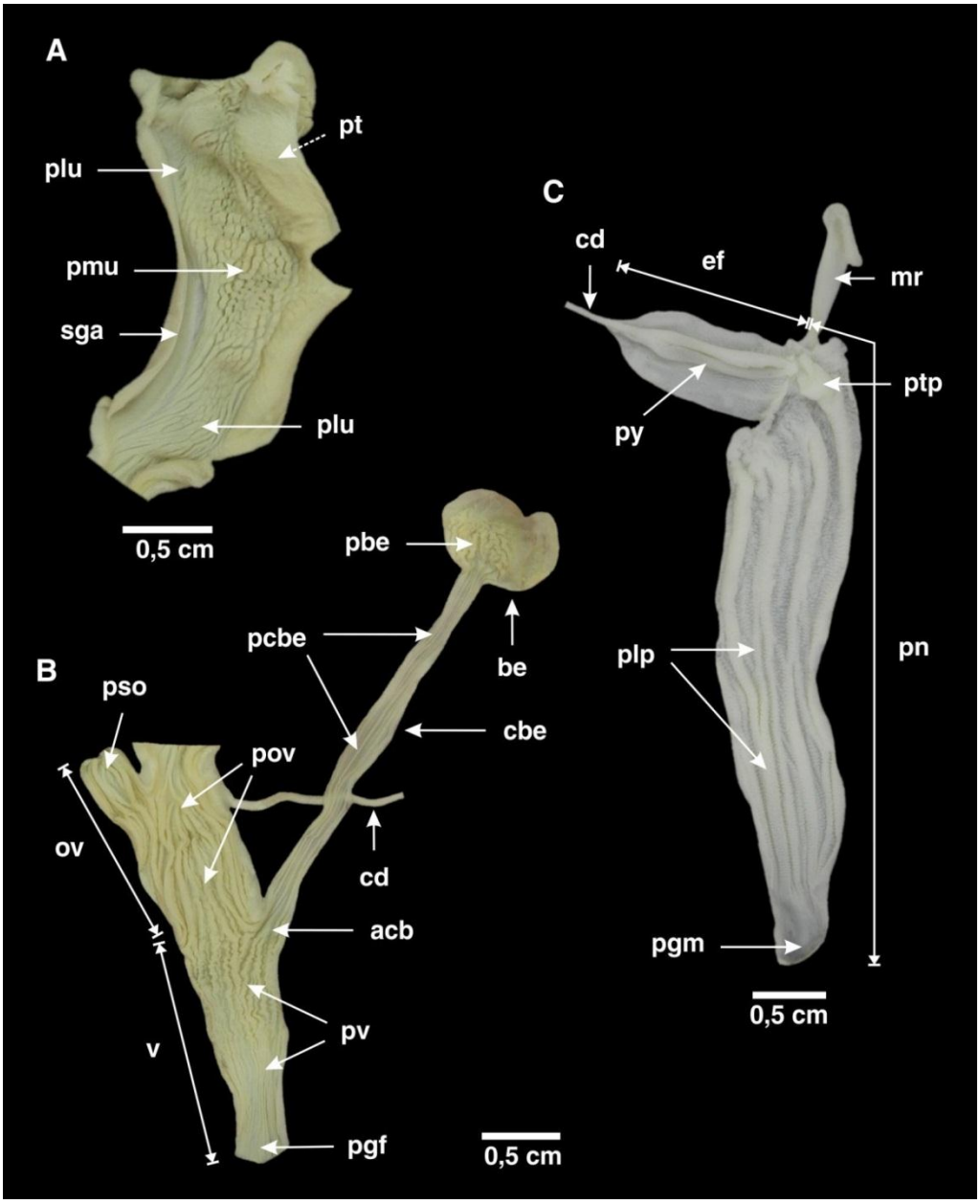

Figura 39. Sistema reproductor de *Megalobulimus oblongus musculus*; estructura interna del espermoviducto, porción femenina y masculina. A: vista interna de la superficie del espermoviducto; **B**: vista interna del oviducto, vagina, bolsa espermática y su conducto homónimo; **C**: vista interna del pene y epífalo. Flecha punteada en A indica una estructura no visible en la imagen, pero que se encuentra inmediatamente en dorsal.

acb, abertura del conducto de la bolsa espermática; **be**, bolsa espermática; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **ef**, epífalo; **mr**, músculo retractor del pene; **ov**, oviducto; **pbe**, pliegues de la bolsa espermática; **pcbe**, pliegues del conducto de la bolsa espermática; **pgf**, poro genital femenino; **pgm**, poro genital masculino; **plp**, pliegues longitudinales del pene; **plu**, pliegues lisos del útero; **pmu**, pliegues membranosos del útero; **pn**, pene; **pov**, pliegues del oviducto; **pso**, pliegues del saco anexo del oviducto; **pt**, próstata; **ptp**, pliegue transversal del pene; **pv**, pliegues vaginales; **py**, pliegue en Y del epifalo; **sga**, surco de plegamiento de la glándula genital accesoria; **v**, vagina.

II.3.3 *Megalobulimus sanctipauli*

II.3.3.1 Principales Caracteres Diagnósticos

Concha: longitud total 88,48 mm (±7,39), ancho en vista frontal 47,89 mm (±4,25) y número de vueltas 6,15 (±0,21). De estar presente el periostraco marrón claro a verdoso; internamente ámbar pálido. Forma ahusada y contorno elíptico; última vuelta elíptica de contorno aplanado convexo; espira de vueltas aplanadas convexas, alta, ápice puntiagudo. Tercera vuelta de la protoconcha con microgranulación gruesa sin un patrón definido. Partes blandas: animal de color marrón rojizo no uniforme. Pliegue intestinal p4 1/3 del ancho del tiflosol intestinal; pliegues intestinales p3, p4 y p5 no se extienden sobre el borde lobulado de la válvula prerrectal. Extensión del saco anexo del oviducto respecto al oviducto de 1,5:1 a 2:1. Conducto deferente en el límite del oviducto con la vagina de trayecto sinuoso describiendo un zigzag corto y apretado. Útero con pliegues membranosos y lisos planos. Oviducto con pliegues anchos y altos, intercalados por pliegues finos y bajos, superficie de ambos tipos de pliegues con surcos transversales finos y profundos. Mitad posterior de la vagina, con pliegues equivalentes al oviducto.

II.3.3.2 Morfología del Animal Vivo y Masa Visceral

Arquitectura del tegumento, borde del manto, pie y región cefálica (incluyendo tentáculos, boca y palpos bucales) semejante a la descripción dada para *M. o. lorentzianus* (Fig. 40A: plb, tro; B: teg, trs; C: b, bp, plb); con esta también comparte la descripción dada para el gonoporo (Fig. 40A: g), neumostoma y ano; sin embargo difiere en la pigmentación de la región cefalopedal la cual es marrón rojizo, presentando algunas zonas con mayor pigmentación rojiza, cuyo patrón e intensidad varía entre los individuos analizados. La hipertrofia del borde del manto, como la ausencia de formación de epifragma pudo ser constatada en esta entidad.

Con la remoción de la concha, las estructuras observables y su disposición en el contexto de la masa visceral es equivalente a la descripción dada anteriormente en *M. o. lorentzianus*.

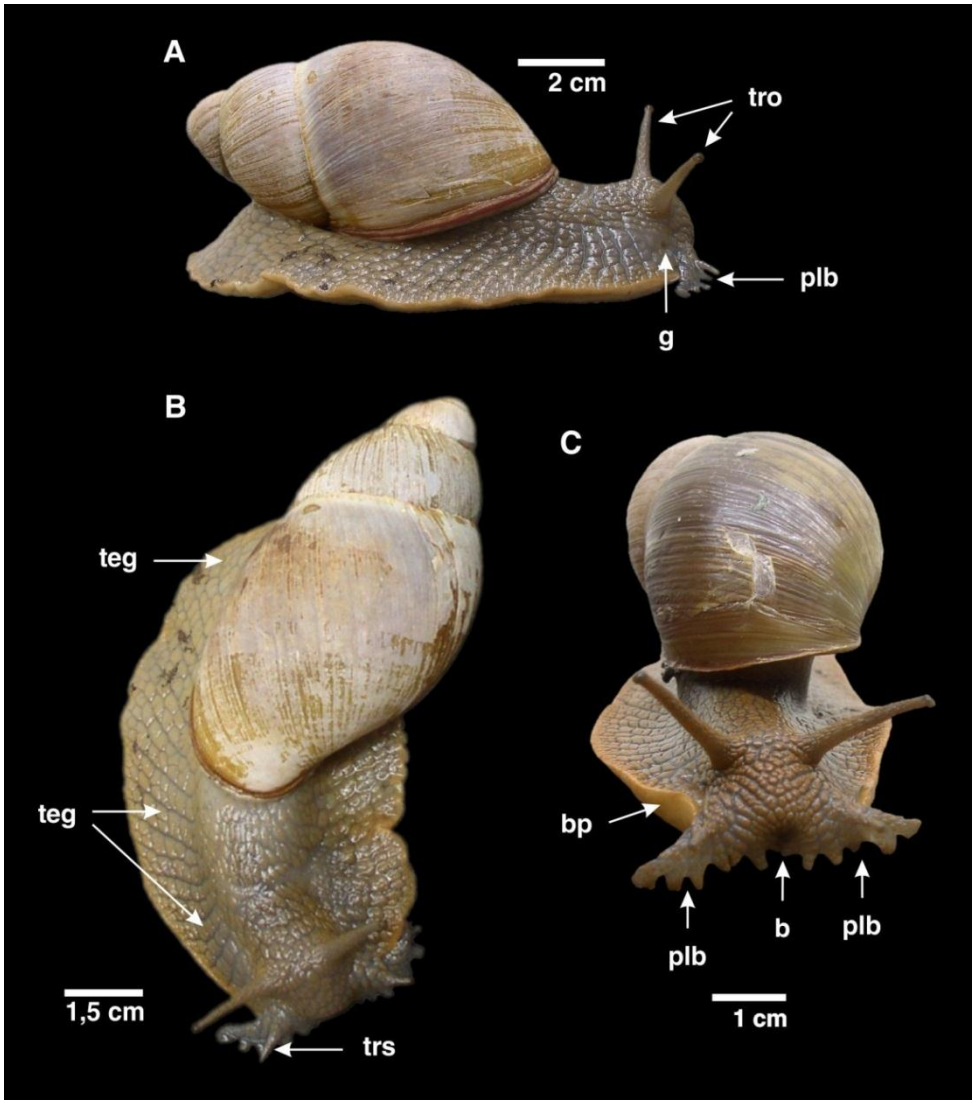

Figura 40. Animal vivo adulto de *Megalobulimus sanctipauli*. A: vista lateral derecha; **B**: vista dorsal; **C**: vista frontal.

b, boca; **bp**, base del pie; **g**, gonoporo; **plb**, palpo bucal; **teg**, tegumento; **tro**, tentáculo retráctil portador del omatóforo; **trs**, tentáculo retráctil sensorial.

II.3.3.3 Complejo Paleal

En general, arquitectura y disposición de la cavidad pulmonar, pericardio y sistema renal semejante a la descripción dada para *M. o. lorentzianus*.

Cavidad Pulmonar. El tabique pulmonar, vasos accesorios a la vena pulmonar y del pericardio, vena periférica del collar (Fig. 41: tp, vvp, vap, vc, respectivamente) y vaso satélite del pericardio semejantes a la descripción dada para *M. o. lorentzianus*.

Pericardio. Características de la cavidad pericárdica (Fig. 41: p) similares a la descriptas para *M. o. lorentzianus*.

Sistema Renal. Riñón (Fig. 41: r) triangular. La relación que guarda la extensión antero-posterior del riñón con el tabique pulmonar, el plexo epirrenal (Fig. 41: pe), las características del surco uretral (Fig. 41: su) y las estructuras que lo delimitan (*i.e.* tabique pulmonar, riñón, intestino posterior, ano; Fig. 41: tp, r, ip, a, respectivamente) semejantes a *M. o. lorentzianus*. Los vasos adrectales (Fig. 41: var) comparten las características dadas para *M. o. lorentzianus*, excepto en que son más tenues y más separados unos de otros; mientras que hacia la región posterior del nefrostoma (Fig. 41: nf) son de contorno bien definido, anchos, desapareciendo definitivamente en el último 1/5 del riñón y hacia el fondo de la cavidad paleal (Fig. 41: fcp).

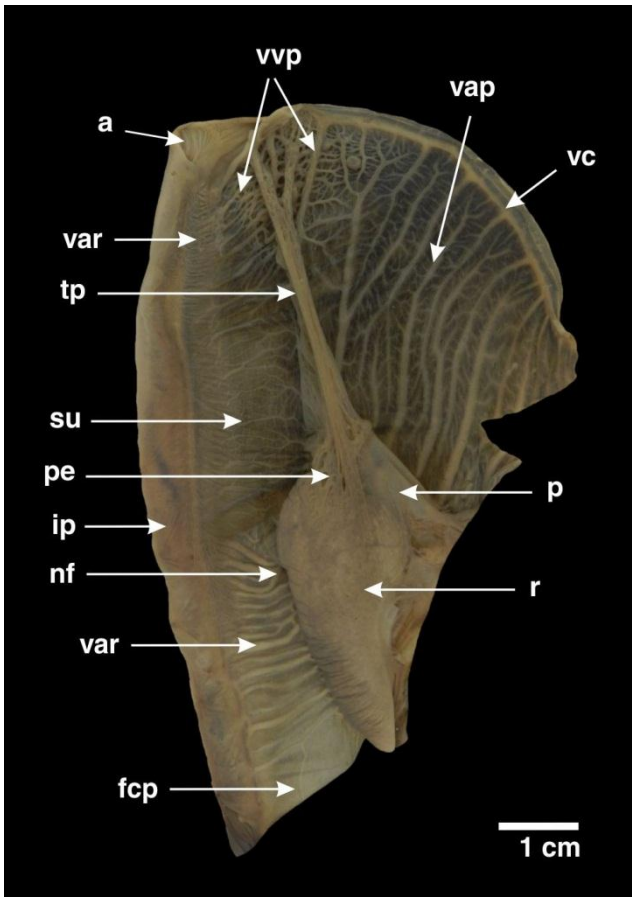

Figura 41. Complejo paleal de *Megalobulimus sanctipauli*. Vista interna del complejo paleal.

a, ano; **fcp**, fondo de la cavidad paleal; **ip**, intestino posterior; **nf**, nefrostoma; **p**, pericardio; **pe**, plexo epirrenal; **r**, riñón; **su**, surco uretral; **tp**, tabique pulmonar; **vap**, vasos accesorios del pericardio; **var**, vasos adrectales; **vc**, vena periférica del collar; **vvp**, vasos accesorios de la vena pulmonar.

II.3.3.4 Sistema Digestivo

Descripción de la Morfología Externa

Disposición y características semejantes a las dadas para *M. o. lorentzianus*.

Descripción de la Morfología Interna

Mandíbula. Arco mandibular (Fig. 42C) marrón rojizo claro, de perfil marcadamente cóncavo. **Rádula**. Constituida por aproximadamente 141 (± 4) hileras de dientes. Cada hilera se compone de un diente central y aproximadamente 37 (± 2) dientes laterales a cada lado del central. Diente central (Fig. 42A, B: dc) con una cresta media bilobulada que se prolonga hacia la zona anterior del diente, no desarrollada de igual manera en todos los dientes. Dientes centrales y laterales levemente estriados, de cúspide elevada, casi perpendicular a la base del diente (Fig. 42A, B: dc, dl). El resto de las características de la mandíbula, **glándulas salivales**, **esófago** (anterior, medio y posterior) y **estómago** similares a *M. o. lorentzianus*; de igual manera sucede con las características del **intestino** medio y posterior, no así para el intestino anterior y la válvula prerrectal, a saber: tiflosol intestinal (Fig. 43A: ti) bajo, ancho, liso con pliegues longitudinales tenues e irregulares, de trayectoria lineal; los pliegues del intestino prevalvular (Fig. 43A: p1 - p5), si bien tienen la misma disposición que la indicada en *M. o. lorentzianus*, difieren de esta en las siguientes características: p1 bajo, liso y fino (aproximadamente 1/2 del ancho del tiflosol intestinal) (Fig. 43A: p1); p2 bajo, ancho (equivalente al tiflosol), con crestas transversales poco definidas e intercaladas por surcos tenues (Fig. 43A: p2); p3 bajos, finos, lisos y de trayecto lineal (Fig. 43A: p3); p4 bajo, 1/3 del ancho del tiflosol, superficie lisa y trayecto ondulante (Fig. 43A: p4); p5 bajos, finos y lisos, de trayectoria lineal (Fig. 43A: p5). Poco antes de alcanzar la válvula prerrectal (Fig. 43B: vp) el tiflosol intestinal, los pliegues p1 y p2 finalizan su recorrido sobre el intestino anterior (Fig. 43B: ti, p1, p2) al igual que en *M. o. lorentzianus*, pero a diferencia de este, los pliegues p3, p4 y p5 se continúan solo hasta la base de la válvula prerrectal y no se extienden sobre el borde lobulado de dicha válvula, siendo el mismo liso (Fig. 43B: p3, p4, p5). Todos los pliegues (*i.e.* p1 - p5) mantienen sus características cuando alcanzan la región del intestino anterior

prevalvular, excepto que se hacen más altos (Fig. 43A *vs.* B: p1 - p5); el tiflosol intestinal cambia algunas de sus características en esta región, en el último tramo de su recorrido pierde su superficie lisa para tornarse irregular y con depresiones, al tiempo que se hace más alto y angosto (Fig. 43A *vs.* B: ti).

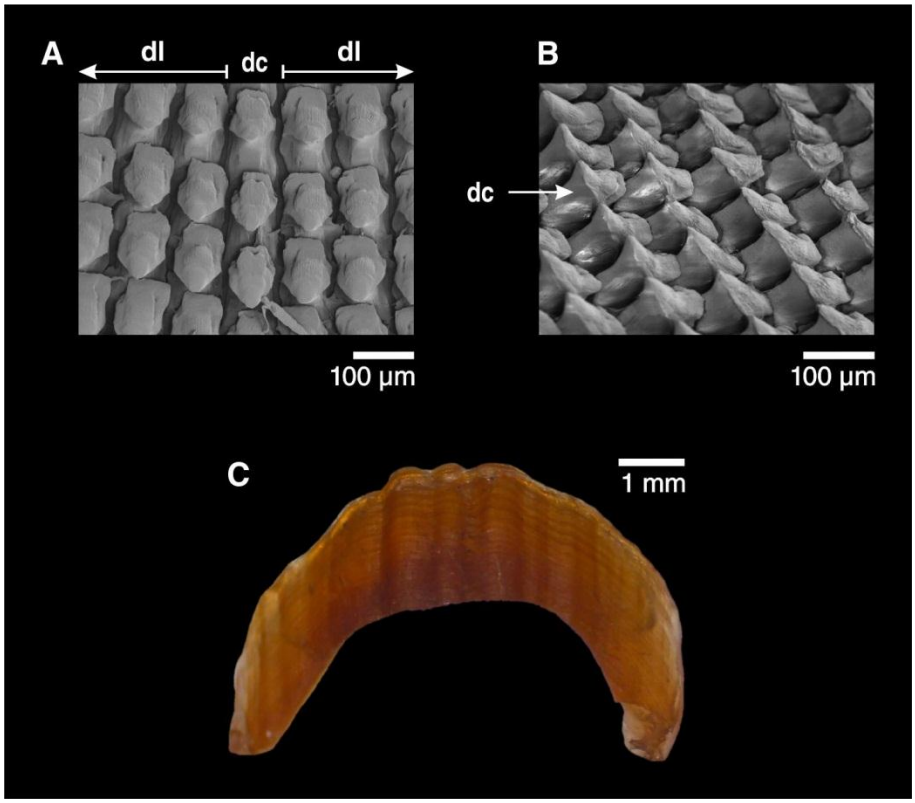

Figura 42. Rádula y arco mandibular de *Megalobulimus sanctipauli*. A: segmento radular mostrando dientes centrales y laterales; **B**: vista dorsolateral de los dientes centrales y laterales; **C**: vista superior del arco mandibular.

dc, diente central; **dl**, dientes laterales.

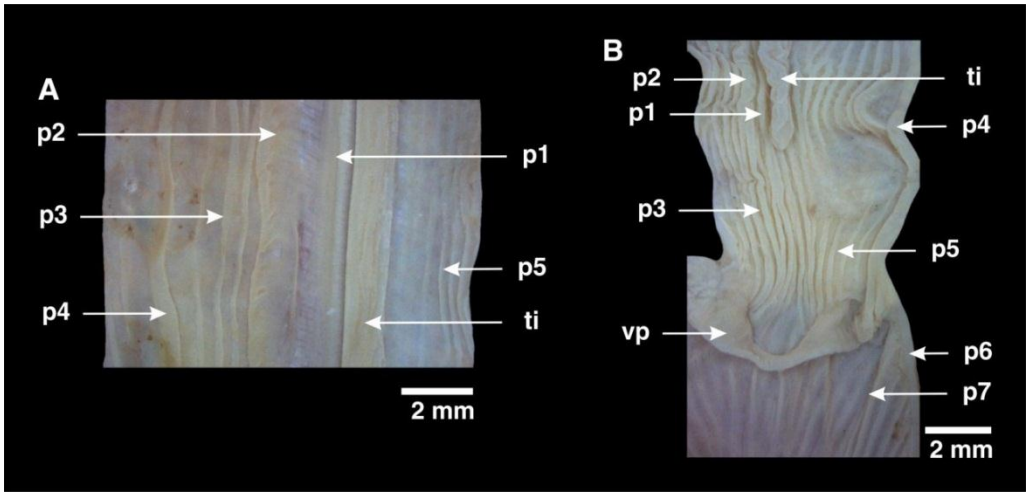

Figura 43. Sistema digestivo de *Megalobulimus sanctipauli*; estructura interna de la válvula prerrectal y pliegues intestinales pre y pos valvulares. A: vista interna de la porción del intestino anterior previo a la zona de la válvula prerrectal, se muestra en detalle los pliegues del intestino prevalvular; **B**: vista interna de la válvula prerrectal y de sus pliegues prevalvular y posvalvular.

pl - p5, pliegues del intestino prevalvular; **p6 - p7**, pliegues del intestino posvalvular; **ti**, tiflosol intestinal; **vp**, válvula prerrectal.

II.3.3.5 Sistema Reproductor

Descripción de la Morfología Externa

Disposición del sistema reproductor dentro del cuerpo del animal semejante a *M. o. lorentzianus*.

Las características del **ovotestis** (Fig. 44A: o), el **conducto hermafrodita** (Fig. 44A: ch), el **saco glandular anexo**, la **bolsa de fertilización-complejo de la espermateca** (Fig. 44A, B, 45A: sg, bfce), la **glándula del albumen** (Fig. 44A, B: ga) y **cámara del albumen** (Fig. 44B: ca), el **espermoviducto** (Fig. 44B: eo) y sus partes: **útero** (Fig. 44A: u) y **próstata** (Fig. 44A: pt), el **oviducto** (Fig. 44A: ov), la **vagina** (Fig. 44A: v), **poro genital** (Fig. 44A: pg), el **conducto de la bolsa espermática** (Fig. 44B: cbe) y la **bolsa espermática** (Fig. 44A, B: be) semejantes a las dadas en *M. o. lorentzianus*. Sin embargo, difiere en la inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca (Fig. 45A: ch, bfce), la cual se posiciona en la base de la misma; además, la extensión del **saco anexo del oviducto** (Fig. 45A: so) es mayor a la del oviducto, en una proporción aproximadamente de 1.5:1 a 2:1 y, la

extensión de la vagina es mayor que la del oviducto, en una proporción aproximadamente de 2:1.

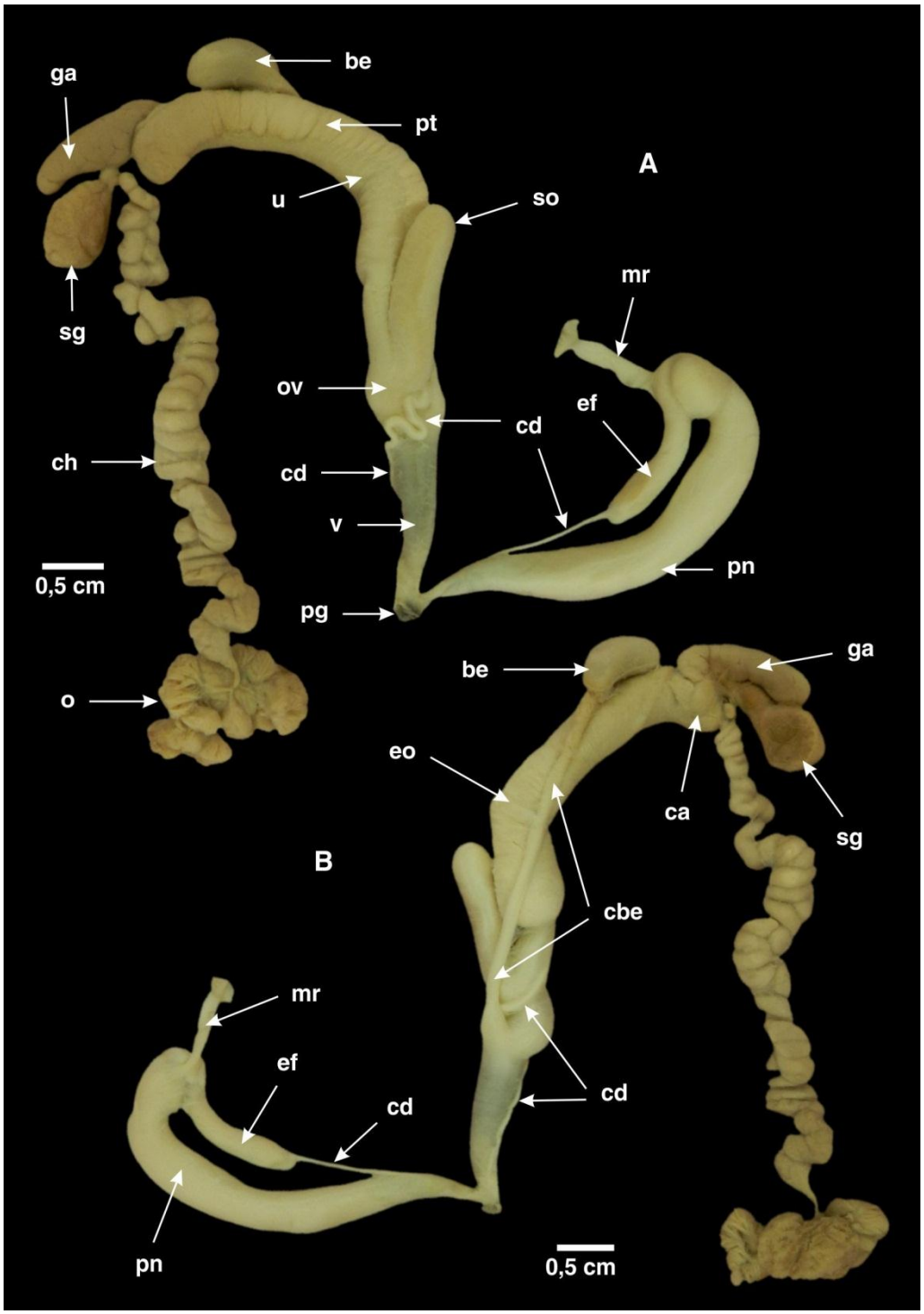

Figura 44. Sistema reproductor de *Megalobulimus sanctipauli*, estructura externa. A: vista externa izquierda; **B**: vista externa derecha.

be, bolsa espermática; **ca**, cámara del albumen; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **ch**, conducto hermafrodita; **ef**, epífalo; **eo**, espermoviducto; **ga**, glándula del albumen; **mr**, músculo retractor del pene; **o**, ovotestis; **ov**, oviducto; **pg**, poro genital; **pn**, pene; **pt**, próstata; **sg**, saco glandular anexo; **so**, saco anexo del oviducto; **u**, útero; **v**, vagina.

El **conducto deferente** (Fig. 44A, B: cd) es de diámetro no uniforme; en el inicio de su recorrido, entre el espermoviducto y el oviducto, es donde alcanza su mayor grosor; disminuyendo progresivamente en su recorrido hasta alcanzar su menor diámetro en la inserción con el epífalo. Sobre el oviducto su trayecto descendente es oblicuo, mientras que sobre la vagina es paralelo a ella (Fig. 44B: cd); en la región donde el oviducto se continúa con la vagina (Fig. 44A: ov, v), a la altura del surgimiento del **conducto de la bolsa espermática** y por debajo del **saco anexo del oviducto**, el conducto deferente realiza un recorrido sinuoso describiendo un zigzag corto y apretado (Fig. 44A: cd). El **epífalo** (Fig. 44A, B: ef) en su inserción con el conducto deferente presenta dos apéndices o flagelos (Fig. 45B: fl). El **pene** (Fig. 44A, B: pn) y el **músculo retractor del pene** (Fig. 44A, B: mr) presenta características semejantes a las dadas para *M. o. lorentzianus*.

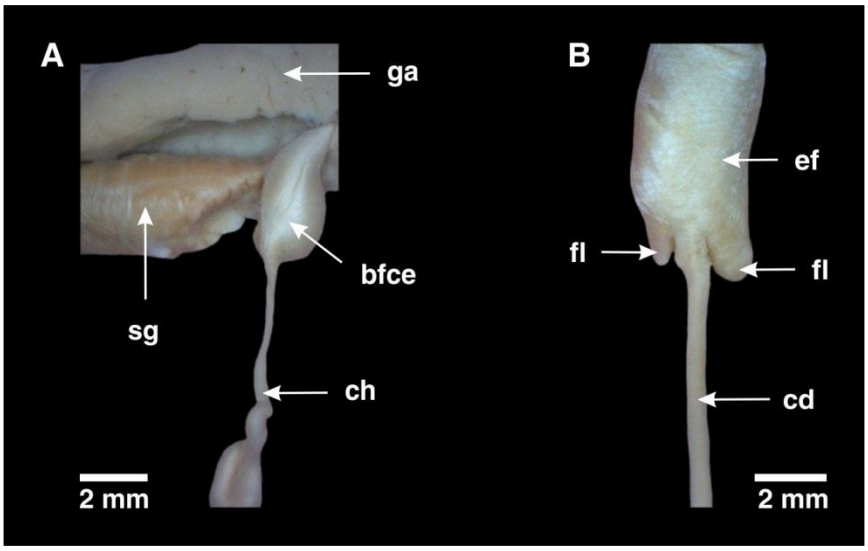

Figura 45. Sistema reproductor de *Megalobulimus sanctipauli*; saco glandular anexo y epífalo. A: vista externa del saco glandular anexo, se muestra en detalle la inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **B**: vista externa parcial del epífalo, se muestra en detalle la inserción del conducto deferente en el epífalo.

bfce, bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **cd**, conducto deferente; **ch**, conducto hermafrodita; **ef**, epífalo; **fl**, flagelo; **ga**, glándula del albumen; **sg**, saco glandular anexo.

Descripción de la Morfología Interna

Pliegues del **útero** bajos (Fig. 46A: plu, pmu), dándole a la superficie un aspecto aplanado y sin relieve. Asimismo, el **oviducto** (Fig. 46B: ov) y su **saco anexo**, presentan pliegues (Fig. 46B: pov, pso) anchos y altos, intercalados por pliegues finos y bajos; ambos tipos de pliegues presentan sobre su superficie surcos transversales finos y profundos, dándoles un aspecto rugoso. Sobre la mitad posterior de la **vagina** (Fig. 46B: v) estos pliegues se continúan y se diferencian en dos regiones (Fig. 46B: pv); una central y direccionada hacia la base de la abertura del conducto de la bolsa espermática (Fig. 46B: acb) donde solo disminuyen en altura; en la segunda región, y lateralmente dispuesta a la central, los pliegues son una continuación de los del oviducto, manteniendo las características. Hacia la mitad anterior de la vagina, hasta el poro genital (46B: pgf), los pliegues se hacen totalmente lisos (Fig. 46B: pv). En el **conducto de la bolsa espermática** (Fig. 46B: cbe) los pliegues (Fig. 46B: pcbe) son longitudinales, finos, de borde liso, paralelos, con surcos angostos y bien definidos hasta la base de la **bolsa espermática** (Fig. 46B: be); en esta última los pliegues son gruesos, ondulantes y están fuertemente anastomosados entre ellos formando un entramado, el que cubre solo la mitad lateral de la superficie de la misma (Fig. 46B: pbe).

Si bien el **epífalo** (Fig. 47: ef) es semejante a *M. o. lorentzianus*, el **pene** (Fig. 47: pn) se diferencia por no manifestar granulación en su superficie y por presentar pliegues longitudinales aserrados (Fig. 47: plp); esto último se debe a la presencia de pequeños pliegues y surcos transversales dispuestos regularmente sobre cada pliegue longitudinal del pene. Además, los pliegues longitudinales del pene (Fig. 47: plp) alcanzan la región próxima al epífalo y, el pliegue transversal del pene (Fig. 47: ptp) es alto, grueso como los pliegues longitudinales del pene y se encuentra fusionado al mayor de ellos.

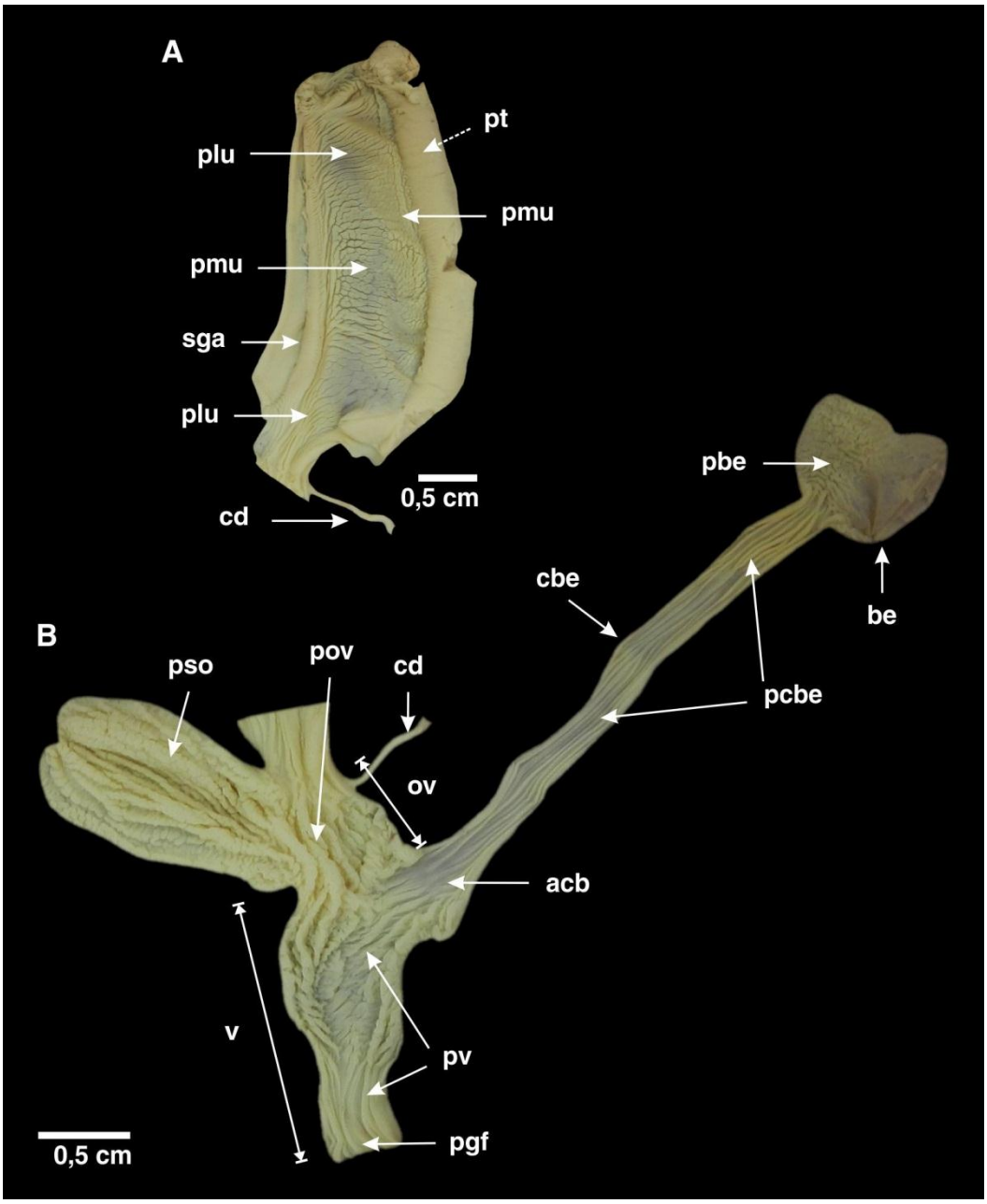

Figura 46. Sistema reproductor de *Megalobulimus sanctipauli*; estructura interna del espermoviducto y porción femenina. A: vista interna de la superficie del espermoviducto; **B**: vista interna del oviducto, vagina, bolsa esperamatica y su conducto homónimo. Flecha punteada en A indica una estructura no visible en la imagen, pero que se encuentra inmediatamente en dorsal.

acb, abertura del conducto de la bolsa espermática; **be**, bolsa espermática; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **ov**, oviducto; **pbe**, pliegues de la bolsa espermática; **pcbe**, pliegues del conducto de la bolsa espermática; **pgf**, poro genital femenino; **plu**, pliegues lisos del útero; **pmu**, pliegues membranosos del útero; **pov**, pliegues del oviducto; **pso**, pliegues del saco anexo del oviducto; **pt**, próstata; **pv**, pliegues vaginales; **sga**, surco de plegamiento de la glándula genital accesoria; **v**, vagina.

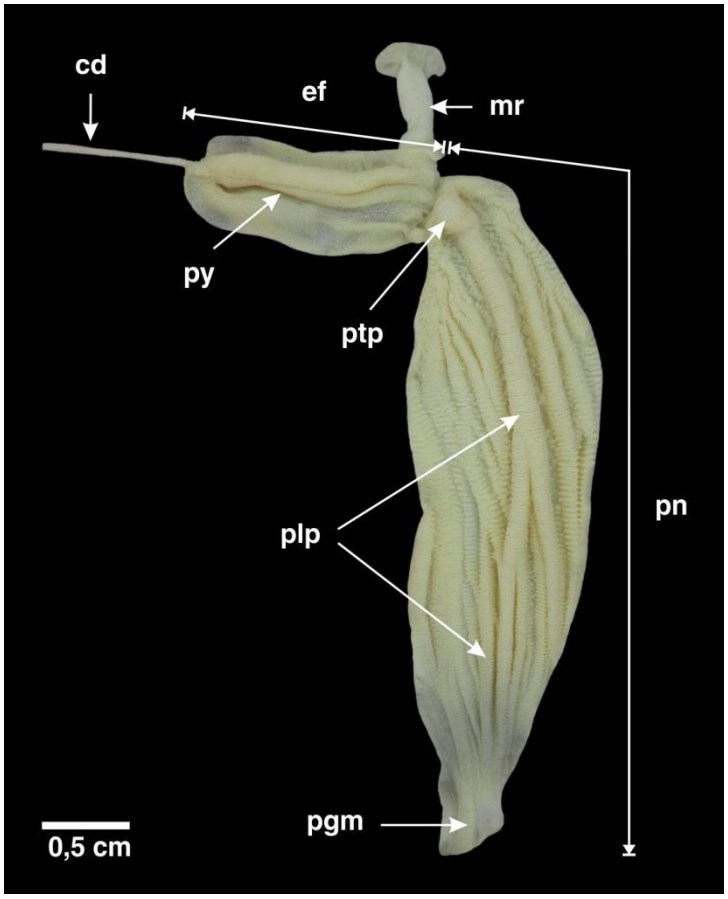

Figura 47. Sistema reproductor de *Megalobulimus sanctipauli*; estructura interna de la porción masculina. Vista interna del pene y epífalo.

cd, conducto deferente; **ef**, epífalo; **mr**, músculo retractor del pene; **pgm**, poro genital masculino; **plp**, pliegues longitudinales del pene; **pn**, pene; **ptp**, pliegue transversal del pene; **py**, pliegue en Y del epífalo.

II.3.4 *Megalobulimus abbreviatus*

II.3.4.1 Principales Caracteres Diagnósticos

Concha: longitud total 75,00 mm (±4,82), ancho en vista frontal 44,04 mm (±2,74) y número de vueltas 5,76 (±0,26). De estar presente el periostraco castaño, con finas franjas más oscuras paralelas al eje mayor; internamente marrón nacarado. Última vuelta oval-alargada de contorno plano convexo. Tercera vuelta de la protoconcha con costillas de bordes difuso, distribuidas irregularmente, en la mitad o 2/3 finales de la tercera vuelta las costillas no se extienden de sutura a sutura, presentan el tercio final desvanecido y costillas accesorias; microgranulación gruesa dispuesta en un patrón espiral definido. Partes blandas: animal de color marrón claro uniforme. Extensión

antero-posterior del riñón respecto al tabique pulmonar de 2/3. Extensión del saco anexo del oviducto respecto al oviducto de 1/2 a 1/3. Oviducto con pliegues anchos, altos y lisos, intercalados con pliegues finos, bajos y de borde crenulado. Mitad posterior de la vagina con pliegues finos, bajos y de borde levemente crenulado.

II.3.4.2 Morfología del Animal Vivo y Masa Visceral

Arquitectura del tegumento, borde del manto, pie y región cefálica (incluyendo tentáculos, boca y palpos bucales) semejante a la descripción dada para *M. o. lorentzianus* (Fig. 48A: b, bp, plb; B: bp, plb, tro, trs; D: plb, teg, tro, trs); con esta también comparte la descripción dada para el gonoporo, neumostoma, ano e hipertrofia del borde del manto (Fig. 48C: m). Sin embargo, la pigmentación en la región cefalopedal en este caso es de color marrón claro y de distribución uniforme.

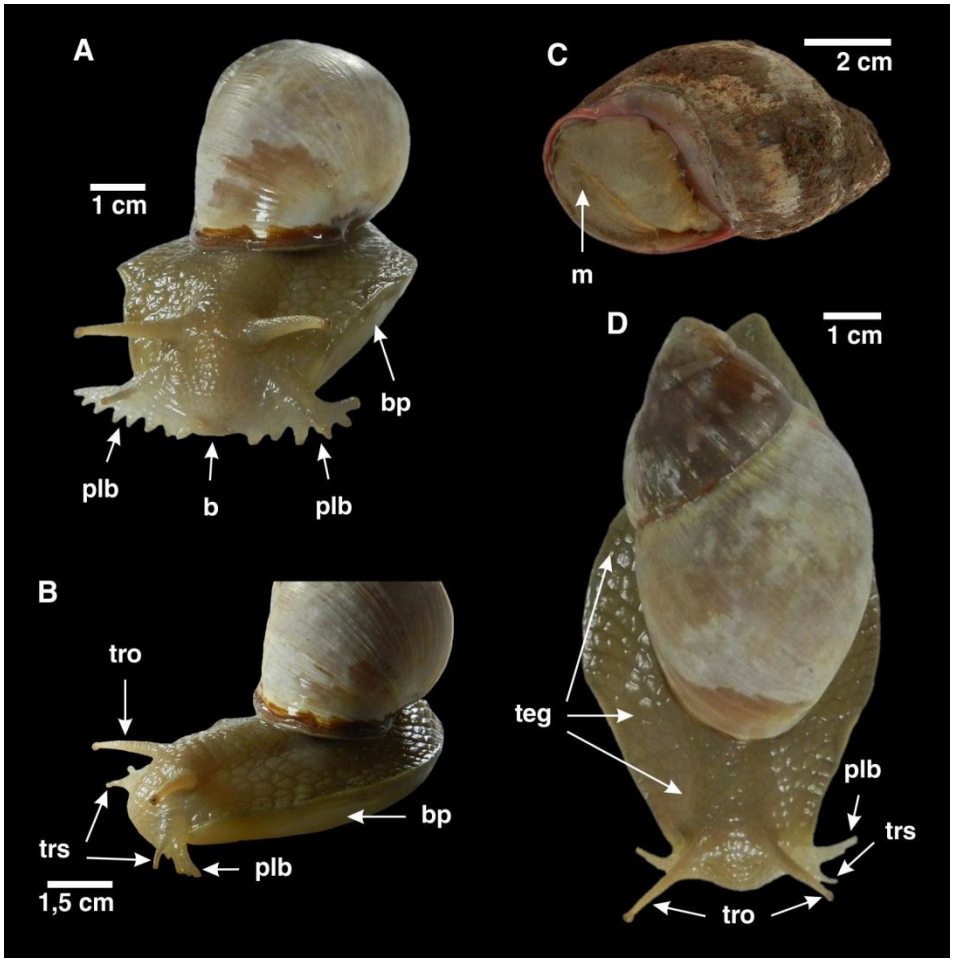

Figura 48. Animal vivo adulto de *Megalobulimus abbreviatus*. A: vista frontal; **B**: vista lateral izquierda; **C**: vista ventral de la concha con hipertrofia del manto; **D**: vista dorsal.

b, boca; **bp**, base del pie; **m**, manto; **plb**, palpo bucal; **teg**, tegumento; **tro**, tentáculo retráctil portador del omatóforo; **trs**, tentáculo retráctil sensorial.

Con la remoción de la concha, las estructuras observables y su disposición en el contexto de la masa visceral es equivalente a la descripción dada para *M. o. lorentzianus*.

II.3.4.3 Complejo Paleal

En general, arquitectura y disposición de la cavidad pulmonar, pericardio y sistema renal semejante a descripción dada para *M. o. lorentzianus*.

Cavidad Pulmonar. El tabique pulmonar, vasos accesorios a la vena pulmonar, vena periférica del collar y vaso satélite del pericardio (Fig. 49: tp, vvp, vc, vsp, respectivamente) semejantes a *M. o. lorentzianus*. Las ramificaciones secundarias de los vasos accesorios del pericardio (Fig. 49: vap) son numerosas y de trayecto corto, con calibre más bien constante a medida que se alejan del tabique pulmonar, y mucho menor al de los vasos accesorios de la vena pulmonar.

Pericardio. Características de la cavidad pericárdica (Fig. 49: p) similares a la descriptas para *M. o. lorentzianus*.

Sistema Renal. Riñón (Fig. 49: r) triangular; su extensión antero-posterior es aproximadamente 2/3 de la del tabique pulmonar (Fig. 49: tp), mientras que el plexo epirrenal (Fig. 49: pe) cubre aproximadamente la mitad de la longitud total del riñón. Las características del surco uretral (Fig. 49: su) y las estructuras que lo delimitan (*i.e.* tabique pulmonar, riñón, intestino posterior, ano; Fig. 49: tp, r, ip, a, respectivamente) semejantes a las dadas para *M. o. lorentzianus*. Por último, los vasos adrectales (Fig. 49: var) también comparten las características dadas previamente para la primera entidad descripta, solo que se diferencia de ella en aquellos vasos adrectales que se disponen hacia la región posterior del nefrostoma (Fig. 49: nf), los que se destacan por su contorno bien definido, por ser anchos, desapareciendo definitivamente en el último 1/5 del riñón y hacia el fondo de la cavidad paleal (Fig. 49: fcp), recordando a los descriptos para *M. sanctipauli*.

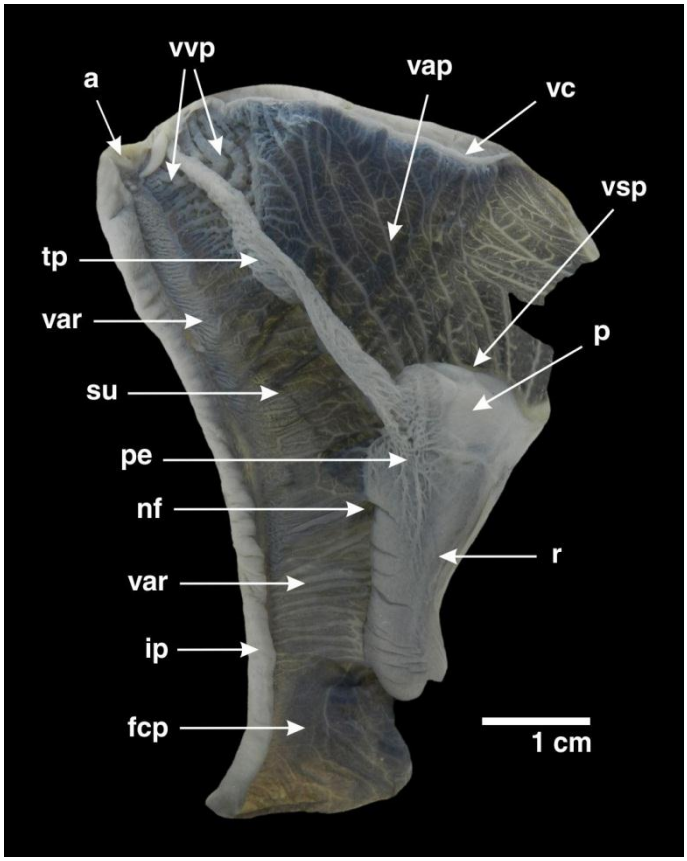

Figura 49. Complejo paleal de *Megalobulimus abbreviatus*. Vista interna del complejo paleal.

a, ano; **fcp**, fondo de la cavidad paleal; **ip**, intestino posterior; **nf**, nefrostoma; **p**, pericardio; **pe**, plexo epirrenal; **r**, riñón; **su**, surco uretral; **tp**, tabique pulmonar; **vap**, vasos accesorios del pericardio; **var**, vasos adrectales; **vc**, vena periférica del collar; **vsp**, vaso satélite del pericardio; **vvp**, vasos accesorios de la vena pulmonar.

II.3.4.4 Sistema Digestivo

Descripción de la Morfología Externa

Disposición y características semejantes a las dadas para *M. o. lorentzianus*.

Descripción de la Morfología Interna

Mandíbula. Arco mandibular (Fig. 50C) marrón claro, formado por placas axiales finas y de distribución irregular. **Rádula**. Constituida por aproximadamente 116 (± 2) hileras de dientes. Cada hilera se compone de un diente central y aproximadamente 43 (± 2) dientes laterales a cada lado del central (Fig. 50A, B: dc, dl).

El resto de las características de la rádula, mandíbula, **glándulas salivales**, **esófago** (anterior, medio y posterior) y **estómago** similares a *M. o. lorentzianus*; de igual manera sucede con las características del intestino medio y posterior, no así para el intestino anterior y la válvula prerrectal, a saber: tiflosol intestinal (Fig. 51A: ti) alto, ancho, liso, de trayectoria lineal; por otra parte los pliegues del intestino prevalvular (Fig. 51A: p1 - p5), si bien tienen la misma disposición que la indicada en *M. o. lorentzianus*, comparativamente presentan diferencias: p1 bajo, fino y liso (Fig. 51A: p1); p2 alto, ancho (equivalente al tiflosol), con crestas transversales intercaladas por surcos finos y de profundidad variable (Fig. 51A: p2); p3 bajos, finos, lisos y de trayecto lineal (Fig. 51A: p3); p4 alto, ancho (mayor que el tiflosol) y con superficie lisa y trayecto lineal (Fig. 51A: p4); p5 bajos, finos y lisos, de trayectoria lineal (Fig. 51A: p5). Poco antes de alcanzar la válvula prerrectal (Fig. 51B: vp) el tiflosol intestinal, los pliegues p1 y p2 finalizan su recorrido sobre el intestino anterior (Fig. 51B: ti, p1, p2) y, los pliegues p3, p4 y p5 se continúan hasta el borde lobulado de la válvula prerrectal (Fig. 51B: p3, p4, p5), al igual que en *M. o. lorentzianus*. Sin embargo y a diferencia de esta, el tiflosol intestinal y ciertos pliegues cambian algunas de sus características en esta región del intestino anterior prevalvular (Fig. 51A *vs.* B); en el último tramo de su recorrido el tiflosol intestinal pierde su superficie lisa para tornarse irregular y con depresiones (Fig. 51A *vs.* B: ti); p3 y p5 pierden su trayectoria lineal y algunos se anastomosan entre sí sobre la región de la válvula prerrectal (Fig. 51A *vs.* B: p3, p5); p4 pierde su superficie lisa para tomar un aspecto irregular dado por surcos transversales y oblicuos de profundidad variable (Fig. 51A *vs.* B: p4).

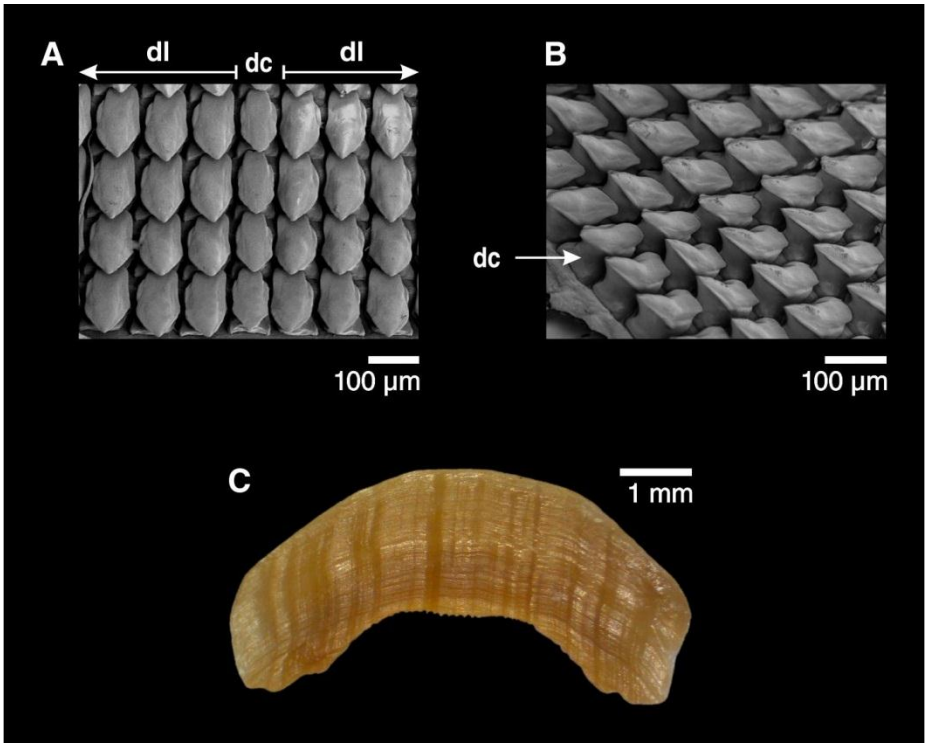

Figura 50. Rádula y arco mandibular de *Megalobulimus abbreviatus*. A: segmento radular mostrando dientes centrales y laterales; **B**: vista dorsolateral de los dientes centrales y laterales; **C**: vista superior del arco mandibular.

dc, diente central; **dl**, dientes laterales.

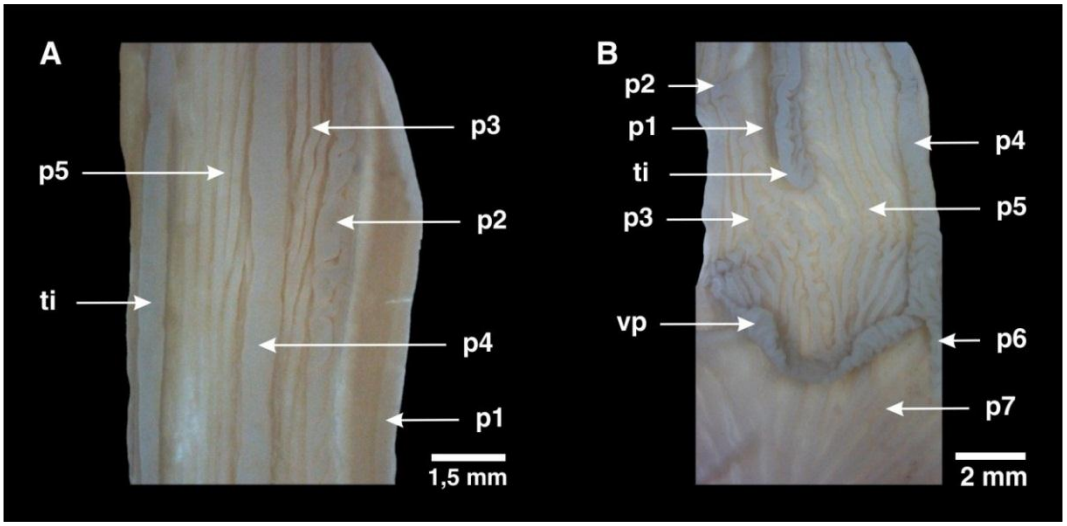

Figura 51. Sistema digestivo de *Megalobulimus abbreviatus*; estructura interna de la válvula prerrectal y pliegues intestinales pre y pos valvulares. A: vista interna de la porción del intestino anterior previo a la zona de la válvula prerrectal, se muestra en detalle los pliegues del intestino prevalvular; **B**: vista interna de la válvula prerrectal y de sus pliegues prevalvular y posvalvular.

pl - p5, pliegues del intestino prevalvular; **p6 - p7**, pliegues del intestino posvalvular; **ti**, tiflosol intestinal; **vp**, válvula prerrectal.

II.3.4.5 Sistema Reproductor

Descripción de la Morfología Externa

Disposición del sistema reproductor dentro del cuerpo del animal semejante a *M. o. lorentzianus*.

Las características del **ovotestis** (Fig. 52A: o), el **conducto hermafrodita** (Fig. 52A: ch), el **saco glandular anexo**, la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca (Fig. 52A, B, 53A: sg, bfce), la **glándula del albumen** (Fig. 52A, B: ga) y **cámara del albumen** (Fig. 52B: ca), el **espermoviducto** (Fig. 52B: eo) y sus partes: **útero** (Fig. 52A: u) y **próstata** (Fig. 52A: pt), el **oviducto** (Fig. 52A: ov), la **vagina** (Fig. 52A: v), **poro genital** (Fig. 52A: pg), el **conducto de la bolsa espermática** (Fig. 52A, B: cbe) y la **bolsa espermática** (Fig. 52A, B: be) semejantes a las dadas en *M. o. lorentzianus*. Sin embargo, difiere de esta en la posición de la inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca (Fig. 53A, ch, bfce), la cual se da en la base del mismo; además, la extensión del **saco anexo del oviducto** (Fig. 52A: so) es aproximadamente 1/2 a 2/3 de la del oviducto y, la extensión de la vagina es mayor que el oviducto, no alcanzando a duplicarlo.

El **conducto deferente** (Fig. 52A, B: cd) es de diámetro no uniforme; en el inicio de su recorrido (Fig. 52A: cd), entre el espermoviducto y el oviducto (Fig. 52A: eo, ov), es donde alcanza su mayor grosor; disminuyendo progresivamente en su recorrido hasta alcanzar su menor diámetro en la inserción con el epífalo (Fig. 52A: cd, ef). Sobre el oviducto y la vagina, el trayecto del conducto deferente es paralelo al eje longitudinal (Fig. 52A, B: cd, ov, v). El **epífalo** (Fig. 52A, B: ef) es más delgado y corto que el pene (Fig. 52A, B: pn); en su inserción con el conducto deferente presenta dos apéndices o flagelos (Fig. 53B: fl). El **pene** ilustrado en la Fig. 52 presenta una estructura curvada, en forma de "S" (Fig. 52A, B: pn); esta refleja el caso más extremo encontrado entre los individuos analizados, mientras que otros han mostrado una conformación semejante a la descripta para *M. o. lorentzianus*. El **músculo retractor del pene** (Fig. 52A, B: mr) presenta características semejantes a las dadas para *M. o. lorentzianus*.

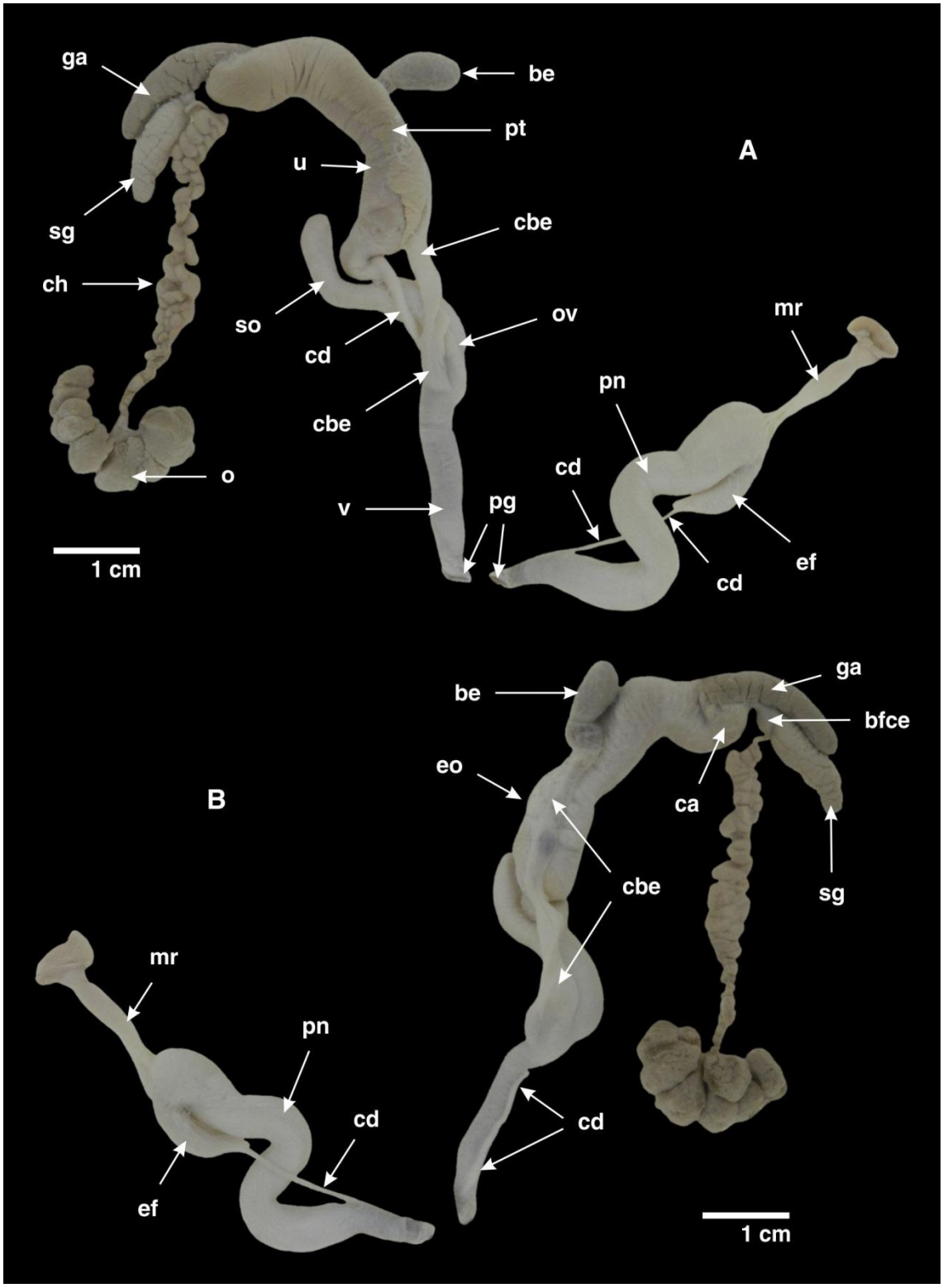

Figura 52. Sistema reproductor de *Megalobulimus abbreviatus*, estructura externa. A: vista externa izquierda; **B**: vista externa derecha.

be, bolsa espermática; **bfce**, bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **ca**, cámara del albumen; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **ch**, conducto hermafrodita; **ef**, epífalo; **eo**, espermoviducto; **ga**, glándula del albumen; **mr**, músculo retractor del pene; **o**, ovotestis; **ov**, oviducto; **pg**, poro genital; **pn**, pene; **pt**, próstata; **sg**, saco glandular anexo; **so**, saco anexo del oviducto; **u**, útero; **v**, vagina.

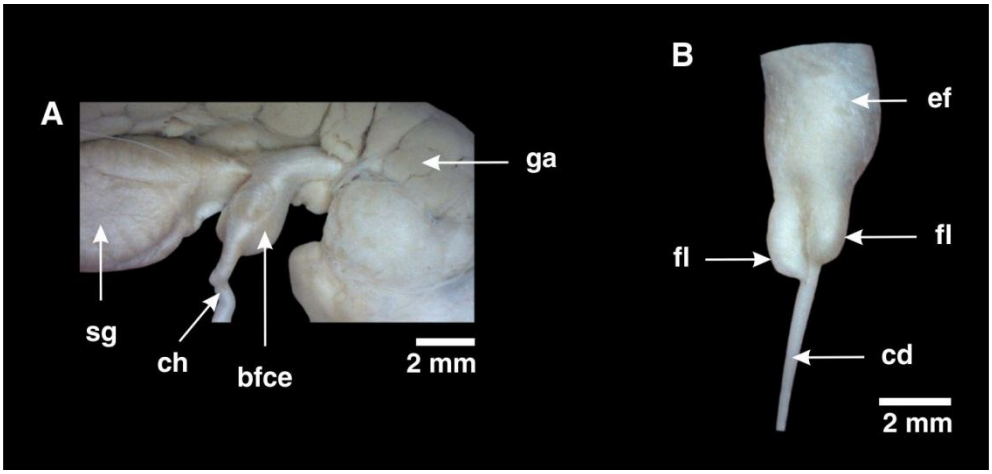

Figura 53. Sistema reproductor de *Megalobulimus abbreviatus*; saco glandular anexo y epífalo. A: vista externa del saco glandular anexo, se muestra en detalle la inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **B**: vista externa parcial del epífalo, se muestra en detalle la inserción del conducto deferente en el epífalo.

bfce, bolsa de fertilización-complejo de la espermateca; **cd**, conducto deferente; **ch**, conducto hermafrodita; **ef**, epífalo; **fl**, flagelo; **ga**, glándula del albumen; **sg**, saco glandular anexo.

Descripción de la Morfología Interna

El **espermoviducto** (Fig. 54A) y sus partes: **útero** y **próstata**, el **conducto de la bolsa espermática** (Fig. 54B: cbe) y la **bolsa espermática** (Fig. 54B: be), el **epífalo** (Fig. 54C: ef) y el **pene** (Fig. 54C: pn) semejantes a *M. o. lorentzianus*. Sin embargo, difiere de esta en el **oviducto** (Fig. 54B: ov) y su **saco anexo**, que presentan pliegues (Fig. 54B: pov, pso) anchos, altos y lisos, intercalados con pliegues finos, bajos y de borde crenulado; entre ambos tipos de pliegues los surcos son muy angostos. Sobre la mitad posterior de la **vagina** (Fig. 54B: v) estos pliegues se continúan (Fig. 54B: pv), predominando los pliegues finos, bajos y de borde crenulado; mientras que sobre la mitad anterior de la vagina, hasta el poro genital (54B: pgf), se hacen lisos (Fig. 54B: pv).

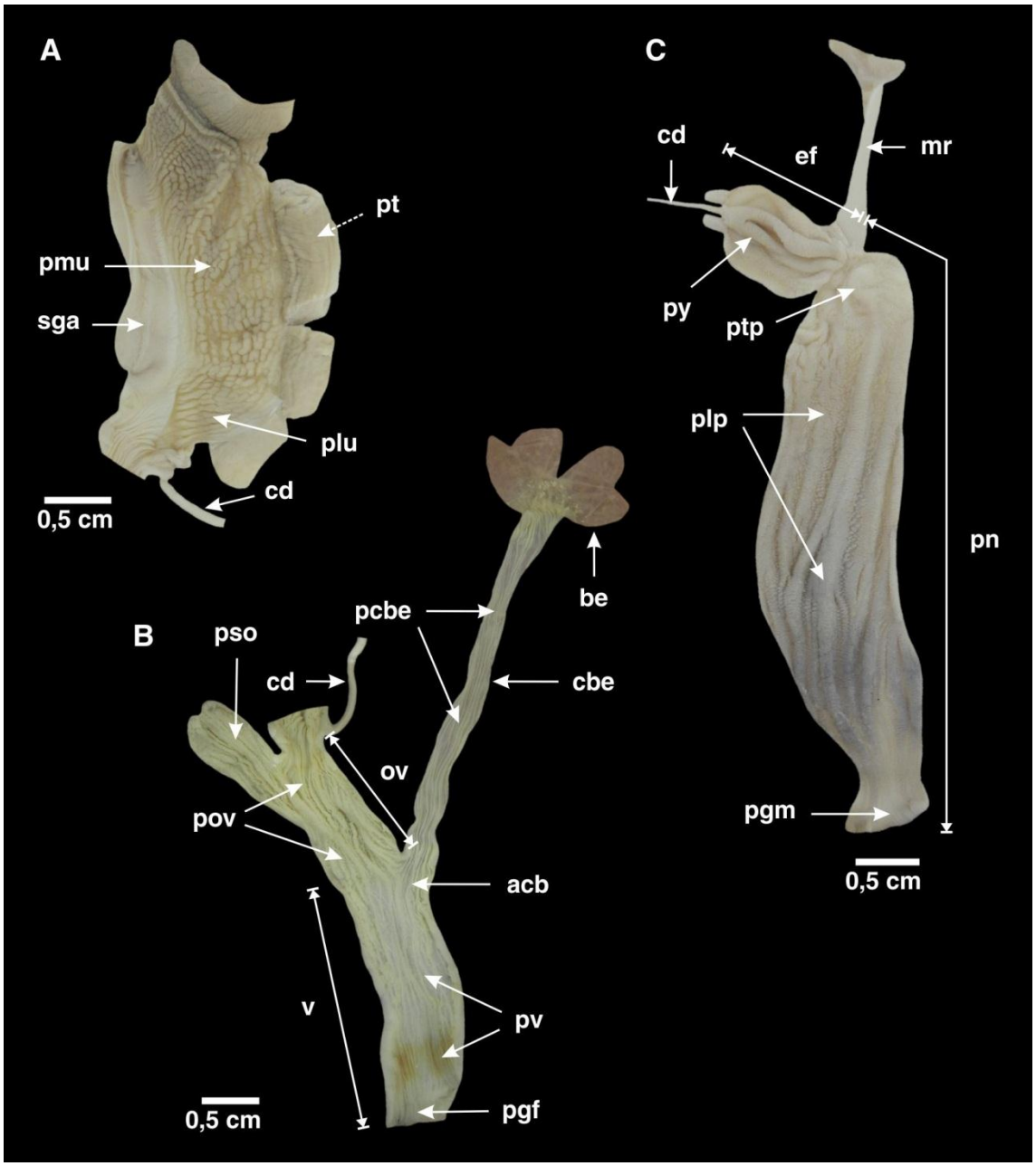

Figura 54. Sistema reproductor de *Megalobulimus abbreviatus*; estructura interna del espermoviducto, porción femenina y masculina. A: vista interna de la superficie del espermoviducto; **B**: vista interna del oviducto, vagina, bolsa espermática y su conducto homónimo; **C**: vista interna del pene y epífalo. Flecha punteada en A indica una estructura no visible en la imagen, pero que se encuentra inmediatamente en dorsal.

acb, abertura del conducto de la bolsa espermática; **be**, bolsa espermática; **cbe**, conducto de la bolsa espermática; **cd**, conducto deferente; **ef**, epífalo; **mr**, músculo retractor del pene; **ov**, oviducto; **pcbe**, pliegues del conducto de la bolsa espermática; **pgf**, poro genital femenino; **pgm**, poro genital masculino; **plp**, pliegues longitudinales del pene; **plu**, pliegues lisos del útero; **pmu**, pliegues membranosos del útero; **pn**, pene; **pov**, pliegues del oviducto; **pso**, pliegues del saco anexo del oviducto; **pt**, próstata; **ptp**, pliegue transversal del pene; **pv**, pliegues vaginales; **py**, pliegue en Y del epífalo; **sga**, surco de plegamiento de la glándula genital accesoria; **v**, vagina.

II.4 DISCUSIÓN

Mientras que *M. o. lorentzianus* y *M. abbreviatus* contaban con antecedentes anatómicos previos (Hylton Scott, 1939; Leme, 1973; Thomé *et al.*, 1994; Fontenelle, 2012), el abordaje de *M. o. musculus* y *M. sanctipauli* presentado en este capítulo constituye el primer antecedente desde sus descripciones originales en 1948 y 1900, respectivamente (Pilsbry, 1900; Bequaert, 1948; Beltramino *et al.*, 2012a; Beltramino, 2013). Los datos anatómicos obtenidos en este estudio para *M. o. musculus* y *M. sanctipauli* coinciden con los ya informados para otros representantes de la familia Megalobulimidae (Leme, 1973).

Hylton Scott (1939) representa el único antecedente conocido que refiere a la anatomía de *M. o. lorentzianus* a la fecha. Comparativamente, los resultados aquí presentados para la morfología del animal vivo, la masa visceral, el complejo paleal, el sistema reproductor (excepto la morfología interna de la porción femenina) y la descripción de la morfología externa del sistema digestivo son concordantes, mientras que la descripción de la morfología interna del reproductor femenino y el sistema digestivo es presentada por primera vez para *M. o. lorentzianus* en este trabajo. Por otra parte, para *M. abbreviatus*, los resultados de la morfología del animal vivo, masa visceral, complejo paleal, sistema digestivo (morfología externa e interna) y sistema reproductor (morfología externa e interna) se ajustan a la descripción anatómica dada para la especie por Leme (1973), Thomé *et al.* (1994) y Fontenelle (2012).

Así como Bequaert (1948) definió las especies y subespecies de *Megalobulimus* mediante una combinación de caracteres conquiliológicos, otros autores han tenido que proceder de la misma manera desde el abordaje anatómico -delimitando combinaciones-, debido a que no hay un sistema de órganos de preferencia o carácter diagnóstico específico en un sentido estricto. Así, la definición y delimitación de entidades de *Megalobulimus* solo es posible de manera comparativa mediante un conjunto de caracteres anatómicos que no necesariamente son propios de cada entidad (Leme, 1973; Leme e Indrusiak, 1995; Simone y Leme, 1998; Borda y Ramírez, 2013). Si bien existen muy pocos antecedentes en el género que incluyan un enfoque anatómico-taxonómico, en los existentes se puede apreciar un esfuerzo para complementar los caracteres conquiliológicos propuestos por Bequaert (1948), comparando especies y/o subespecies del género por su afinidad taxonómica y/o por compartir una región geográfica, *e.g.*

Leme (1989), Leme e Indrusiak (1995), Simone y Leme (1998), Fontenelle (2012), Borda y Ramírez (2013). Más allá del criterio seleccionado por estos autores para efectuar la comparación entre especies y subespecies, todos utilizan principalmente caracteres anatómicos del complejo paleal, sistema digestivo y reproductor, mostrando los caracteres individuales de cada sistema o grupo de órganos que permiten en su conjunto delimitar las entidades.

En este marco, las entidades aquí analizadas comparativamente, presentan diferencias anatómicas que permiten establecer un conjunto de caracteres diagnósticos que define y delimita a cada una de ellas. Así, las principales diferencias encontradas a partir del complejo paleal, sistema digestivo y reproductor pueden resumirse de la siguiente manera:

Complejo Paleal. Los vasos accesorios del pericardio en *M. o. lorentzianus* y *M. sanctipauli* son de recorrido sinuoso, parcialmente ramificados y de calibre decreciente a medida que se alejan del tabique pulmonar, mientras que en *M. o. musculus* y *M. abbreviatus* son de recorrido rectilíneo, las ramificaciones secundarias son numerosas y de trayecto corto, con calibre constante a medida que se alejan del tabique pulmonar. La relación de la extensión antero-posterior del riñón con respecto al tabique pulmonar es de 1:1 en *M. o. lorentzianus* y *M. sanctipauli*, apenas algo menor que la del tabique en *M. o. musculus* y 2/3 en *M. abbreviatus*. El plexo epirrenal se extiende sobre la región anterior del riñón cubriendo 1/4 de su superficie antero-posterior en *M. o. lorentzianus* y *M. sanctipauli* y 1/2 en *M. o. musculus* y *M. abbreviatus*. Los vasos adrectales transversales del surco uretral, en la porción entre el nefrostoma y el fondo de la cavidad paleal, se extienden hasta alcanzar el ápice del riñón en *M. o. musculus*, mientras que en *M. o. lorentzianus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* desaparecen antes de alcanzar el ápice del riñón, quedando este tramo del surco uretral como una continuación del fondo de la cavidad paleal, de superficie lisa.

Sistema Digestivo. El tiflosol intestinal es ancho, liso y de trayecto lineal en *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*, a diferencia de *M. o. musculus* donde es fino y de trayecto ondulante, mientras que en *M. o. lorentzianus* si bien es de trayecto ondulante es ancho y bilobulado longitudinalmente. Con respecto a los pliegues del intestino prevalvular (p1 - p5), en *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* el ancho de p2 es equivalente al del tiflosol intestinal, p3 y p5 son de trayectoria lineal, mientras que en *M. o. lorentzianus* y

M. o. musculus el ancho de p2 es mayor (el doble o más) que el ancho del tiflosol intestinal; p3 y p5 son de trayectoria sinuosa. El pliegue intestinal prevalvular p4 es en *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* de superficie lisa, aunque en *M. sanctipauli* es más angosto que el tiflosol intestinal (aproximadamente 1/3) y de ancho apenas mayor al tiflosol intestinal en *M. abbreviatus*. En *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* la superficie de p4 es irregular (debido a surcos transversales o longitudinales), sin embargo en *M. o. lorentzianus* el ancho de p4 es equivalente al ancho del tiflosol intestinal y en *M. o. musculus* p4 es tres a cuatro veces más ancho que el tiflosol intestinal. En la válvula prerrectal de *M. sanctipauli* los pliegues p3, p4 y p5 alcanzan solo la base de la misma, no extendiéndose sobre su borde lobulado, mientras que en *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus* y *M. abbreviatus* los pliegues cubren y tapizan toda la válvula prerrectal.

Sistema Reproductor. La inserción lateral del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca, la extensión del saco anexo del oviducto mucho menor al oviducto (1/3 a 1/4 de este último) y la extensión del oviducto y la vagina equivalentes diferencian a *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* de *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. Si bien estas últimas dos tienen una inserción basal del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca y la extensión de la vagina es aproximadamente el doble de la del oviducto, *M. sanctipauli* se diferencia de *M. abbreviatus* en la extensión del saco anexo del oviducto, que en la primera es mayor que el oviducto, en una proporción aproximada de 1.5:1 a 2:1, mientras que en la segunda es menor que el oviducto, 1/2 a 2/3 de la extensión de este. El conducto deferente en *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* es de diámetro constante a lo largo de todo su recorrido (desde su surgimiento entre el espermoviducto y el oviducto hasta alcanzar el epífalo), mientras que en *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* no es uniforme, siendo mayor su diámetro en su inicio (entre el espermoviducto y el oviducto) disminuyendo de calibre gradual y progresivamente hasta alcanzar su diámetro menor al final de su recorrido (en la inserción con el epífalo). Además, en *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus* y *M. abbreviatus*, el conducto deferente tienen un trayecto lineal cuando recorre el límite del oviducto con la vagina, mientras que en *M. sanctipauli* el conducto deferente realiza en esta región un recorrido sinuoso describiendo un zigzag corto y apretado. En la inserción del conducto deferente con el

epífalo, este último presenta dos flagelos en *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*, los cuales están totalmente ausentes en *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*.

Internamente, el útero de *M. sanctipauli* presenta pliegues membranosos y lisos muy aplanados a diferencia de *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus* y *M. abbreviatus*. La bolsa espermática en *M. sanctipauli* y *M. o. musculus* presenta pliegues gruesos, ondulantes y fuertemente anastomosados entre ellos formando un entramado, mientras que en *M. o. lorentzianus* y *M. abbreviatus* los pliegues son escasos, lisos, bajos, de corto recorrido y paralelos a los del conducto de la bolsa espermática. En *M. o. lorentzianus* los pliegues de la mitad posterior del oviducto y la mitad anterior de la vagina son lisos separados por surcos angostos, entre ellos se pueden diferenciar pliegues anchos y altos intercalados por pliegues finos y bajos. La mitad anterior del oviducto y la mitad posterior de la vagina forma una zona de transición de los pliegues antes descriptos, vinculada a la abertura del conducto de la bolsa espermática; en esta región los pliegues, separados por amplios surcos, forman una red parcialmente anastomosada. *Megalobulimus o. musculus* presenta pliegues en la mitad anterior del oviducto de características similares a *M. o. lorentzianus*, pero a diferencia de este los pliegues se mantienen constantes en la mitad posterior del oviducto, cambiando bruscamente a la altura de la abertura del conducto de la bolsa espermática por pliegues fuertemente crenulados que se extienden sobre la mitad posterior de la vagina para continuarse sobre la porción final de esta como pliegues bajos y lisos. Al igual que *M. o. musculus*, tanto *M. sanctipauli* como *M. abbreviatus* carecen de una zona de transición de los pliegues entre el oviducto y la vagina; sin embargo, *M. sanctipauli* se caracteriza por presentar en el oviducto pliegues cuya superficie presenta surcos transversales finos y profundos, dándoles un aspecto fuertemente rugoso. Estos se continúan sobre la mitad posterior de la vagina presentando un área central, paralela al eje mayor de la vagina, donde disminuyen en altura; en la mitad anterior de la vagina se continúan como pliegues totalmente lisos. Al igual que *M. o. musculus* y *M. sanctipauli*, *M. abbreviatus* presenta sobre todo el oviducto pliegues longitudinales anchos y altos intercalados por pliegues finos y bajos, pero a diferencia de estas entidades los primeros son pliegues de borde lisos y los segundos de borde crenulado. Además, el mismo patrón se continúa sobre la mitad posterior de la vagina, predominando los pliegues bajos, los que se continúan sobre el tramo final de la vagina como pliegues lisos y finos. Por último, en *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* los pliegues longitudinales del pene se

extienden sobre la región posterior del pene, y solo uno de ellos se fusiona al pliegue transversal del pene, mientras que en *M. o. lorentzianus* este pliegue se encuentra aislado de los pliegues longitudinales del pene, los cuales finalizan su recorrido antes de alcanzar la región posterior del mismo.

Como ya fuera mencionado en el capítulo I, a partir del material analizado para esta tesis no se pudo identificar conquiliológicamente a *M. o. oblongus*. Sin embargo, esta entidad cuenta con antecedentes anatómicos para el sistema reproductor. Jaramillo Roldán *et al.* (2014) presentan la anatomía de este sistema (morfología externa e interna del espermoviducto, epífalo y pene) y la primera caracterización genética para especímenes de seis localidades de Colombia. Según estos autores, los individuos analizados correspondieron a *M. oblongus*, ya que sus resultados concordaron con la anatomía del sistema reproductor dada por Baker (1926) para esta especie. Sin embargo, al parecer Jaramillo Roldán *et al.* (2014) no contemplaron la anatomía externa presentada por Semper (1870) e Ihering (1891) para el mismo sistema en *M. oblongus*, ya que no hacen referencia a estos últimos autores en su trabajo. A partir del análisis comparativo entre los resultados aquí presentados con la anatomía de *M. oblongus* informada por los autores antes mencionados (Semper, 1870; Ihering, 1891; Baker, 1926; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014) se pueden indicar las siguientes diferencias principales: en *M. oblongus* el calibre del conducto deferente no es uniforme en su trayecto presentando las mismas características antes dadas para *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*, diferenciándose de *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*; la extensión del oviducto y la vagina en *M. oblongus* es equivalente, al igual que en *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* pero difiriendo de *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. Además, el oviducto es mucho más grueso que la vagina (más del doble) en *M. oblongus*, mientras que en las cuatro entidades aquí analizadas el grosor del oviducto y la vagina es constante. Internamente, ninguno de los pliegues longitudinales del pene en *M. oblongus* se fusiona con el pliegue transversal del pene, lo que concuerda únicamente con lo observado para *M. o. lorentzianus*. Por último, probablemente la característica más distintiva de *M. oblongus*, que permite diferenciarlo de las cuatro entidades aquí analizadas, se encuentra externamente en la porción masculina del aparato reproductor. Mientras que *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* no presentan flagelos en la región de la inserción del conducto deferente con el epífalo, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*

presentan dos, a diferencia de *M. oblongus* que posee un solo flagelo prominente, constituyéndose en un estado intermedio del carácter.

Por otra parte, los resultados anatómicos aquí presentados apoyan la identificación conquiliológica de los especímenes procedentes de Corrientes y sur de Misiones como *M. abbreviatus* (Leme, 1973; Thomé *et al.*, 1994; Fontenelle, 2012), diferenciándolos además de *M. o. lorentzianus*, y sobre todo de *M. o. musculus* y *M. sanctipauli*, como ya fuera mencionado a lo largo de esta discusión. Sin embargo, resulta oportuno mencionar las principales diferencias anatómicas que permiten diferenciar a *M. abbreviatus* de *M. granulosus* y *M. paranaguensis*. Todas ellas, junto a *M. foreli* (que no cuenta con antecedentes anatómicos a la fecha), son consideradas como un grupo de entidades estrechamente relacionadas (Bequaert, 1948; Fontenelle, 2012). Es así que *M. paranaguensis* se diferencia de *M. abbreviatus* por presentar un tiflosol intestinal bilobulado (con un surco que corre longitudinalmente en su ápice) y un pliegue prevalvular p4 no liso (con pliegues oblicuos) (Fontenelle, 2012). Por su parte, *M. granulosus* se diferencia de *M. abbreviatus* en los pliegues prevalvulares, por presentar p1 tan ancho como el tiflosol intestinal y p4 aproximadamente 1/3 del ancho del tiflosol intestinal (Leme, 1973; Fontenelle, 2012). Al mismo tiempo, *M. paranaguensis* y *M. granulosus* se diferencian de *M. abbreviatus* por no presentar flagelos en la región de inserción entre el conducto deferente y el epífalo, y por los pliegues longitudinales del pene que cuando alcanzan la región próxima al epífalo, solo uno de ellos se continúa y fusiona con el pliegue transversal del pene, mientras que el resto se fusionan entre sí formando un ancho cinturón macizo, el que queda separado del pliegue transversal del pene por un amplio surco (Fontenelle, 2012).

Para finalizar, a partir del presente abordaje anatómico fue posible evidenciar diferencias para un conjunto de caracteres anatómicos que complementan las diagnosis de *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. Así, esta información conjugada con la evidencia conquiliológica resulta de utilidad para delimitar de mejor manera las entidades presentes en la Argentina, y en particular aquellas que se registran en la provincia de Misiones.

CAPITULO III: GENÉTICA

III.1 INTRODUCCIÓN

Las técnicas basadas en ADN ofrecen a la taxonomía una manera rápida y objetiva para caracterizar la biodiversidad. El enfoque más extendido en este campo consiste en analizar la variación genética con el fin último de definir y delimitar especies (Tautz *et al.*, 2003; López Soriano, 2004; Hebert y Gregory, 2005; Fontaneto *et al.*, 2015). A tal efecto, diversas metodologías han sido propuestas en la literatura, algunas de las cuales solo hacen uso de datos genéticos (comúnmente distancias genéticas y reconstrucciones filogenéticas), sin considerar otras fuentes de información biológica (Fontaneto *et al.*, 2015). De acuerdo con Hebert *et al.* (2004) es posible emplear un umbral de divergencia para delimitar especies y la idea subyacente es que la divergencia intraespecífica sea menor que la divergencia interespecífica (Hebert *et al.*, 2004; Frézal y Leblois, 2008). Esta propuesta fue sugerida sobre la base de evidencia empírica, obtenida para grandes conjuntos de secuencias, a partir de la universalización del marcador mitocondrial "Citocromo Oxidasa subunidad I" (COI) como código de barra genético para la identificación de especies (Hebert *et al.*, 2003a; Birky *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de que la utilización de umbrales de divergencia ha resultado eficiente en diversos grupos animales como arañas, aves, crustáceos, lepidópteros y peces, entre otros (*e.g.* Hebert *et al.*, 2003b, 2004; Ward *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006), su uso generalizado ha sido ampliamente cuestionado (Meyer y Paulay, 2005; Hickerson *et al.*, 2006; Birky, 2007; Frézal y Leblois, 2008; Birky *et al.*, 2010; Heethoff *et al.*, 2011). Por otra parte, basar la definición y delimitación de especies estrictamente sobre criterios genéticos, puede conducir a una sobrestimación en su número. Por lo cual, es necesario que la información genética empleada en taxonomía sea apoyada por otro tipo de evidencia que la valide, o viceversa, donde la información genética resulte complementaria a otro tipo de observaciones (Davison *et al.*, 2009; Fontaneto *et al.*, 2015).

Para moluscos terrestres, en un estudio relativamente reciente, Davison *et al.* (2009) estimaron valores de divergencia media para COI cercanos al 3% dentro de las especies y del 12% entre especies. No obstante, estos autores señalan que no es posible hacer generalizaciones, dado que este grupo de moluscos presenta asimetría en el grado

de variación, pudiendo presentar valores dentro de las especies muy altos y cercanos al 30% en algunos casos; mientras que entre las especies esta variación puede ser bastante baja y del orden del 1%. Así, aplicar un criterio tal como el de Hebert *et al.* (2004) resulta desaconsejable en estos organismos ante la imposibilidad de definir un valor umbral único para el grupo (López Soriano, 2004; Davison *et al.*, 2009). En este sentido, la utilización de códigos de barras genéticos y umbrales para delimitar especies debería ajustarse de acuerdo a los casos analizados, lo cual resulta problemático sobre todo si los taxones abordados cuentan con pocos antecedentes genéticos y un historial taxonómico complejo. Sin embargo, para estos casos la combinación de la caracterización genética con enfoques más tradicionales (*e.g.* conquiliológicos, anatómicos y ecológicos) suele resultar muy útil para la delimitación de las entidades (DeSalle *et al.*, 2005; Davison *et al.*, 2009).

En este contexto, vale destacar que el género *Megalobulimus* es uno de los grupos de moluscos terrestres para el cual pocos antecedentes genéticos están disponibles, los que se restringen a dos abordajes con enfoque taxonómico llevados a cabo por Ramírez *et al.* (2012) y Jaramillo Roldán *et al.* (2014). De estos dos estudios, solo el último, que refiere a *M. oblongus*, complementa la información genética con evidencia conquiliológica y anatómica. Asimismo, es pertinente mencionar que secuencias de un individuo de *Megalobulimus* han sido utilizadas por Wade *et al.* (2006) y Breure y Romero (2012) en filogenias profundas de Stylommatophora y en reconstrucciones de Orthalicoidea (como grupo externo), respectivamente. Es así que al presente solo están depositadas 36 secuencias de *Megalobulimus* en GenBank, las que corresponden a los marcadores genéticos 16S ARNr, COI, Histona 3 y 5.8S ARNr (Wade *et al.*, 2006; Breure y Romero, 2012; Ramírez *et al.*, 2012; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). En su conjunto estas secuencias representan a nueve entidades de *Megalobulimus*, las que en su mayoría proceden de Perú (Ramírez *et al.*, 2012) y Colombia (Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). Para el primer país, Ramírez *et al.* (2012) caracterizaron genéticamente a *M. capillaceus*, *M. lichtensteini*, *M. maximus maximus*, *M. m. huascari*, *M. popelairianus popelairianus*, *M. p. thammianus* y *M. separabilis*. Por su parte, Jaramillo Roldán *et al.* (2014) caracterizaron a *M. oblongus* de Colombia, comparando sus resultados con las siete entidades abordadas por Ramírez *et al.* (2012), e incorporando una secuencia de *M. parafragilior* de Brasil obtenida por Breure y Romero (2012). Tanto Ramírez *et al.* (2012) como Jaramillo Roldán *et al.* (2014)

basaron sus análisis principalmente en los marcadores 16S ARNr y COI, mediante los cuales estimaron número de haplotipos, variabilidad intra e interespecífica y efectuaron reconstrucciones filogenéticas. De los resultados obtenidos en ambos estudios se evidencia que los haplotipos reconocidos para cada entidad constituyen grupos discretos en las reconstrucciones filogenéticas. Además, estas investigaciones dan cuenta que el marcador 16S ARNr tiene una mayor tasa de éxito que COI tanto en la amplificación como en su utilidad para delimitar las especies, a raíz de lo cual, el primer marcador fue sugerido como código de barras genético para *Megalobulimus*. Complementariamente, estimaron valores de variabilidad intraespecífica en el rango de 0 - 3,45% e interespecífica de 9,49 - 23,36%. No obstante, en ambos estudios también se evidenciaron valores de variabilidad interespecífica del orden del 1,8% entre ciertas entidades, en coincidencia con la asimetría de la variabilidad genética observada por Davison *et al.* (2009) para moluscos terrestres.

Para las entidades de *Megalobulimus* presentes en la Argentina, solo se cuenta con algunos antecedentes genéticos presentados en reuniones científicas. Estos resultan de Beltramino *et al.* (2012b) con la puesta a punto de la amplificación de los marcadores mitocondriales COI y Cyt *b* para *M. sanctipauli*, y Beltramino *et al.* (2015b) en donde se exponen los resultados parciales de la secuenciación del genoma mitocondrial de *M. o. lorentzianus*. Sin embargo, las entidades del género citadas para el territorio nacional aún no cuentan con antecedentes que impliquen la caracterización genética desde una perspectiva taxonómica. Por lo expuesto, en el presente capítulo se caracterizó genéticamente a *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* en busca de evidencia genética que pueda ser contrastada con la información conquiliológica, anatómica y de distribución presentada previamente, con el objeto final de complementar y respaldar las diagnosis de estas cuatro entidades.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

III.2.1 MATERIAL DE ESTUDIO Y ACONDICIONAMIENTO

Como fuera mencionado en la sección Materiales y Métodos del capítulo II (II.2.1 Material de Estudio y Acondicionamiento), una vez que los individuos fueron sacrificados y previo a la fijación de las partes blandas, se resguardaron muestras de tejido de la masa muscular del pie de cada ejemplar (aproximadamente 0,25 cm^3) para los estudios genéticos. Las muestras fueron preservadas en microtubos de 1,5 ml que contenían 1 ml de alcohol absoluto, el cual fue remplazado dos veces por semana durante tres semanas, y resguardadas a -20ºC hasta el momento de proceder a la extracción de ADN. Para aquellos individuos que ya habían sido sacrificados previamente a esta tesis doctoral se procedió de igual manera.

De las cuatro entidades identificadas conquiliológicamente en el capítulo I, en el presente abordaje se utilizaron 42 individuos de *Megalobulimus*, 30 adultos y 12 juveniles de diferentes tallas. La trazabilidad de todos los individuos incluidos en este capítulo y en los capítulos anteriores se presenta en la Tabla XI.

Tabla XI. Material empleado en el análisis genético. $ID^{MC/MG\ (Tabla\ III)}$ indica el número que identifica a la concha que fue incluida en los análisis de morfometría (MC y MG), Tabla III del capítulo I; * indica una concha perteneciente al mismo lote que el individuo analizado genéticamente. $ID^{D\ (Tabla\ IX)}$ indica el número de lote que fue incluido en el mapeo de la distribución, Tabla IX del capítulo I. $ID^{A\ (Tabla\ X)}$ indica el número que identifica al individuo incluido en el abordaje anatómico, Tabla X del capítulo II. # indica que el individuo corresponde a un juvenil.

ID	LOTE / INDIVIDUO	$ID^{MC/MG\ (Tabla\ III)}$	$ID^{D\ (Tabla\ IX)}$	$ID^{A\ (Tabla\ X)}$
	M. o lorentzianus			
1	MLP-Ma 14079/1	25	2	1
2	MLP-Ma 14079/1	26	2	-
3	MLP-Ma 14080/1	27	3	2
4	MLP-Ma 14081/1	28	4	3
5	MLP-Ma 14082/1	29	5	4
6	MLP-Ma 14082/2#	-	5	-
7	MLP-Ma 14083/1	30	6	5
8	MLP-Ma 14083/2#	-	6	-
9	MLP-Ma 14083/3#	-	6	-
10	MLP-Ma 14083/4#	-	6	-

MLP-Ma, Colección Malacológica del Museo de La Plata.

Tabla XI. Continuación.

ID	LOTE / INDIVIDUO	ID$^{MC/MG}$ (TABLA III)	ID^{D} (TABLA IX)	ID^{A} (TABLA X)
	M. o lorentzianus			
11	MLP-Ma 14084/1	31	7	6
12	MLP-Ma 14084/2	-	7	7
13	IFML-Moll 15857/1	32	1	8
14	MLP-Ma 14085/1	33	8	9
15	MLP-Ma 14085/2#	-	8	-
16	MLP-Ma 14086/1	34	9	10
17	MLP-Ma 14086/2	-	9	11
18	MLP-Ma 14087/1	35	10	12
19	MLP-Ma 14088/1	36	11	13
	M. o. musculus			
20	IFML-Moll 15858/1	40	14	14
21	IFML-Moll 15858/2	41	14	15
22	MLP-Ma 14091/1	42	15	16
23	MLP-Ma 14091/2#	-	15	-
24	MLP-Ma 14092/1	43	16	17
25	MLP-Ma 14092/2#	-	16	-
	M. sanctipauli			
26	MLP-Ma 14097/1	55	21	-
27	MLP-Ma 14097/2	56	21	18
28	MLP-Ma 14097/3	-	21	19
29	MLP-Ma 14097/4#	-	21	-
30	MLP-Ma 14097/5#	-	21	-
31	MLP-Ma 14098/1	57	22	20
32	MLP-Ma 14099/1	58	23	21
	M. abbreviatus			
33	MLP-Ma 14125/1	1	46	22
34	MLP-Ma 14126/1	2	47	23
35	MLP-Ma 14127/1#	-	48	-
36	MLP-Ma 14128/1	-	49	24
37	MLP-Ma 14128/2#	-	49	-
38	MLP-Ma 14128/3#	-	49	-
39	MLP-Ma 14129/1	3	50	25
40	MLP-Ma 14129/2	4	50	26
41	MLP-Ma 14121/3	- (23*, 24*)	45	-
42	MLP-Ma 14130/2	- (22*)	51	27

MLP-Ma, Colección Malacológica del Museo de La Plata. **IFML-Moll**, Colección Malacológica del Instituto Fundación Miguel Lillo - Tucumán.

III.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL

La extracción de ADN genómico total a partir de tejido muscular se realizó siguiendo un protocolo de CTAB estándar, el cual fue adaptado en el LGM-DZI-MLP para las entidades de *Megalobulimus*:

a) Disgregación

Se colocó el tejido en un microtubo de 1,5 ml estéril libre de ADNasas y ARNasas. Previa evaporación del remanente de alcohol absoluto por 10 min a temperatura ambiente, se le adicionaron 100 µl de *buffer* CTAB (2% p/v de CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2% p/v de 2-mercaptoetanol, 20 mM EDTA y 100 mM Tris/HCl a pH 7,5), y posteriormente mediante una varilla de vidrio se disgregó el tejido.

b) *Digestión*

Al microtubo que contenía el tejido disgregado se le adicionaron 400 µl de *buffer* CTAB y 2 µl de proteinasa K (10 mg/ml). La muestra se incubó en baño húmedo a 60°C *"overnight"* (*ON*).

c) Extracción orgánica

Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados orgánicos con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Finalizando cada lavado orgánico, se realizó una centrifugación de 10 min a 10.000 *g*, después de la cual se descartó la fase orgánica (inferior) y trasvasó la fase acuosa (superior) a un nuevo microtubo (1,5 ml) para ser empleada en los sucesivos pasos de la extracción orgánica y posterior precipitación.

d) Precipitación

Del último lavado orgánico se trasvasó a un nuevo microtubo la fase acuosa (superior) y se le agregó 2/3 (v/v) de alcohol isopropílico. El contenido fue homogeneizado por inversión y llevado a -20°C durante 12 hs. Finalmente, la muestra fue centrifugada durante 10 min a 12.000 *g*, descartando el sobrenadante por volcado. El precipitado (*pellet* de ADN) se dejó secar a temperatura ambiente por 24 hs. Finalmente el ADN genómico total fue resuspendido en Tris/HCl 10 mM y preservado a 4ºC hasta el momento de su utilización.

e) Verificación de la extracción

El éxito y rendimiento de las extracciones fue verificado mediante electroforesis horizontal (5 V/cm) en geles de agarosa al 1% (p/v) teñidos con bromuro de etidio -bret- (0,5 mg/ml) (Green y Sambrook, 2012). A los efectos de verificar cantidad y calidad del ADN extraído se emplearon marcadores moleculares de peso y masa conocida (1 Kb *DNA Ladder*, Productos Bio-Lógicos y QuantiMarker, Biodynamics). Los geles fueron fotografiados bajo luz UV en un transiluminador UVP-TM-20 (Upland, CA). La fotodocumentación se llevó a cabo con una cámara Nikon Coolpix P500 36X, utilizando lente *close up* y filtros para luz UV y bret.

III.2.3 Amplificación de Genes Mitocondriales

Mediante el empleo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) el ADN genómico total de cada individuo fue empleado para obtener amplicones de tres marcadores genéticos mitocondriales. Estos marcadores corresponden a secuencias parciales del "gen ribosomal mitocondrial 16S" (16S ARNr) y los genes codificantes para proteínas mitocondriales "Citocromo Oxidasa subunidad I" (COI) y "Citocromo *b*" (Cyt *b*). Los marcadores fueron seleccionados en función de su capacidad para evidenciar variabilidad genética intra e interespecífica en moluscos (Folmer *et al.*, 1994; Merritt *et al.*, 1998; Ramirez *et al.*, 2009; Gutiérrez Gregoric *et al.*, 2013b) y en particular por haber sido empleados en estudios de especies de *Megalobulimus* de la Amazonia peruana y de Colombia (*i.e.* 16S y COI; Ramírez *et al.*, 2012; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). Para la amplificación de 16S ARNr y Cyt *b* se optó por cebadores específicos para moluscos, mientras que para COI fueron cebadores universales para invertebrados (Tabla XII). En todos los casos la síntesis de los cebadores fue realizada por las empresas Eurofins MWG-Operon a través de Tecnolab S.A., Integrated DNA Technologies (IDT) a través de Biodynamics S.R.L. o Macrogen Inc., Corea.

Tabla XII. Cebadores utilizados para la amplificación de las regiones parciales de los genes 16S ARNr, COI y Cyt *b*.

CEBADORES	SECUENCIA	*Tm*	TEA	REFERENCIA
16S ARNr				
16SF-104	5´- GAC TGT GCT AAG GTA GCA TAA T -3´	58,4°C	330 pb	Jaramillo Roldán *et al.* (2014)
16SR-472	5′- TCG TAG TCC AAC ATC GAG GTC A -3′	62,1°C		
COI				
LCO 1490	5´-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3′	50,5°C	700 pb	Folmer *et al.* (1994)
HCO 2198	5´-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3′	55,3°C		
Cyt *b*				
UCYTB151F	5′-TGT GGR GCN ACY GTW ATY ACT AA-3′	61°C	430 pb	Merritt *et al.* (1998)
UCYTB270R	5′-AAN AGG AAR TAY CAY TCN GGY TG-3′	61°C		

TEA: Tamaño esperado aproximado del producto de amplificación según la literatura.

Para definir las condiciones óptimas de PCR para cada marcador genético se ensayaron diversas combinaciones. Estas incluyeron modificaciones en el ciclado (*i.e.* número de ciclos, tiempo y temperatura de las rampas de desnaturalización, hibridación, extensión) como en la mezcla de reacción (composición y concentración de sus componentes, *e.g.* Cl_2Mg, dNTPs, *Taq* polimerasa). Para 16S ARNr se tomó como punto de partida el perfil térmico descripto por Jaramillo Roldán *et al.* (2014) y para Cyt *b* se usó como base el de Merritt *et al.* (1998). Para COI, y dado que esta región se ha estandarizado mundialmente como la región de elección para la obtención de códigos de barras de ADN o *DNA barcodes* en animales, la mezcla de reacción y el perfil de ciclado se ajustaron a partir de la descripción de Ivanova y Grainger (2006) disponible en la página del *Canadian Centre for DNA Barcoding*[1]. Las condiciones definitivas de los parámetros físicos y químicos de las PCRs se muestran en la Tabla XIII y XIV, respectivamente. En todos los casos las amplificaciones se realizaron en termocicladores Perkin Elmer (Modelo 1988) e Ivema Desarrollos (Modelo T-18/2013) (Tabla XIV).

[1]http://www.dnabarcoding.ca

Tabla XIII. Composición de la mezcla de reacción utilizada en la amplificación del 16S ARNr, COI y Cyt *b*.

Componente	Concentración final		
	16S ARNr	COI	Cyt *b*
Buffer	[1X]	[1X]	[1X]
Cl_2Mg	[1,25 mM]	[2,5 mM]	[1,5 mM]
Mix dNTPs	[0,2 mM]	[0,05 mM]	[0,2 mM]
Cebador forward	[0,2 µM]	[0,1 µM]	[0,5 µM]
Cebador reverse	[0,2 µM]	[0,1 µM]	[0,5 µM]
Taq Polimerasa*	[1,0 U]	[1,2 U]	[1,0 U]
Templado de ADN	[50-100 ng]	[50-100 ng]	[50-100 ng]
H2O ultrapura	c.s.p.	c.s.p.	c.s.p.
Volumen Final	30 µl	50 µl	50 µl

**Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, #10966-020). Entre corchetes se especifica la concentración final por reacción. c.s.p., cantidad suficiente para.

Tabla XIV. Detalle de los perfiles térmicos (PT) optimizados y empleados en la amplificación del 16S ARNr, COI y Cyt *b*.

Parámetros físicos	Perfil de ciclado		
	16S ARNr	COI	Cyt *b*
Desnaturalización inicial	---	94°C (3 min)	94°C (4 min)
Ciclos	35 ciclos	5 ciclos	38 ciclos
Desnaturalización	94°C (30 seg)	94°C (30 seg)	94°C (40 seg)
Hibridación	48°C (30 seg)	45°C (40 seg)	48°C (40 seg)
Extensión	72°C (1 min)	72°C (1 min)	72°C (1 min)
Ciclos	---	35 ciclos	---
Desnaturalización	---	94°C (30 seg)	---
Hibridación	---	51°C (40 seg)	---
Extensión	---	72°C (1 min)	---
Extensión final	72°C (1 min)	72°C (10 min)	72°C (6 min)
Termociclador	1	2	2

1 Ivema Desarrollos. 2 Perkin Elmer

La evaluación del éxito de las PCRs (obtención de los amplicones esperados y presencia de producto inespecífico) se efectuó mediante electroforesis horizontal (5 V/cm) en geles de agarosa al 1,5% (p/v) teñidos con bret (0,5 mg/ml) (Green y Sambrook, 2012). A los efectos de poder referenciar el tamaño de los amplicones se empleó el marcador 100 pb *Ladder* (Productos Bio-Lógicos). Finalizada la corrida electroforética se efectuó un análisis visual preliminar de los geles de agarosa, revelados bajo luz UV en transiluminador UVP-TM-20 (Upland, CA). Luego del análisis visual, los geles fueron fotografiados empleando una cámara Nikon Coolpix P500 36X, y utilizando lente *close up* y filtros para luz UV y bret.

III.2.4 Purificación y Secuenciación

Con el objeto de remover potenciales contaminantes que pudieran interferir durante el proceso de secuenciación, se realizó la purificación de los amplicones obtenidos. Para tal efecto se utilizó el kit *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, #27-9602-01) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente, los productos de PCR purificados fueron enviados para su secuenciación en ambos sentidos a Macrogen Inc., Corea. Los electroferogramas fueron analizados y editados mediante los programas Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd.) y Clustal X 2.02 (Larkin *et al.*, 2007) para la obtención de las secuencias consenso de cada individuo. La valoración de la calidad y especificidad de las secuencias se realizó a través de los valores de calidad (QV *scores*) provistos por el servicio de secuenciación, mediante inspección visual (Fontaneto *et al.*, 2015) y por comparación con secuencias depositadas en GenBank mediante el algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1990).

III.2.5 Análisis Bioinformático

El análisis bioinformático fue realizado de forma independiente para cada marcador mitocondrial (*i.e.* 16S ARNr, COI y Cyt *b*), incluyendo todas las secuencias obtenidas para cada uno de ellos. Debido a que no se obtuvo material de *M. oblongus*, se incluyeron adicionalmente secuencias de esta entidad disponibles en GenBank[2] para los genes 16S ARNr (KJ546457) y COI (KJ546458) obtenidas a partir de individuos de Colombia por Jaramillo Roldán *et al.* (2014).

[2]http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Para el abordaje filogenético, el grupo externo estuvo constituido por los megamoluscos nativos *Austroborus dorbignyi* y *Anthinus albolabiatus* (Strophocheilidae). La primera especie estuvo representada a partir de dos individuos recolectados en Sierra de la Ventana, Buenos Aires (MLP-Ma 14122 y MLP-Ma 14123). *Anthinus albolabiatus* fue caracterizada a partir de un individuo recolectado en el extremo sur de la provincia de Misiones (MLP-Ma 14124).

III.2.5.1 Caracterización de la Variabilidad Genética

La variabilidad genética de los marcadores mitocondriales para cada entidad de *Megalobulimus* (*M. o. oblongus*, *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*) se caracterizó a través del programa DnaSP v5.10 (Librado y Rozas, 2009). Este software permite cuantificar el polimorfismo de secuencias de ADN, y para ello se estimaron distintos índices, a saber: diversidad nucleotídica (π), número de sitios segregantes (S), número de haplotipos (h) y diversidad haplotípica (H_D). La diversidad nucleotídica computa el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio; es decir, la probabilidad de que dos secuencias aleatorias sean diferentes en un sitio determinado (Nei y Li, 1979; Rozas, 2009). El número de sitios segregantes representa el número de posiciones nucleotídicas variables (es decir polimórficas) en una muestra de secuencias de ADN, y no está sujeto a la frecuencia de las variantes de nucleótidos dentro de la muestra de secuencias (Watterson, 1975; Rozas, 2009). El número de haplotipos indica la cantidad de secuencias diferentes dentro de una muestra de secuencias de ADN (Rozas, 2009), mientras que la diversidad haplotípica, basada en la frecuencia relativa de haplotipos, considera la probabilidad de que dos secuencias aleatorias sean diferentes (Nei, 1987; Rozas, 2009).

A partir de los conjuntos de secuencias parciales de los genes COI y Cyt *b*, para cada entidad de *Megalobulimus* se realizó un alineamiento múltiple de secuencias a través del programa Clustal X 2.02 (Larkin *et al.*, 2007), con los parámetros por defecto. Para el marcador mitocondrial no codificante 16S ARNr el alineamiento se realizó en MAFFT[3] (Katoh *et al.*, 2009), el cual es recomendado para este tipo de marcador dado que a menudo exhibe *indels* (inserciones - deleciones) de varios tamaños (Fontaneto *et al.*, 2015). Posteriormente, los alineamientos de cada marcador mitocondrial se utilizaron para la visualización de los haplotipos y de sitios polimórficos mediante el

[3]web servidor: http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/

programa BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999). Con el mismo programa, cada haplotipo identificado fue caracterizado a partir de aspectos composicionales (cantidad de cada una de las bases, frecuencia relativa, contenido de G+C y A+T).

III.2.5.2 Estimación de Distancias Genéticas

Se estimaron valores de distancias genéticas (no corregidas y corregidas) entre todos los haplotipos identificados para cada marcador por entidad. La distancia no corregida *p*, estima la proporción (*p*) de sitios nucleotídicos en las cuales dos secuencias son diferentes, tratando a todas las sustituciones de nucleótidos (o mutaciones puntuales) con el mismo valor o costo evolutivo (Nei y Kumar, 2000). Para la distancia corregida se empleó el modelo de sustitución nucleotídica de *Kimura dos Parámetros* (K2P), el que asume diferentes posibilidades para las sustituciones de nucleótidos según sean transiciones (cambio entre bases púricas: A ↔ G y pirimidinicas: T ↔ C) o transversiones (purina ↔ pirimidina) (Nei y Kumar, 2000). Los cálculos de las distancias fueron ejecutados con el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011).

III.2.5.3 Abordajes Filogenéticos

Las relaciones entre las cinco entidades de *Megalobulimus* se reconstruyeron mediante dos abordajes filogenéticos realizados independientemente para cada marcador. Si bien existen varias formas en que la filogenia puede ser reconstruida a partir de datos genéticos (Freeland, 2005), en este trabajo se emplearon métodos de distancia (*i.e. Neighbor Joining*, con el modelo K2P) e Inferencia Bayesiana. Esta elección se hizo sobre la base de los antecedentes filogenéticos utilizados para establecer relaciones evolutivas entre entidades de *Megalobulimus* de Perú y Colombia (Ramírez *et al.*, 2012; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). Por otra parte, para cada conjunto de secuencias se realizaron alineamientos múltiples tal como fuera descripto precedentemente (apartado III.2.5.2). Para los tres marcadores el grupo externo estuvo constituido por *Austroborus dorbignyi* y *Anthinus albolabiatus*. Los seis árboles resultantes de los abordajes realizados fueron editados con TreeGraph 2 (Stöver y Müller, 2010) y CorelDRAW X7.

Análisis de Distancia

El algoritmo empleado para reconstruir árboles a partir de la distancia genética fue el método de *Neighbor Joining* (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Este se basa en el principio de evolución mínima (*i.e.* el mejor árbol es aquel que minimiza la longitud total del árbol). El método no examina todas las topologías posibles, sino que busca encontrar secuencialmente "vecinos" que minimicen la longitud total del árbol (Schneider, 2007). El análisis de distancia, mediante el algoritmo de *Neighbor Joining* (Saitou y Nei, 1987), fue realizado con el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011), empleando el modelo K2P para el cálculo de las distancias evolutivas. Los valores de confiabilidad de los nodos se obtuvieron mediante *bootstrapping* (Felsenstein, 1985) basado en 1.000 réplicas.

Análisis de Inferencia Bayesiana

La Inferencia Bayesiana (IB) está basada en modelos específicos de evolución molecular (Peña, 2011) que incluyen diferentes tasas de transiciones y transversiones así como heterogeneidad en las tasas de sustitución en una determinada fracción de la secuencia de ADN (Freeland, 2005). El análisis de IB fue realizado mediante el programa Mr. Bayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012), con dos corridas simultáneas y cuatro cadenas de Markov, que fueron corridas por 10^6 generaciones, con una frecuencia de muestreo cada 100 generaciones. Las salidas fueron evaluadas con el programa Tracer 1.5.0 (Rambaut y Drummond, 2009), determinándose un *burn-in* de 1.000 árboles, por lo cual el consenso final estuvo basado en 18.000 árboles. El valor de soporte de nodos fue expresado como probabilidad *a posteriori* (*i.e.* credibilidad).

III.3 RESULTADOS

III.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO TOTAL

El protocolo de CTAB modificado permitió obtener ADN en cantidad y calidad suficiente para la mayoría de los individuos, siendo los mismos aptos para ser utilizados en la técnica de PCR. La semicuantificación del ADN extraído permitió establecer una concentración superior a los 500 ng/µl en la mayoría de las muestras. En estos casos el ADN se evidenció en la electroforesis como una banda de alto peso molecular sin signos de degradación. A modo de ejemplificar las extracciones en la Fig. 55A se muestran los individuos MLP-Ma 14092/1 (*M. o. musculus*) y MLP-Ma 14128/1 (*M. abbreviatus*). Algunas muestras presentaron un bajo rendimiento (menor a 500 ng/µl) aunque con banda de alto peso molecular sin evidencias de degradación. A modo de ejemplo se presenta el individuo MLP-Ma 14097/5 (*M. sanctipauli*) en la Fig. 55B.

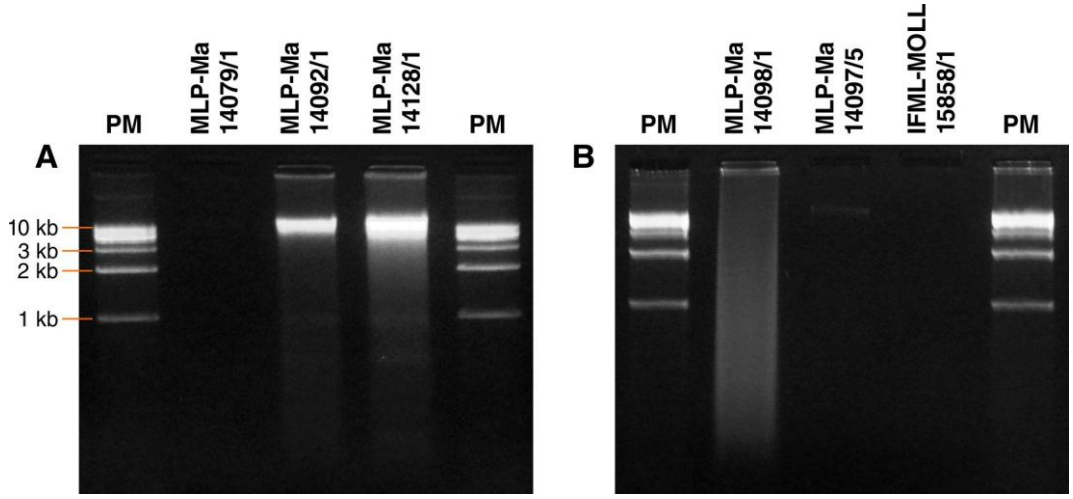

Figura 55. ADN genómico total de ejemplares de *Megalobulimus*. A, B: electroforesis horizontal en gel de agarosa 1%. PM: *DNA Ladder 1 kb* (Productos Bio-Lógicos).

En una minoría de casos, el ADN extraído presentó un alto nivel de fragmentación. Esto se observó para un individuo de *M. o. lorentzianus* (IFML-Moll 15857/1), dos de *M. sanctipauli* (MLP-Ma 14098/1 y MLP-Ma 14099/1) y uno de *M. abbreviatus* (MLP-Ma 14125/1). En la Fig. 55B se muestra uno de estos individuos ejemplificando estas extracciones. Solo para tres ejemplares la electroforesis no reveló presencia de ADN. Esto correspondió a un individuo de *M. o. lorentzianus* (MLP-Ma 14079/1) y dos de *M. o. musculus* (IFML-Moll 15858/1 y IFML-Moll 15858/2). En la Fig. 55A, B estas extracciones son ejemplificadas a partir de dos de estos individuos.

III.3.2 Amplificación de Genes Mitocondriales

El éxito de la amplificación de los tres marcadores mitocondriales fue variable, a saber: 16S ARNr tuvo un éxito del 92,86%, Cyt *b* del 88,10% y COI del 85,71%. No se pudieron obtener amplicones para los marcadores mitocondriales en los individuos MLP-Ma 14079/1, IFML-Moll 15858/1 y IFML-Moll 15858/2, que corresponden a aquellos que no evidenciaron ADN genómico total en el chequeo electroforético de la extracción. Por otra parte, en algunas muestras (aquellas con ADN degradado en la extracción) solo algunos de los tres marcadores pudieron ser amplificados: IFML-Moll 15857/1 (16S ARNr), MLP-Ma 14098/1 (16S ARNr y Cyt *b*), MLP-Ma 14099/1 (16S ARNr y Cyt *b*) y MLP-Ma 14125/1 (16S ARNr y COI).

En las PCR exitosas, se obtuvieron bandas únicas para cada marcador cuyos tamaños observados en la electroforesis de chequeo fueron de aproximadamente 750 pb para COI, 400 pb para Cyt *b* y 350 pb para 16S ARNr. A modo de ejemplo, la amplificación de tres individuos para cada marcador se presenta en la Fig. 56.

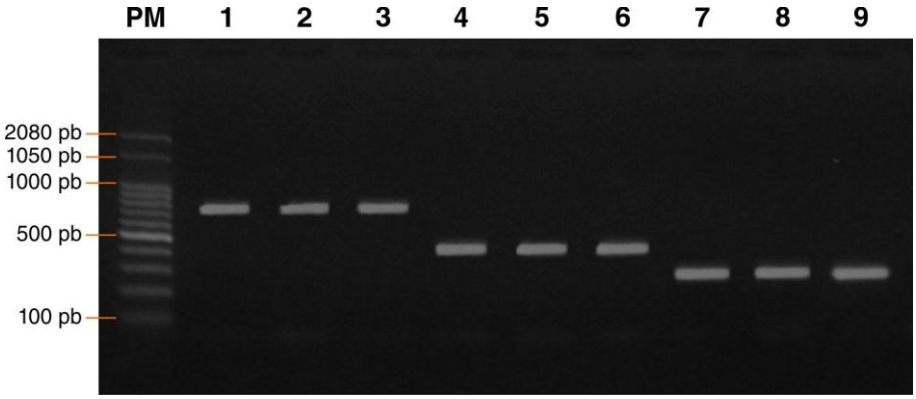

Figura 56. Amplificación parcial de los genes mitocondriales COI, Cyt *b* y 16S ARNr. Electroforesis horizontal en gel de agarosa 1,5%. PM: *DNA Ladder 100 pb* (Productos Bio-Lógicos). **1**, **2**, **3**: COI; **4**, **5**, **6**: Cyt *b*; **7**, **8**, **9**: 16S ARNr. **1**, **4** y **7** corresponden al individuo MLP-Ma 14083/1; **2**, **5** y **8** al individuo MLP-Ma 14091/1; **3**, **6** y **9** al individuo MLP-Ma 14097/2.

III.3.3 Análisis y Edición de Secuencias

Todas las secuencias obtenidas de los genes mitocondriales 16S ARNr, COI y Cyt *b* presentaron altos valores de calidad de acuerdo con sus QV *scores*. Los electroferogramas presentaron homogeneidad en altura y separación de los picos, no

mostrando solapamiento ni lecturas de picos dobles (Fig. 57). Asimismo, se evidenció complementariedad entre las secuencias sentido y antisentido de cada marcador en todos los individuos secuenciados.

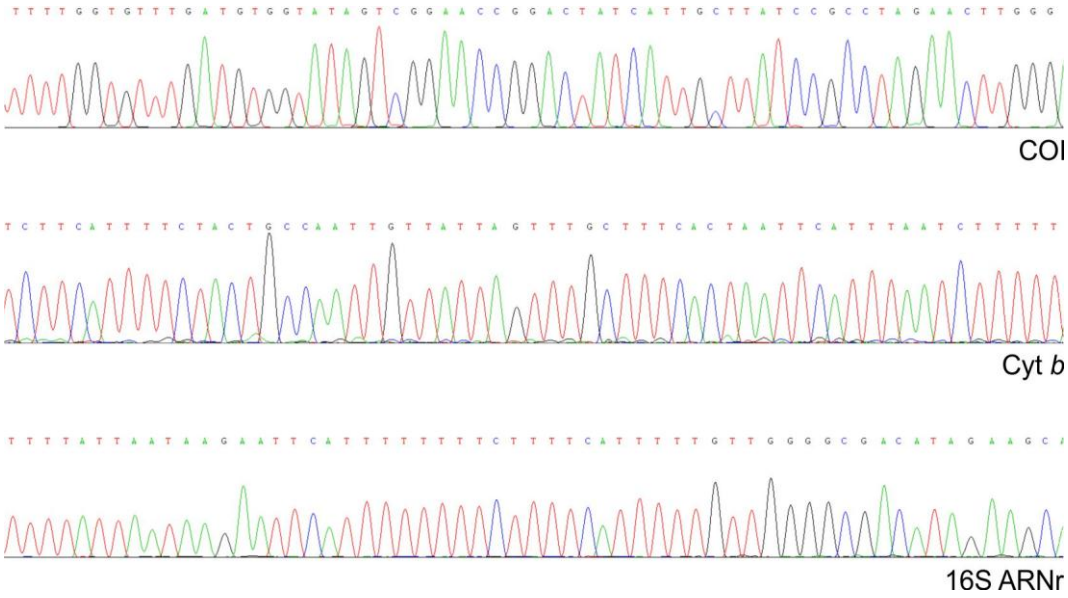

Figura 57. Electroferogramas obtenidos para los marcadores mitocondriales COI (superior), Cyt *b* (medio) y 16S ARNr (inferior). Para cada marcador se muestran vistas parciales de los electroferogramas.

La secuencias consenso mostraron altos valores de identidad al ser analizadas mediante BLASTn. Este análisis evidenció una similitud de las secuencias obtenidas, en composición y orden de nucleótidos, con las pertenecientes a gasterópodos terrestres depositadas en GenBank. Todas las secuencias obtenidas para el gen COI y Cyt *b* fueron de longitud constante, 655 y 361 pb respectivamente (Tabla XV), longitud compartida con los integrantes del grupo externo (Tabla XVI). Las secuencias del gen 16S ARNr presentaron longitud variable en un rango de 278 – 282 pb entre los individuos de *Megalobulimus* (Tabla XV) y para los integrantes del *outgroup* (Tabla XVI).

Una vez finalizada la edición, se contabilizaron un total de 124 secuencias generadas en el marco de esta tesis doctoral (112 para *Megalobulimus* y 9 para las especies *outgroup*) las que fueron depositadas en GenBank y cuyos números de acceso se presentan en las Tablas XV y XVI.

Tabla XV. Secuencias obtenidas para los individuos de cada entidad y números de accesos a la región parcial de cada marcador en GenBank.

	16S ARNr		COI		Cyt *b*	
M. o. lorentzianus						
MLP-Ma 14079/2	KT951955	280 pb	KT951882	655 pb	KT951918	361 pb
MLP-Ma 14080/1	KT951956	280 pb	KT951883	655 pb	KT951919	361 pb
MLP-Ma 14081/1	KT951957	280 pb	KT951884	655 pb	KT951920	361 pb
MLP-Ma 14082/1	KT951958	280 pb	KT951885	655 pb	KT951921	361 pb
MLP-Ma 14082/2	KT951959	280 pb	KT951886	655 pb	KT951922	361 pb
MLP-Ma 14083/1	KT951960	280 pb	KT951887	655 pb	KT951923	361 pb
MLP-Ma 14083/2	KT951961	280 pb	KT951888	655 pb	KT951924	361 pb
MLP-Ma 14083/3	KT951962	280 pb	KT951889	655 pb	KT951925	361 pb
MLP-Ma 14083/4	KT951963	280 pb	KT951890	655 pb	KT951926	361 pb
MLP-Ma 14084/1	KT951964	280 pb	KT951891	655 pb	KT951927	361 pb
MLP-Ma 14084/2	KT951965	280 pb	KT951892	655 pb	KT951928	361 pb
IFML-Moll 15857/1	KT951966	280 pb	-	-	-	-
MLP-Ma 14085/1	KT951967	280 pb	KT951893	655 pb	KT951929	361 pb
MLP-Ma 14085/2	KT951968	280 pb	KT951894	655 pb	KT951930	361 pb
MLP-Ma 14086/1	KT951969	280 pb	KT951895	655 pb	KT951931	361 pb
MLP-Ma 14086/2	KT951970	280 pb	KT951896	655 pb	KT951932	361 pb
MLP-Ma 14087/1	KT951971	280 pb	KT951897	655 pb	KT951933	361 pb
MLP-Ma 14088/1	KT951972	280 pb	KT951898	655 pb	KT951934	361 pb
M. o. musculus						
MLP-Ma 14091/1	KT951973	279 pb	KT951899	655 pb	KT951935	361 pb
MLP-Ma 14091/2	KT951974	279 pb	KT951900	655 pb	KT951936	361 pb
MLP-Ma 14092/1	KT951976	279 pb	KT951902	655 pb	KT951938	361 pb
MLP-Ma 14092/2	KT951975	279 pb	KT951901	655 pb	KT951937	361 pb
M. sanctipauli						
MLP-Ma 14097/1	KT951980	282 pb	KT951906	655 pb	KT951942	361 pb
MLP-Ma 14097/2	KT951981	282 pb	KT951907	655 pb	KT951943	361 pb
MLP-Ma 14097/3	KT951977	282 pb	KT951903	655 pb	KT951939	361 pb
MLP-Ma 14097/4	KT951978	282 pb	KT951904	655 pb	KT951940	361 pb
MLP-Ma 14097/5	KT951979	282 pb	KT951905	655 pb	KT951941	361 pb
MLP-Ma 14098/1	KT951982	279 pb	-	-	KT951944	361 pb
MLP-Ma 14099/1	KT951983	278 pb	-	-	KT951945	361 pb
M. abbreviatus						
MLP-Ma 14121/3	KT951992	279 pb	KT951916	655 pb	KT951953	361 pb
MLP-Ma 14125/1	KT951984	279 pb	KT951908	655 pb	-	-
MLP-Ma 14126/1	KT951985	279 pb	KT951909	655 pb	KT951946	361 pb
MLP-Ma 14127/1	KT951986	279 pb	KT951910	655 pb	KT951947	361 pb
MLP-Ma 14128/1	KT951989	279 pb	KT951913	655 pb	KT951950	361 pb
MLP-Ma 14128/2	KT951987	279 pb	KT951911	655 pb	KT951948	361 pb
MLP-Ma 14128/3	KT951988	279 pb	KT951912	655 pb	KT951949	361 pb
MLP-Ma 14129/1	KT951990	279 pb	KT951914	655 pb	KT951951	361 pb
MLP-Ma 14129/2	KT951991	279 pb	KT951915	655 pb	KT951952	361 pb
MLP-Ma 14130/2	KT951993	279 pb	KT951917	655 pb	KT951954	361 pb

-, ausencia de amplificación.

Tabla XVI. Secuencias obtenidas para el grupo externo y números de accesos a la región parcial de cada marcador en GenBank.

	16S ARNr		COI		Cyt *b*	
Austroborus dorbignyi						
MLP-Ma 14122	KT952000	302 pb	KT951994	655 pb	KT951997	361 pb
MLP-Ma 14123	KT952001	298 pb	KT951995	655 pb	KT951998	361 pb
Anthinus albolabiatus						
MLP-Ma 14124	KT952002	288 pb	KT951996	655 pb	KT951999	361 pb

III.3.4 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

III.3.4.1 Caracterización de la Variabilidad Genética

El análisis del polimorfismo de cada marcador mitocondrial y para cada entidad de *Megalobulimus* se muestra en la Tabla XVII.

El análisis de los alineamientos de cada marcador mitocondrial, permitió identificar manualmente los haplotipos y caracterizar cualitativamente sus sitios polimórficos (S de la Tabla XVII). En las Tablas XVIII a XXII se indica para *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli*, *M. o. oblongus* y *M. abbreviatus*, respectivamente, los haplotipos para cada uno de los tres marcadores mitocondriales y sus posiciones variables. La caracterización de cada haplotipo a partir de aspectos composicionales (cantidad de cada una de las bases, frecuencia relativa, contenido de G+C y A+T) se presenta en la Tabla XXIII.

Tabla XVII. Principales estadísticos que resumen la diversidad genética de cada marcador mitocondrial en cada entidad de *Megalobulimus*.

	N	h	HD ± DS	π ± DS	S
M. o. lorentzianus					
16S ARNr	18	1	0	0	0
COI	17	2	0,118 ± 0,101	0,00054 ± 0,00046	3
Cyt *b*	17	1	0	0	0
M. o. musculus					
16S ARNr	4	2	0,667 ± 0,204	0,00478 ± 0,00146	2
COI	4	2	0,667 ± 0,204	0,01934 ± 0,00592	19
Cyt *b*	4	2	0,667 ± 0,204	0,02216 ± 0,00679	12
M. sanctipauli					
16S ARNr	7	3	0,524 ± 0,209	0,01302 ± 0,00521	10
COI	5	2	0,400 ± 0,237	0,00061 ± 0,00036	1
Cyt *b*	7	3	0,524 ± 0,209	0,00871 ± 0,00356	9
M. abbreviatus					
16S ARNr	10	5	0,756 ± 0,130	0,00414 ± 0,00120	5
COI	10	5	0,756 ± 0,130	0,01181 ± 0,00316	24
Cyt *b*	9	5	0,806 ± 0,120	0,01447 ± 0,00426	16
M. o. oblongus					
16S ARNr	28	1	0	0	0
COI	10	1	0	0	0

N, número de individuos secuenciados por marcador genético mitocondrial; **h**, número de haplotipos; **HD**, diversidad haplotípica; **π**, diversidad nucleotídica; **S**, número de sitios segregantes; **SD**, desviación estándar.

Tabla XVIII. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. o. lorentzianus*. Estimaciones basadas en 280 nucleótidos de 16S ARNr, 655 nucleótidos de COI y 361 nucleótidos de Cyt *b*.

16S ARNr*	***N***
H_{ol1}	18

COI	**403**	**415**	**625**	***N***
H_{ol1}	C	A	A	16
H_{ol2}	T	G	G	1

Cyt b*	***N***
H_{ol1}	17

H, haplotipo, subíndices primera inicial del nombre de la subespecie y número del haplotipo (*e.g.* H_{ol1}); **N**, número de individuos que poseen el haplotipo. Los números que encabezan cada columna indican la posición de los sitios polimórficos.*Ausencia de posiciones variables entre los individuos.

Tabla XIX. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. o. musculus*. Estimaciones basadas en 279 nucleótidos de 16S ARNr, 361 nucleótidos de Cyt *b* y 655 nucleótidos de COI.

16S ARNr	**36**	**224**	***N***
H_{om1}	T	A	2
H_{om2}	C	G	2

Cyt b	**47**	**70**	**130**	**212**	**293**	**300**	**313**	**327**	**335**	**344**	**352**	**353**	***N***
H_{om1}	A	G	G	C	A	T	C	C	G	A	T	A	2
H_{om2}	G	A	A	T	G	C	T	T	A	G	A	G	2

COI	**4**	**37**	**49**	**50**	**84**	**178**	**203**	**241**	**310**	**316**	**325**	**475**	**515**	**539**	**545**	**550**	**622**	**628**	**649**	**N**
H_{om1}	G	G	T	C	C	G	C	G	G	C	T	A	C	T	C	T	T	G	T	2
H_{om2}	A	A	A	T	T	A	T	A	A	T	C	G	T	C	T	G	G	C	C	2

H, haplotipo, subíndices primera inicial del nombre de la subespecie y número del haplotipo (*e.g.* H_{om1}); **N**, número de individuos que poseen el haplotipo. Los números que encabezan cada columna indican la posición de los sitios polimórficos.

Tabla XX. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. sanctipauli*. Estimaciones basadas en 655 nucleótidos de COI, 361 nucleótidos de Cyt *b* y 282 posiciones de 16S ARNr.

COI	**67**	***N***
H_{s1}	A	1
H_{s2}	C	4

Cyt b	**19**	**79**	**131**	**160**	**192**	**205**	**226**	**283**	**334**	***N***
H_{s1}	A	T	C	T	C	G	C	C	C	1
H_{s2}	T	C	•	C	T	A	•	•	•	5
H_{s3}	•	•	T	•	T	A	T	T	T	1

16S ARNr	**26**	**51**	**58**	**71**	**83**	**126**	**143**	**150**	**151**	**152**	**153**	**164**	**265**	**282**	***N***
H_{s1}	T	T	T	A	A	T	A	A	T	T	T	C	T	A	5
H_{s2}	•	•	•	T	G	•	G	•	–	–	–	T	C	G	1
H_{s3}	C	C	C	•	G	C	G	–	–	–	–	T	•	G	1

H, haplotipo, subíndices primera inicial del nombre de la especie y número del haplotipo (*e.g.* H_{s1}); **N**, número de individuos que poseen el haplotipo. Los números que encabezan cada columna indican la posición de los sitios polimórficos. El Haplotipo 1 se muestra como secuencia de referencia; los puntos indican nucleótidos que concuerdan con la secuencia de referencia; los guiones (–) indican *indels*.

Tabla XXI. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. o. oblongus*. Estimaciones basadas en 284 nucleótidos de 16S ARNr y 655 nucleótidos de COI obtenidas por Jaramillo Roldán *et al.* (2014).

16S ARNr*	***N***
H_{oo1}	28

COI*	***N***
H_{oo1}	10

H, haplotipo, subíndices primera inicial del nombre de la subespecie y número del haplotipo (*e.g.* H_{oo1}); **N**, número de individuos que poseen el haplotipo. *Ausencia de posiciones variables entre los individuos.

Tabla XXII. Número de haplotipos y posiciones variables en *M. abbreviatus*. Estimaciones basadas en 655 nucleótidos de COI, 361 nucleótidos de Cyt *b* y 279 nucleótidos de 16S ARNr.

COI	**67**	**79**	**92**	**98**	**154**	**202**	**217**	**274**	**292**	**316**	**361**	**367**	**370**	**382**	**383**	**421**	**454**	**469**	**529**	**530**	**574**	**589**	**613**	**616**	***N***
H_{a1}	A	A	C	G	T	T	C	C	A	T	T	G	G	T	T	G	G	A	C	T	G	C	T	G	5
H_{a2}	G	G	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	•	•	•	T	C	•	•	•	•	1
H_{a3}	G	G	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	T	C	•	•	•	•	1
H_{a4}	•	G	T	•	C	•	•	•	G	•	•	A	A	•	•	•	A	T	T	•	•	T	•	•	2
H_{a5}	G	G	T	•	•	C	T	T	G	•	C	A	A	C	C	A	•	T	T	•	A	•	C	T	1

16S ARNr	**32**	**48**	**149**	**176**	**210**	***N***
H_{a1}	C	C	C	G	C	5
H_{a2}	•	•	•	•	T	1
H_{a3}	•	•	•	A	•	1
H_{a4}	•	•	T	•	•	2
H_{a5}	T	T	•	•	•	1

Cyt b	**22**	**70**	**73**	**110**	**137**	**145**	**157**	**181**	**193**	**196**	**223**	**247**	**278**	**295**	**349**	***N***
H_{a1}	C	G	A	T	C	T	G	A	G	T	A	G	G	A	C	4
H_{a2}	•	•	•	•	•	•	•	•	•	C	•	•	•	•	•	1
H_{a3}	•	•	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	A	1
H_{a4}	T	A	•	•	•	C	A	G	•	C	G	•	•	C	•	2
H_{a5}	T	•	G	C	T	•	•	•	C	•	•	A	A	C	•	1

H, haplotipo, subíndices primera inicial del nombre de la especie y número del haplotipo (*e.g.* H_{a1}); **N**, número de individuos que poseen el haplotipo. Los números que encabezan cada columna indican la posición de los sitios polimórficos. Haplotipo 1 se muestra como una secuencia de referencia; los puntos indican nucleótidos que concuerdan con la secuencia de referencia.

Tabla XXIII. Composición de secuencia para los haplotipos de los marcadores 16S ARNr, COI y Cyt *b* de las entidades de *Megalobulimus* abordadas.

	A	C	G	T	Contenido G+C	Contenido A+T
M. o. lorentzianus						
16S ARNr						
H_{ol1}	100 (35,71%)	34 (12,14%)	50 (17,86%)	96 (34,29%)	30,00%	70,00%
COI						
H_{ol1}	163 (24,89%)	105 (16,03%)	124 (18,93%)	263 (40,15%)	34,96%	65,04%
H_{ol2}	161 (24,58%)	104 (15,88%)	126 (19,25%)	264 (40,31%)	35,11%	64,89%
Cyt *b*						
H_{ol1}	97 (26,87%)	56 (15,51%)	56 (15,51%)	152 (42,11%)	31,02%	68,98%
M. o. musculus						
16S ARNr						
H_{om1}	101 (36,20%)	33 (11,83%)	47 (16,85%)	98 (35,13%)	28,67%	71,33%
H_{om2}	100 (35,84%)	34 (12,19%)	48 (17,20%)	97 (34,77%)	29,39%	70,61%
COI						
H_{om1}	157 (23,97%)	109 (16,64%)	129 (19,69%)	260 (39,69%)	36,34%	63,66%
H_{om2}	162 (24,73%)	107 (16,34%)	126 (19,24%)	260 (39,69%)	35,57%	64,43%
Cyt *b*						
H_{om1}	97 (26,87%)	61 (16,90%)	56 (15,51%)	147 (40,72%)	32,41%	67,59%
H_{om2}	97 (26,87%)	59 (16,34%)	57 (15,79%)	148 (41,00%)	32,13%	67,87%
M. sanctipauli						
16S ARNr						
H_{s1}	99 (35,11%)	35 (12,41%)	45 (15,96%)	103 (36,52%)	28,37%	71,63%
H_{s2}	95 (34,05%)	35 (12,54%)	48 (17,20%)	101 (36,20%)	29,75%	70,75%
H_{s3}	95 (34,17%)	38 (13,67%)	48 (17,27%)	97 (34,89%)	30,94%	69,06%
COI						
H_{s1}	153 (23,36%)	116 (17,71%)	130 (19,85%)	256 (39,08%)	37,56%	62,44%
H_{s2}	152 (23,21%)	117 (17,86%)	130 (19,85%)	256 (39,08%)	37,71%	62,29%
Cyt *b*						
H_{s1}	97 (26,87%)	65 (18,01%)	57 (15,79%)	142 (39,34%)	33,80%	66,20%
H_{s2}	97 (26,87%)	66 (18,28%)	56 (15,51%)	142 (39,34%)	33,80%	66,20%
H_{s3}	98 (27,15%)	60 (16,62%)	56 (15,51%)	147 (40,72%)	32,13%	67,87%

A, adenina; **C**, citosina; **G**, guanina; **T**, timina (bases nitrogenadas); para cada haplotipo se indica el número de cada una de las bases y entre paréntesis el porcentaje (%) que representan estas sobre la longitud total de la secuencia del marcador.

Tabla XXIII. Continuación.

	A	C	G	T	CONTENIDO G+C	CONTENIDO A+T
M. abbreviatus						
16S ARNr						
H_{a1}	97 (34,77%)	37 (13,26%)	48 (17,20%)	97 (34,77%)	30,47%	69,53%
H_{a2}	97 (34,77%)	36 (12,90%)	48 (17,20%)	98 (35,13%)	30,11%	69,89%
H_{a3}	98 (35,13%)	37 (13,26%)	47 (16,85%)	97 (34,77%)	30,11%	69,89%
H_{a4}	97 (34,77%)	36 (12,90%)	48 (17,20%)	98 (35,13%)	30,11%	69,89%
H_{a5}	97 (34,77%)	35 (12,54%)	48 (17,20%)	99 (35,48%)	29,75%	70,25%
COI						
H_{a1}	155 (23,66%)	108 (16,49%)	131 (20,00%)	261 (39,85%)	36,49%	63,51%
H_{a2}	153 (23,36%)	109 (16,64%)	133 (20,31%)	260 (39,69%)	36,95%	63,05%
H_{a3}	154 (23,51%)	108 (16,49%)	132 (20,15%)	261 (39,85%)	36,64%	63,36%
H_{a4}	155 (23,66%)	106 (16,18%)	130 (19,85%)	264 (40,31%)	36,03%	63,97%
H_{a5}	155 (23,66%)	109 (16,64%)	129 (19,69%)	262 (40,00%)	36,34%	63,66%
Cyt *b*						
H_{a1}	100 (27,70%)	62 (17,17%)	56 (15,51%)	143 (39,61%)	32,69%	67,31%
H_{a2}	100 (27,70%)	63 (17,45%)	56 (15,51%)	142 (39,34%)	32,96%	67,04%
H_{a3}	101 (27,98%)	61 (16,90%)	56 (15,51%)	143 (39,61%)	32,41%	67,59%
H_{a4}	99 (27,42%)	64 (17,73%)	56 (15,51%)	142 (39,34%)	33,24%	66,76%
H_{a5}	100 (27,70%)	63 (17,45%)	54 (14,96%)	144 (39,89%)	32,41%	67,59%
M. o. oblongus						
16S ARNr						
H_{oo1}	96 (33,80%)	33 (11,62%)	57 (20,07%)	98 (34,51%)	31,69%	68,31%
COI						
H_{oo1}	163 (24,89%)	108 (16,49%)	126 (19,24%)	258 (39,39%)	35,73%	64,27%

A, adenina; **C**, citosina; **G**, guanina; **T**, timina (bases nitrogenadas); para cada haplotipo se indica el número de cada una de las bases y entre paréntesis el porcentaje (%) que representan estas sobre la longitud total de la secuencia del marcador.

III.3.4.2 Estimación de Distancias Genéticas

La distancia genética corregida (por el modelo K2P) y no corregidas (distancia *p*) de los haplotipos entre y dentro cada entidad de *Megalobulimus* se muestran en las Tablas XXIV, XXV y XXVI para 16S ARNr, COI y Cyt *b*, respectivamente.

Tabla XXIV. Matriz de Distancia Genética (DG) basada en el marcador 16S ARNr. Valores expresados en porcentaje. La DG no corregida *p* se muestra por debajo de la diagonal y la corregida por el modelo K2P por encima de la misma.

	M. o. lorentzianus	***M. o. musculus***		***M. sanctipauli***			***M. abbreviatus***					***M. o. oblongus***
	H_{ol1}	H_{om1}	H_{om2}	H_{s1}	H_{s2}	H_{s3}	H_{a1}	H_{a2}	H_{a3}	H_{a4}	H_{a5}	H_{oo1}
M. o. lorentzianus												
H_{ol1}	-	1,456	0,723	10,013	10,422	11,715	10,872	10,447	11,301	10,447	10,872	23,683
M. o. musculus												
H_{om1}	1,439	-	0,725	9,606	10,013	11,301	10,463	10,039	10,890	10,039	10,463	22,688
H_{om2}	0,719	0,719	-	9,606	10,013	11,301	10,463	10,039	10,890	10,039	10,463	23,203
M. sanctipauli												
H_{s1}	9,353	8,993	8,993	-	2,199	2,964	3,701	4,085	4,085	4,085	4,473	25,320
H_{s2}	9,712	9,353	9,353	2,158	-	2,199	3,694	4,077	4,077	4,077	4,463	24,736
H_{s3}	10,791	10,432	10,432	2,878	2,158	-	4,473	4,863	4,863	4,863	5,257	24,783
M. abbreviatus												
H_{a1}	10,072	9,712	9,712	3,597	3,597	4,317	-	0,361	0,361	0,361	0,725	23,768
H_{a2}	9,712	9,353	9,353	3,957	3,957	4,676	0,360	-	0,725	0,725	1,091	23,245
H_{a3}	10,432	10,072	10,072	3,957	3,957	4,676	0,360	0,719	-	0,725	1,091	24,298
H_{a4}	9,712	9,353	9,353	3,957	3,957	4,676	0,360	0,719	0,719	-	1,091	23,245
H_{a5}	10,072	9,712	9,712	4,317	4,317	5,036	0,719	1,079	1,079	1,079	-	24,298
M. o. oblongus												
H_{oo1}	20,144	19,424	19,784	21,223	20,863	20,863	20,144	19,784	20,504	19,784	20,504	-

Tabla XXV. Matriz de Distancia Genética (DG) basada en el marcador COI. Valores expresados en porcentaje. La DG no corregida *p* se muestra por debajo de la diagonal y la corregida por el modelo K2P por encima de la misma.

	M. o. lorentzianus		***M. o. musculus***		***M. sanctipauli***		***M. abbreviatus***					***M. o. oblongus***
	H_{ol1}	H_{ol2}	H_{om1}	H_{om2}	H_{s1}	H_{s2}	H_{a1}	H_{a2}	H_{a3}	H_{a4}	H_{a5}	H_{oo1}
M. o. lorentzianus												
H_{ol1}	-	0,460	6,483	4,615	14,977	15,158	13,453	14,040	14,040	12,505	13,259	18,870
H_{ol2}	0,458	-	6,310	4,449	15,579	15,762	13,648	14,238	14,238	12,696	13,453	18,662
M. o. musculus												
H_{om1}	6,107	5,954	-	2,972	16,991	17,177	15,417	15,620	16,027	14,436	15,216	18,265
H_{om2}	4,427	4,275	2,901	-	16,210	16,394	15,015	15,620	15,620	14,040	14,815	18,060
M. sanctipauli												
H_{s1}	13,282	13,740	14,809	14,198	-	0,153	7,864	7,687	7,687	7,698	7,709	20,429
H_{s2}	13,435	13,893	14,962	14,351	0,153	-	8,030	7,676	7,676	7,864	7,698	20,451
M. abbreviatus												
H_{a1}	12,061	12,214	13,588	13,282	7,328	7,481	-	0,769	0,769	1,548	2,818	19,553
H_{a2}	12,519	12,672	13,740	13,740	7,176	7,176	0,763	-	0,306	1,706	2,658	19,978
H_{a3}	12,519	12,672	14,046	13,740	7,176	7,176	0,763	0,305	-	1,706	2,658	19,978
H_{a4}	11,298	11,450	12,824	12,519	7,176	7,328	1,527	1,679	1,679	-	2,181	18,695
H_{a5}	11,908	12,061	13,435	13,130	7,176	7,176	2,748	2,595	2,595	2,137	-	19,095
M. o. oblongus												
H_{oo1}	16,489	16,336	16,031	15,878	17,557	17,557	16,947	17,252	17,252	16,336	16,641	-

Tabla XXVI. Matriz de Distancia Genética (DG) basada en el marcador Cyt *b*. Valores expresados en porcentaje. La DG no corregida *p* se muestra por debajo de la diagonal y la corregida por el modelo K2P por encima de la misma.

	M. o. lorentzianus	***M. o. musculus***		***M. sanctipauli***			***M. abbreviatus***				
	H_{ol1}	H_{om1}	H_{om2}	H_{s1}	H_{s2}	H_{s3}	H_{a1}	H_{a2}	H_{a3}	H_{a4}	H_{a5}
M. o. lorentzianus											
H_{ol1}	-	9,036	6,480	24,344	23,977	24,344	23,193	23,611	23,557	23,247	22,336
M. o. musculus											
H_{om1}	8,310	-	3,430	22,678	21,507	23,504	21,958	22,366	22,317	22,830	21,151
H_{om2}	6,094	3,324	-	19,538	18,427	20,317	19,616	20,007	19,966	19,658	18,844
M. sanctipauli											
H_{s1}	20,222	19,114	16,898	-	1,401	1,690	6,695	7,005	6,995	6,705	6,717
H_{s2}	19,945	18,283	16,066	1,385	-	1,973	6,396	6,705	6,695	6,406	6,419
H_{s3}	20,222	19,668	17,452	1,662	1,939	-	6,695	7,005	6,995	6,705	6,717
M. abbreviatus											
H_{a1}	19,391	18,560	16,898	6,371	6,094	6,371	-	0,278	0,278	2,261	2,256
H_{a2}	19,668	18,837	17,175	6,648	6,371	6,648	0,277	-	0,556	1,973	2,545
H_{a3}	19,668	18,837	17,175	6,648	6,371	6,648	0,277	0,554	-	2,545	2,541
H_{a4}	19,391	19,114	16,898	6,371	6,094	6,371	2,216	1,939	2,493	-	3,430
H_{a5}	18,837	18,006	16,346	6,371	6,094	6,371	2,216	2,493	2,493	3,324	-

III.3.4.3 Abordajes Filogenéticos

Las topologías de árboles obtenidas a partir de los métodos de distancia (NJ; Fig. 58) e Inferencia Bayesiana (IB; Fig. 59) fueron congruentes en cuanto al reconocimiento de cinco grupos correspondientes a las cinco entidades analizadas, con algunas pequeñas diferencias en la organización interna de algunos grupos en función de los marcadores. A saber, *M. o. lorentzianus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* presentaron para los tres marcadores el mismo patrón de agrupamiento, aunque *M. abbreviatus* evidenció cambios en su organización intragrupo dependiendo del marcador y método de reconstrucción empleado. Los especímenes de *M. o. musculus* conformaron un grupo diferenciado tanto en NJ como IB para COI. Para 16S ARNr este grupo no pudo ser recuperado, los individuos conforman dos grupos menores, uno de los cuales se mostró más vinculado a *M. o. lorentzianus*. En cuanto al comportamiento de Cyt *b* para esta entidad, se reconoció el mismo agrupamiento que para COI, aunque en el árbol de IB sus individuos constituyeron una politomía no resuelta junto a *M. o. lorentzianus*.

En relación con los valores de soporte, los agrupamientos reconstruidos por NJ estuvieron respaldados por altos valores tal como se muestra en la Fig. 58. De igual manera, los agrupamientos reconstruidos por IB estuvieron respaldados por buenos valores de credibilidad (Fig. 59), donde para el 16S ARNr presentaron valores altos los grupos de *M. o. lorentzianus* (0.99), *M. sanctipauli* (0.94) y *M. abbreviatus* (1) y similarmente para Cyt *b* los grupos de *M. o. lorentzianus* (1), *M. sanctipauli* (1) y *M. abbreviatus* (0.90). Complementariamente, el marcador COI presentó valores medios para *M. o. lorentzianus* (0.78) y *M. abbreviatus* (0.70), y altos para *M. o. musculus* (1) y *M. sanctipauli* (1).

Por otra parte, las reconstrucciones para los tres marcadores mediante ambos métodos fueron consistentes en cuanto al reconocimiento de dos agrupamientos superiores con altos valores de soporte y credibilidad. El primero de ellos vinculó a *M. o. lorentzianus* con *M. o. musculus*, y el segundo contuvo a *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. Estos agrupamientos superiores reunieron la totalidad de las entidades analizadas de la Argentina, las que presentaron mayor afinidad entre sí cuando fueron comparadas con *M. o. oblongus*, que ocupó una posición filogenética más distante tal como se aprecia en las Figs. 58 y 59 para los marcadores 16S ARNr y COI.

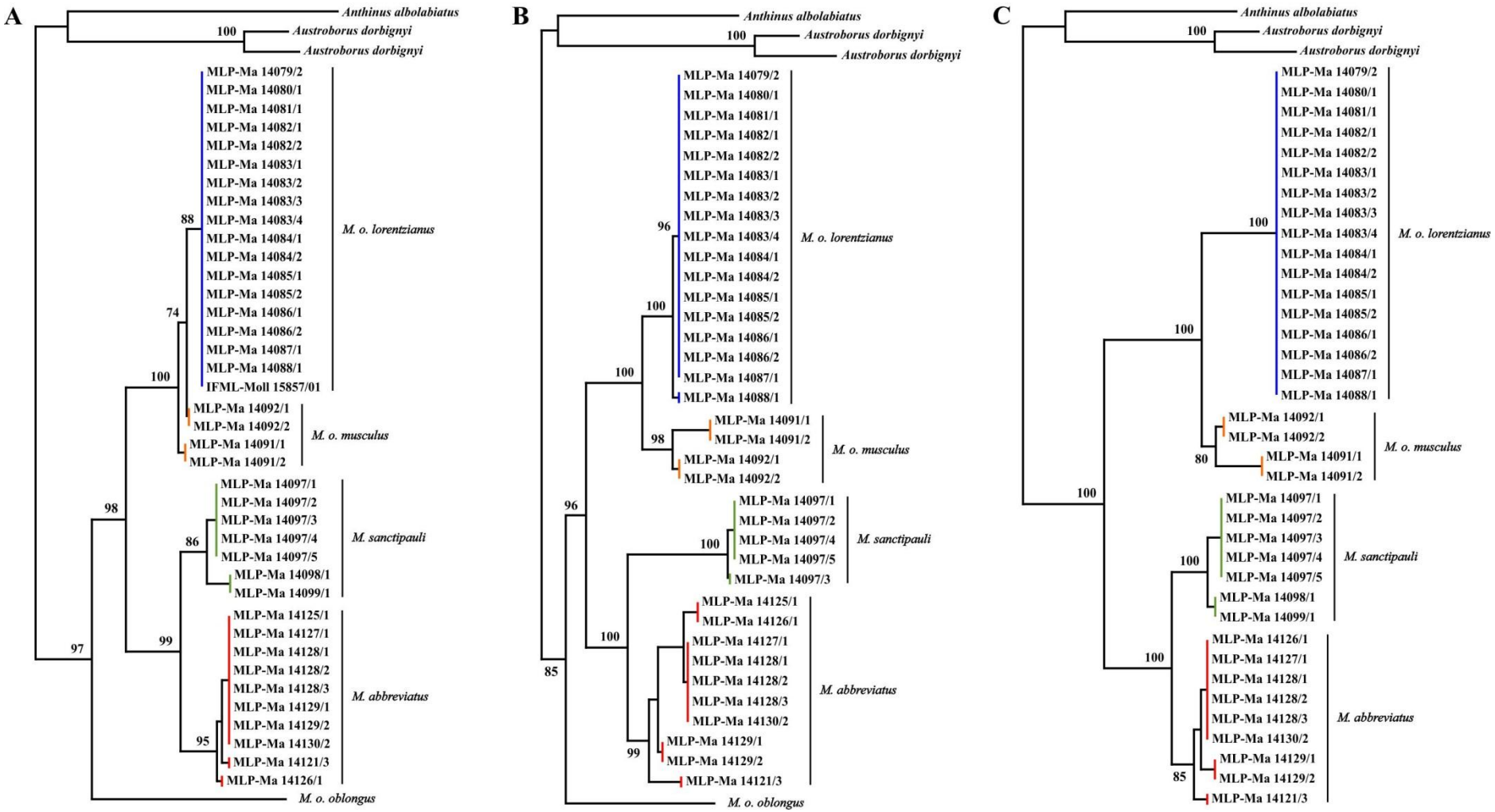

Figura 58. Reconstrucción filogenética mediante el método de distancia y el algoritmo *Neighbour Joining* (NJ). A: árbol basado en la región parcial del gen 16S ARNr; **B**: árbol basado en la región parcial del gen COI; **C**: árbol basado en la región parcial del gen Cyt *b*.

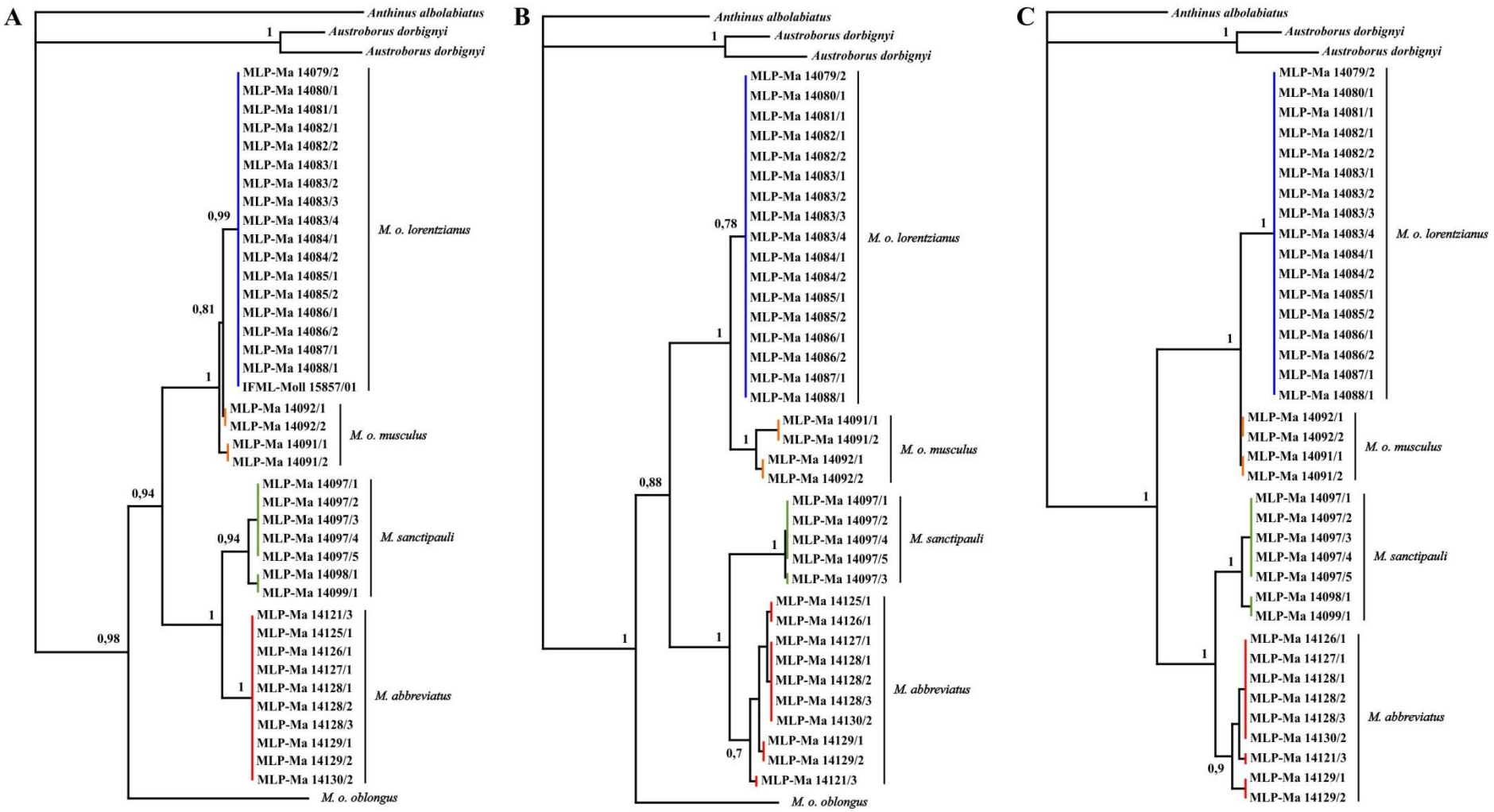

Figura 59. Reconstrucción filogenética mediante el método de Inferencia Bayesiana (IB). A: árbol basado en la región parcial del gen 16S ARNr; **B**: árbol basado en la región parcial del gen COI; **C**: árbol basado en la región parcial del gen Cyt *b*.

III.4 DISCUSIÓN

Para la Argentina, ninguna entidad del género *Megalobulimus* había sido abordada desde el campo de la genética con anterioridad al desarrollo de esta tesis doctoral. Al mismo tiempo, la caracterización presentada en este capítulo para *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* se constituye en el primer antecedente genético para estas entidades en Sudamérica. Vale destacar también que la amplificación, puesta a punto de condiciones de PCR y secuenciación exitosa de regiones parciales de Cyt *b* son pioneras para el género *Megalobulimus*.

En el presente estudio, fue posible amplificar y secuenciar exitosamente las tres regiones mitocondriales de elección, con tasas de éxito de amplificación del orden del 93% para el 16S ARNr, 88% para Cyt *b* y 86% para COI. Según Hajibabaei *et al.* (2005), tasas de amplificación inferiores al 95% son un indicativo de que el par de cebadores utilizados para una región particular no resulta del todo apropiado para considerar esa región como un buen marcador o código de barras genético. Sin embargo, antecedentes de amplificación en *Megalobulimus* refieren tasas de éxito del 100% y 35% para el 16S ARNr y COI, respectivamente (Breure y Romero, 2012; Ramírez *et al.*, 2012; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). Estos valores se justificaron basándose en que los cebadores para el 16S ARNr fueron diseñados específicamente para *Megalobulimus*, mientras que los cebadores de Folmer *et al.* (1994) para COI presentarían baja complementariedad con su región diana debido a su estatus de universales (Barr *et al.*, 2009; Ramírez *et al.*, 2012). Esta situación dio lugar a la proposición del marcador mitocondrial 16S ARNr como la región de elección para oficiar de código de barras genético en las especies del género (Ramírez *et al.*, 2012; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). No obstante, la disparidad entre las tasas de éxito en la amplificación del marcador COI lograda en este trabajo y las indicadas en la literatura objetan el argumento de baja complementariedad. Una explicación a la tasa de éxito fluctuante para COI, la cual también justifica la alta tasa observada para el 16S ARNr y Cyt *b*, podría estar en relación con la preservación de los *vouchers* de tejidos. De acuerdo con Hajibabaei *et al.* (2005) los especímenes o *vouchers* de tejido preservados en alcohol absoluto sufren un proceso de acidificación que degrada su ADN por hidrólisis y oxidación. Este proceso es inmediato y solo puede ser amortiguado reemplazando el fijador con regularidad. De no ser así, es esperable obtener solo

amplicones en el rango de los 300-400 pb a partir de muestras con hasta una década de antigüedad (Hajibabaei *et al.*, 2005). Así, si no se previó el reemplazo periódico del alcohol a los efectos de preservar la integridad de las moléculas de ADN, este marco justifica una mejor tasa de amplificación de regiones cortas (menores de 400 pb) como las del 16S ARNr y Cyt *b* por sobre aquellas de mayor longitud, tal es el caso de COI. Si bien los *vouchers* de tejido de los especímenes de *Megalobulimus* incluidos en este abordaje genético fueron conservados en alcohol absoluto de igual manera que en Ramírez *et al.* (2012) y Jaramillo Roldán *et al.* (2014); se tuvo la precaución de reemplazar el alcohol dos veces por semana durante tres semanas. En este punto, cabe aclarar que las PCR que conllevaron dificultades, por cuanto no se pudieron amplificar los marcadores mitocondriales o bien permitieron amplificar solo algunos, estuvieron basadas en material recolectado y fijado en alcohol con anterioridad al inicio de este estudio. Aunque se desconoce el proceso de fijación al que fueron sometidos estos ejemplares, los resultados obtenidos indicarían que probablemente hayan experimentado hidrólisis y oxidación de su ADN, evidenciándose en la electroforesis horizontal como un ADN degradado o directamente indetectable.

A los efectos de complementar las diagnosis de las entidades de la Argentina mediante marcadores genéticos, en este estudio se contemplaron tres marcadores. Así, se combinaron secuencias codificantes para proteínas (COI y Cyt *b*) con un marcador no codificante (16S ARNr). Esto permitió evaluar el comportamiento y utilidad de los marcadores codificantes que presentan restricciones funcionales -dadas por las posiciones de las sustituciones en los codones- en relación con un marcador que contiene información de estructura secundaria no sujeta al mismo tipo de restricción funcional (Moritz *et al.*, 1987; Hickson *et al.*, 1996; Hughes, 2005; Forsdyke, 2012). Por otra parte, los aspectos composicionales de los tres marcadores analizados mostraron contenidos de G+C y A+T de acuerdo con lo esperado para genomas mitocondriales de moluscos (Saccone *et al.*, 1999; Simison y Boore, 2008; Cunha *et al.*, 2009). Además, estos valores resultaron semejantes a los previamente caracterizados para otras entidades de *Megalobulimus* (Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). En este contexto, es importante destacar que cada uno de los tres marcadores resultó de utilidad *per se* al momento de reconocer las entidades.

Tal como se mencionara en la introducción del presente capítulo, antes de la ejecución de esta tesis, en GenBank se podían encontrar 36 secuencias de nueve entidades de *Megalobulimus*: dos de COI, 26 de 16S ARNr, una de Histona 3 y siete de 5.8S ARNr (Wade *et al.*, 2006; Breure y Romero, 2012; Ramírez *et al.*, 2012; Jaramillo Roldán *et al.*, 2014). Con la ejecución de este estudio, 112 secuencias nuevas (39 de 16S ARNr, 37 de Cyt *b* y 36 de COI) fueron puestas a disposición mediante su publicación en GenBank, incrementando a 148 el total de secuencias de acceso libre para el género. Este incremento en el número y diversidad de secuencias de ADN para el género, en bases de datos internacionales de libre acceso, permite a los investigadores unificar esfuerzos y da lugar a la reutilización de dicha información (Fontaneto *et al.*, 2015). Esto no solo permite futuros abordajes comparativos a nivel taxonómico en *Megalobulimus*, sino que además posibilita la formulación de nuevas hipótesis que vinculen el componente geográfico con los procesos de especiación asociados a las genealogías de genes, similarmente a lo realizado en otros géneros de caracoles terrestres tales como *Partula* Férussac, 1821 y *Albinaria* Vest, 1867 (*e.g.* Douris *et al.*, 1998; Goodacre y Wade, 2001). En esta misma línea, un estudio comparativo -con base anatómica y genética- que involucre un mayor número de especies de *Megalobulimus* y que, a su vez incorpore datos de distribución del género en Sudamérica, permitiría contrastar la hipótesis que enuncia que los *Megalobulimus* son de origen gondwánico y basales al grupo de los Stylommatophora (Leme, 1973; Parodiz, 1982; Wade *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2012).

Los caracoles terrestres tienen un fuerte potencial para retener una mayor señal histórica de estructura poblacional, debido a que la combinación de alta persistencia y baja vagilidad resulta en numerosas poblaciones diferenciadas a varios niveles de aislamiento geográfico y genético (Hugall *et al.*, 2003). Si bien los datos genéticos obtenidos aquí persiguen un enfoque taxonómico, en términos de variabilidad genética los resultados obtenidos para 16S ARNr, Cyt *b* y COI evidenciaron niveles sensiblemente bajos, e incluso ausencia, tanto de diversidad haplotípica (Hd) como nucleotídica (π) dentro de *M. o. lorentzianus*. Contrastantemente, la diversidad genética en *M. sanctipauli* y *M. o. musculus* presentó valores altos para los tres marcadores y más aún en *M. abbreviatus*. Debido a la ausencia de datos en la literatura, por el momento no es posible realizar comparaciones de diversidad genética con otras entidades de *Megalobulimus*. Sin embargo, los resultados demuestran que estos

megamoluscos tienen el potencial para proveer una perspectiva sobre la biogeografía histórica de sus hábitats, dado que por ejemplo *M. o. lorentzianus* presenta escasa o nula diversidad genética a lo largo de aproximadamente 1.500 km (desde Salta a Buenos Aires), mientras que *M. abbreviatus* presenta una alta diversidad genética en un radio de 60 km dentro de la provincia de Misiones. Tales observaciones justifican estudios futuros tendientes a comprender la asociación entre la diversidad filogenética espacial de las entidades con procesos biogeográficos regionales.

Desde el punto de vista filogenético, los miembros del género *Megalobulimus* representados en este estudio conformaron un agrupamiento bajo el conjunto de parámetros explorados a través de los métodos de NJ e IB, con topologías congruentes en líneas generales para los tres marcadores. Los individuos de *M. o. lorentzianus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* pudieron ser reconocidos como grupos monofiléticos en ambos análisis y para los tres marcadores. *Megalobulimus o. musculus* solo se presentó como un grupo diferenciado para COI, mientras que para 16S ARNr y Cyt *b* la posición relativa de sus individuos resultó algo ambigua. Por otra parte, los agrupamientos superiores en las topologías obtenidas evidenciaron relaciones cercanas entre *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*, así como entre *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. Cada par de entidades también comparte actualmente hábitats y solapan en forma parcial su rango geográfico, lo que sugiere una historia biogeográfica común. En lo que respecta a *M. oblongus*, se observó que la especie no forma un agrupamiento afín con *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* en el contexto de los marcadores analizados. Esta evidencia contrasta con las afinidades conquiliológicas establecidas por Bequaert (1948) para las tres entidades, sobre las cuales *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* fueron subordinadas como subespecies de *M. oblongus*.

Por otra parte, cuando las relaciones obtenidas entre todas las entidades fueron examinadas en términos de distancias genéticas, se observó que la divergencia para los tres marcadores dentro de cada entidad fue menor que la estimada entre las entidades, tal como se espera bajo una premisa de especies distintas (Davison *et al.*, 2009; Fontaneto *et al.*, 2015). Si bien la proporción de estas distancias difirieron de un marcador a otro, cada uno de ellos reflejó una relación similar de distancia entre y dentro de las entidades, con valores dentro de cada entidad en el rango de 0 - 2,96% para 16S ARNr, 0 - 2,97% para COI y de 0 - 3,43% para Cyt *b*. Estos resultados son

consistentes con el único antecedente de distancias intraespecíficas para *Megalobulimus* en donde se evidenció un rango de 0 - 3,45% para 16S ARNr a partir de siete entidades del Perú (Ramírez *et al.*, 2012). En relación con la distancias genéticas entre las entidades de la Argentina, aquellos pares que conformaron agrupamientos superiores no sobrepasaron el 10% de distancia entre ellas para ninguno de los marcadores, mientras que los valores de distancia que separaron a *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* de *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus* fueron considerablemente superiores, duplicando la distancia interespecífica de cada par de entidades. Así, al igual que lo observado gráficamente en los árboles, estas distancias sugieren indefectiblemente la influencia de eventos históricos en la separación de las entidades.

Finalmente y tal como fuera discutido en el capítulo I, *M. abbreviatus* presenta solapamiento conquiliológico con *M. o. musculus* y *M. sanctipauli*, lo cual probablemente haya enmascarado su identificación previa para la Argentina. A partir de los resultados genéticos, se evidencia que *M. abbreviatus* presenta una mayor afinidad filogenética con *M. sanctipauli* que con *M. o. musculus*. En este escenario y dado que esta última entidad no fue registrada entre los lotes procedentes de Corrientes y Misiones, muy probablemente las anteriores menciones en esta área a *M. o. musculus* correspondan a asignaciones incorrectas de individuos de *M. abbreviatus*. Adicionalmente, y respecto a *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* como subespecies de *M. oblongus*, la evidencia genética con sustento en las reconstrucciones filogenéticas y los valores de divergencia genética, del orden del 24% para 16S ARNr y 19% para COI entre *M. o. lorentzianus* y *M. oblongus*, y del orden del 23% para 16S ARNr y 18% para COI entre *M. o. musculus* y *M. oblongus*, interpretadas conjuntamente con la información anatómica, sugiere que *M. o. lorentzianus* debe recuperar el estatus específico, con el que originalmente fue descripta, y *M. o. musculus* ameritaría ser elevada al nivel de especie.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis doctoral, se abordó un análisis taxonómico enfocado en entidades del género *Megalobulimus* de la Argentina, con principal énfasis en aquellas presentes en la provincia de Misiones. El mismo permitió poner a prueba las hipótesis previamente planteadas, y a partir de los resultados obtenidos aportar información para definir y delimitar estas entidades, así como para revaluar el estatus subespecífico de algunas de ellas.

La diagnosis basada en caracteres conquiliológicos cualitativos permitió asignar correctamente todo el material incluido en esta tesis doctoral a cuatro taxones nominales: *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. De los caracteres analizados se encontró para estas cuatro entidades que el de mayor valor diagnóstico está representado en la escultura de la protoconcha (costillas y microgranulación), apoyado subsecuentemente en la forma de la concha y la espira. Los análisis de morfometría clásica y geométrica permitieron una discriminación estadísticamente significativa de las cuatro entidades. Sin embargo, la variabilidad en tamaño y forma, sobre todo de *M. abbreviatus*, condujo al solapamiento de morfoespacio con asignaciones incorrectas de sus individuos. Así, ambos abordajes morfométricos resultan resolutivos para el análisis de la forma y el tamaño de las conchas de *Megalobulimus*. No obstante, sobre la base de los resultados obtenidos se evidencia que, para no incurrir en identificaciones erróneas con base en los análisis de morfometría, estos deben ser ejecutados de manera complementaria a un abordaje conquiliológico cualitativo.

Por otra parte, el mapeo de los registros de cada entidad indicó que estos megamoluscos están representados para la provincia de Misiones por dos especies, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. La primera distribuida en toda la extensión de Misiones, así como en la región limítrofe de la provincia de Corrientes; mientras que la segunda lo hace en el sur de la provincia de Misiones, con registros en Corrientes que sugieren una distribución más amplia en esta última provincia que la alcanzada por *M. sanctipauli*. Ambas especies solapan parte de su distribución y no resultan endémicas para la provincia de Misiones. En el caso puntual de *M. abbreviatus*, es aquí informada por primera vez para la Argentina, ocupando el área que fuera indicada en la literatura para

M. o. musculus en el noreste argentino. Una posible explicación para que *M. abbreviatus* haya pasado desapercibida hasta la actualidad, es que esta especie presenta características conquiliológicas solapantes con *M. o. musculus* y *M. sanctipauli*, tal como se evidenció en el análisis conquiliológico cuali-cuantitativo, motivo por el cual sus individuos se habrían enmascarado tras la identidad de *M. o. musculus* y/o *M. sanctipauli*. En este marco y de acuerdo con la evidencia recopilada, *M. o. musculus* estaría restringida solo a una pequeña área en el noroeste de la Argentina solapando distribución con *M. o. lorentzianus*, no contribuyendo así a la malacofauna terrestre de la provincia de Misiones.

En relación con el estudio anatómico efectuado, *M. o. lorentzianus* constituyó la entidad de referencia y aseguró el éxito en el abordaje de las tres entidades restantes. Esto se debió a que contaba con antecedentes previos en la literatura y a su vez presentó el mayor número de individuos con partes blandas. El análisis anatómico permitió discriminar las mismas cuatro entidades reconocidas sobre la base de evidencia conquiliológica y de distribución. Si bien no se encontraron caracteres anatómicos exclusivos para la diagnosis de cada entidad, el análisis integral del complejo paleal, sistema digestivo y reproductor permitieron generar información que en su conjunto posibilitan una caracterización anatómica propia de cada una de las cuatro entidades. Las estructuras principalmente informativas del complejo paleal fueron los vasos accesorios del pericardio, vasos adrectales transversales del surco uretral, la relación de la extensión antero-posterior del riñón con respecto al tabique pulmonar y el plexo epirrenal. En el sistema digestivo las principales estructuras informativas resultaron de su análisis interno, contribuyendo así a la diagnosis de cada entidad el tiflosol intestinal, los pliegues del intestino prevalvular (p1 - p5) y la válvula prerrectal. Para el sistema reproductor las estructuras más informativas se evidenciaron en la posición de la inserción del conducto hermafrodita en la bolsa de fertilización-complejo de la espermateca, la extensión del saco anexo del oviducto en relación a la del oviducto, extensión del oviducto *vs.* la vagina, diámetro y trayecto del conducto deferente y presencia o ausencia de flagelos en la inserción del conducto deferente y el epífalo. Internamente, las estructuras que más contribuyeron fueron el útero, la bolsa espermática, el oviducto, la vagina y los pliegues del pene. Puntualmente para cada entidad, este abordaje permitió en *M. o. lorentzianus* complementar la descripción anatómica preexistente, sobre todo en lo que refiere al sistema digestivo interno. En el

caso del material identificado mediante el abordaje conquiliológico como *M. abbreviatus*, los resultados anatómicos posibilitaron comparar la evidencia aquí lograda con los antecedentes previos para esta especie que permitieron confirmar su identidad. Al mismo tiempo, la caracterización de la anatomía de *M. o. musculus* y *M. sanctipauli* constituye el primer antecedente para ambas desde que fueron descriptas originalmente en 1948 y 1900, respectivamente. Además, la comparación anatómica de estas entidades con *M. abbreviatus*, permite respaldar la afirmación de que esta última especie está presente en las provincias de Misiones y Corrientes y no así *M. o. musculus*, que restringe su dispersión al noroeste de la Argentina.

En lo que respecta al abordaje genético, los resultados obtenidos estuvieron en total concordancia con la evidencia conquiliológica y anatómica que permitió delimitar las cuatro entidades de *Megalobulimus* abordadas. A partir de los análisis realizados, se sugiere que la información genética basada en los marcadores moleculares 16S ARNr, COI y Cyt *b* resulta de gran utilidad para complementar taxonómicamente la diagnosis y delimitar a *M. o. lorentzianus*, *M. o. musculus*, *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. Adicionalmente, los niveles de diversidad genética detectados sugieren que los marcadores aquí usados resultan de utilidad para futuros estudios filogeográficos tendientes a valorar la distribución espacial y estructuración de la variabilidad genética, con vistas a comprender la asociación entre la diversidad filogenética espacial de las entidades con procesos biogeográficos regionales. Estos estudios posibilitarían la caracterización de historias evolutivas, así como establecer prioridades de conservación en estos megamoluscos.

Es importante destacar a continuación algunas cuestiones referidas a *M. oblongus* típico en el contexto de las cuatro entidades abordadas en esta tesis doctoral. Si bien esta especie se encuentra citada para la Argentina, se encontró información contradictoria en la literatura sobre su área de distribución, con omisiones llamativas de malacólogos de reconocida trayectoria que hacen al menos cuestionable su real presencia para la Argentina. Desafortunadamente, entre el material analizado en el presente trabajo no se registraron individuos de esta especie, lo cual no permite arrojar luz en cuanto a su presencia en la Argentina, y en particular en la provincia de Misiones. Sin embargo, la información conquiliológica, anatómica y genética conocida para *M. oblongus* y disponible a través de la literatura científica permitió efectuar

comparaciones. Particularmente importantes son aquellas realizadas con *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*, establecidas y tratadas como subespecies de *M. oblongus* por Bequaert (1948), sobre la base de su estrecha relación conquiliológica dada por la escultura de la protoconcha. Si bien la escultura de la protoconcha de las tres entidades guarda una ajustada similitud, es posible afirmar que existen otros caracteres conquiliológicos que permiten discriminarlas y dudar de su correcta ubicación taxonómica, principalmente en relación con la forma de la espira y su ápice, del patrón de la banda subsutural, del callo parietal y del ancho y espesor del labio externo. Desde lo anatómico, el sistema reproductor permitió una clara separación entre *M. oblongus* típico y sus dos subespecies, siendo la presencia de un solo flagelo en *M. oblongus* el carácter anatómico más distintivo y diferencial con respecto a sus dos subespecies, que carecen del mismo. Desde el abordaje genético, *M. oblongus* típico está muy distante de sus dos subespecies, al punto tal que en las reconstrucciones filogenéticas para los marcadores mitocondriales 16S ARNr y COI, *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus* conforman un agrupamiento superior más afín a *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*, que con el propio *M. oblongus* típico. Asimismo, esta situación se evidencia a través de los elevados valores de distancias genéticas que separan a *M. oblongus* típico de *M. o. lorentzianus* y *M. o. musculus*, con niveles de divergencia interespecífica próximos a los que separan a *M. oblongus* de *M. sanctipauli* y *M. abbreviatus*. En este escenario y con base en una interpretación integral de las evidencias (conquiliológica, anatómica y genética) se sugiere que *M. o. lorentzianus* debe recuperar su estatus específico con el que originalmente fue descripta en 1876, al tiempo que *M. o. musculus* descripta originalmente como subespecie de *M. oblongus* ameritaría también ser elevada al nivel de especie.

La información obtenida en este estudio se suma a los pocos abordajes taxonómicos integrativos y cohesivos existentes en la literatura para entidades del género *Megalobulimus*. Sobre la base de la evidencia conquiliológica, anatómica, genética y de distribución para estas entidades de *Megalobulimus* fue posible ampliar las diagnosis disponibles hasta la fecha. Esto no solo resulta de utilidad para futuros estudios de esta malacofauna en la Argentina, sino también constituye una línea de base para futuras comparaciones con aquellas entidades cuyos abordajes taxonómicos están aún pendientes. Por último, cabe destacar que los criterios de identificación aquí definidos permitirían un ajuste sustancial a los acervos del material de colección

disponible, y consecuentemente de las actuales bases de datos sobre este grupo taxonómico, que al menos en la Argentina, presentan una gran cantidad y proporción de lotes de colección subidentificados.

BIBLIOGRAFÍA

Achaval M., M.A.P. Penha, A. Swarowsky, P. Rigon, L.L. Xavier, G.G. Viola, D.M. Zancan (2005) The terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as a useful model for nociceptive experiments. Effects of morphine and naloxone on thermal avoidance behavior. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 73 – 80.

Adams D.C., F. Rohlf, D.E. Slice (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the "revolution". *Italian Journal of Zoology* 71: 5 – 16.

Agudo A.I. (2006) Preliminary notes on the freshwater and terrestrial Gastropod Mollusks of the Paraná State, Southern Brazil. *Ellipsaria* 8(3): 9 – 12.

Agudo-Padrón A.I. (2008) Listagem sistemática dos moluscos continentais ocorrentes no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 9(91): 147 – 179.

Agudo-Padrón A.I. (2009) Recent terrestrial and freshwater molluscs of Paraná State, PR, southern Brazil region: a comprehensive synthesis and check list. *Visaya Net*: 1 – 8.

Agudo-Padrón A.I. (2010) The mollusc fauna of Santa Catarina State, southern Brasil: knowledge gained from 13 years of research. *Tentacle* 18: 32 – 37.

Agudo-Padrón A.I. (2011a) Threatened freshwater and terrestrial molluscs (Mollusca, Gastropoda: Bivalvia) of Santa Catarina State, southern Brazil: check list and evaluation of regional threats. *Biodiversity Journal* 2(2): 59 – 66.

Agudo-Padrón A.I. (2011b) Current knowledge on population studies on five continental molluscs (Mollusca, Gastropoda et Bivalvia) of Santa Catarina State (SC, central southern Brazil region). *Biodiversity Journal* 2(1): 9 – 12.

Agudo-Padrón A.I. (2011c) A new emerging scientific continental malacological collection and the research with mollusk fauna in the North Metropolitan region of the "Great Porto Alegre", RS, southernmost Brazil. *Ellipsaria* 4(13): 25 – 33.

Agudo-Padrón A.I. (2012) Conservation of endemic land snails in southern Brasil: new records of alien european slugs in the highlands of Santa Catarina State. *Tentacle* 20: 24 – 25.

Agudo-Padrón A.I., P. Lenhard (2011) Continental mollusc fauna of the Great Porto Alegre central region, RS, southern Brazil. *Biodiversity Journal* 2(4): 163 – 170.**Almeida** M.N., E.C. Almeida Bessa (2001) Estudo do crescimento e da reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac) (Mollusca, Xanthonychidae) em laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 18: 1115 – 1122.

Altschul S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403 – 410.

Ancey M.C.F. (1897) Viaggio del Dr. A. Borelli nel Chaco Boliviano e nella Rep. Argentina. Résultats malacologiques. *Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Torino* 12(309): 1 – 22.

Baker H.B. (1926) The Mollusca collected by the University of Michigan – Williamson Expedition in Venezuela. *Occasional Papers of the Museum of Zoology, University of Michigan* 167: 1 – 66.

Barbosa dos Santos S. (2011) Land snails as flagship and umbrella species for Brasilian Atlantic Forest conservation. *Tentacle* 19: 19 – 20.

Barbosa dos Santos S., I.C. Miyahira, M.C.D. Mansur (2013) Freshwater and terrestrial molluscs in Brasil: current status of knowledge and conservation. *Tentacle* 21: 40 – 42.

Barr N.B., A. Cook, P. Elder, J. Molongoski, D. Prasher, D.G. Robinson (2009) Application of a DNA barcode using the 16S rRNA gene to diagnose pest *Arion* species in the USA. *Journal of Molluscan Studies* 75: 187 – 191.

Bastir M., A. Rosas, K. Kuroe (2004) Petrosal orientation and mandibular ramus breadth: evidence for an integrated petroso-mandibular developmental unit. *American Journal of Physical Anthropology* 123: 340 – 350.

Beltramino A.A. (2013) Distribution of *Megalobulimus sanctipauli* (Ihering and Pilsbry, 1900) (Gastropoda: Megalobulimidae) in South America. *Check List* 9(2): 469 – 471.

Beltramino A.A. (2014) Distribución histórica y área de distribución potencial del megamolusco terrestre *Megalobulimus lorentzianus* (Doering, 1876) (Gastropoda: Pulmonata) en América del Sur. *Boletín de la Asociación Argentina de Malacología (ASAM)* 4(1): 10 – 13.

Beltramino A.A., R.E. Vogler, A. Rumi (2012a) *Megalobulimus sanctipauli* (Ihering y Pilsbry, 1900): antecedentes de la especie. *Amici Molluscarum* 20(2): 19 – 24.

Beltramino A.A., R.E. Vogler, V. Núñez, D.E. Gutiérrez Gregoric, A. Rumi (2012b) Molecular markers in *Megalobulimus sanctipauli* (Ihering & Pilsbry, 1900). En: *XI International Congress on Medical and Applied Malacology*. *Abstract Book*: Granatelli A.T.I., A.R.T. Piza, L.F. Tallarico (eds.). p. 175. Rio de Janeiro. Brasil. *Sociedade Brasileira de Malacologia* (ISBN 978-85-61417-02-4).

Beltramino A.A., R.E. Vogler, D.E. Gutiérrez Gregoric, A. Rumi (2015a) Impact of climate change on the distribution of a giant land snail from South America: predicting future trends for setting conservation priorities on native malacofauna. *Climatic Change* 131: 621 – 633.

Beltramino A.A., R.E. Vogler, A. Rumi (2015b) Organización génica parcial del genoma mitocondrial del caracol gigante terrestre *Megalobulimus lorentzianus* (Gastropoda). En: *XXIV Encontro Brasileiro de Malacologia*. Libro de Resumen: Pimenta A.D., A.R.T. Piza (eds.). p. 126. Rio de Janeiro. Brasil. *Sociedade Brasileira de Malacologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.*

Bequaert J.C. (1948) Monograph of the Strophocheilidae, a neotropical family of terrestrial mollusks. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 100(1): 1 – 210.

Birky C.W. Jr. (2007) Workshop on barcoded DNA: application to rotifer phylogeny, evolution and systematic. *Hydrobiologia* 593: 175 – 183.

Birky C.W. Jr, J. Adams, M. Gemmel, J. Perry (2010) Using population genetic theory and DNA sequences for species detection and identification in asexual organisms. *PLoS ONE* 5: e10609.

Bonard A.R., C.H. Caldini, S.E. Miquel (2012) *Mirinaba fusoides* (Bequaert, 1948) (Mollusca, Strophocheilidae): primer registro de la especie en la República Argentina. *Historia Natural* 2(2): 95 – 100.

Bookstein F. (1989) Principal warps: Thin-plate splines and the decomposition of deformations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 11: 567 – 588.

Bookstein F.L. (1991) *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. New York: Cambridge University Press. 435 pp.

Borda V., R. Ramírez (2013) Re-characterization of the red-lip *Megalobulimus* (Gastropoda: Strophocheilidae) from Peru with description of a new species. *Zoologia* 30(6): 675 – 691.

Borda V., R. Ramírez (2014) Morphometric analysis to discriminate between species: the case of the *Megalobulimus leucostoma* complex. *Revista Peruana de Biología* 21(2): 117 – 124.

Borda V., R. Ramírez, P. Romero (2010) Glándula pediosa de moluscos terrestres y sus implicancias evolutivas, con énfasis en *Megalobulimus*. *Revista Peruana de Biología* 17(1): 43 – 52.

Bouchet P., J.P. Rocroi (2005) Classification and nomenclator of Gastropod families. *Malacologia* 47: 1 – 397.

Breure A.S.H., P.E. Romero (2012) Support and surprises: molecular phylogeny of the land snail superfamily Orthalicoidea using a three-locus gene analysis with a divergence time analysis and ancestral area reconstruction (Gastropoda: Stylommatophora). *Archiv für Molluskenkunde* 141(1): 1 – 20.

Bruschi-Figueiró G., I.L. Veitenheimer-Mendes (2002) Moluscos em área de horticultura no municipio de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 19(2): 31 – 37.

Buckleya T.R., I. Stringerb, D. Gleesona, R. Howitta, D. Attanayakea, R. Parrishc, G. Sherleyd, M. Rohan (2011) A revision of the New Zealand *Placostylus* land snails using mitochondrial DNA and shell morphometric analyses, with implications for conservation. *New Zealand Journal of Zoology* 38(1): 55 – 81.

Campos Salgado N., A.C. dos Santos Coelho (2003) Moluscos terrestres do Brasil (Gastrópodes operculados ou não, exclusive Veronicellidae, Milacidae e Limacidae). *Revista de Biología Tropical* 51(3): 149 – 189.

Carvajal-Rodríguez A., P. Conde-Padín, E. Rolán-Alvarez (2005) Decomposing shell form into size and shape by geometric morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis. Journal of Molluscan Studies* 71: 313 – 318.

Cavalcanti M., L. Monteiro, P. Lopes (1999) Landmark-based morphometric analysis in selected species of serranid fishes (Perciformes: Teleostei). *Zoological Studies* 38: 287 – 294.

Chirinos J., C. Congrains, R. Ramírez, P. Ramírez (2010) Identification of *Yarrowia lipolytica* (Ascomycota: Hemiascomycetes) as a contaminant in obtaining amplified 28S rRNA gene of mollusks. *Revista Peruana de Biología* 17(1): 59 – 64.

Chiu Y.W., H.C. Chen, S.C. Lee, C.A. Chen (2002) Morphometric analysis of shell and operculum variations in the viviparid snail, *Cipangopaludina chinensis* (Mollusca: Gastropoda), in Taiwan. *Zoological Studies* 41: 321 – 331.

Cockerell T.D.A. (1926) *Borus Lorentzianus* Doering. *The Nautilus* 39: 77 – 79.

CONABIO [Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad] (2008) *Georreferenciación de localidades de Colecciones Biológicas. Manual de Procedimientos*. México D.F.: CONABIO. 177 pp.

Conde-Padín P., J.W. Grahame, E. Rolán-Alvarez (2007) Detecting shape differences in species of the *Littorina saxatilis* complex by morphometric analysis. *Journal of Molluscan Studies* 73: 147 – 154.

Cuezzo M.G., F. Drahg (1995) Moluscos depositados en la Colección de la Fundación Miguel Lillo: Argentina. *Acta Zoológica Lilloana* 43(1): 185 – 205.

Cunha R.L., C. Grande, R. Zardoya (2009) Neogastropod phylogenetic relationships based on entire mitochondrial genomes. *BMC Evolutionary Biology* 9: 210. [doi:10.1186/1471-2148-9-210].

Cruz R.A.L., M.J.R. Pante, F. Rohlf (2012) Geometric morphometric analysis of shell shape variation in *Conus* (Gastropoda: Conidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 165: 296 – 310.

Davison A., C.M. Wade, P.B. Mordan, S. Chiba (2005) Sex and darts in slugs and snails (Mollusca: Gastropoda: Stylommatophora). *Journal of Zoology* 267: 329 – 338.

Davison A., R.L.E. Blackie, G.P. Scothern (2009) DNA barcoding of Stylommatophora land snails: a test of existing sequences. *Molecular Ecology Resources* 9: 1092 – 1101.

Deisler J.E., L.A. Stange (1982) The giant South American snail, *Megalobulimus oblongus* (Muller) (Gastropoda: Megalobulimidae). *Entomology Circular* 239: 1 – 4.

DeSalle R., M.G. Egan, M. Siddall (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1905 – 1916.

Di Bitetti M.S., G. Placci, L.A. Dietz (2003) *Una visión de biodiversidad de la ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná*. Washington D.C.: World Wildlife Fund. 154 pp.

Díaz A.C., A.A. Beltramino, R.E. Vogler, S.M. Martín (2012) Morphometric analysis of *Bulimulus bonariensis bonariensis* (Rafinesque, 1833) and *Bulimulus bonariensis sporadicus* (d´orbigny, 1835) (Gastropoda, Orthalicidae). En: *XI International Congress on Medical and Applied Malacology*. *Abstract Book*: Granatelli A.T.I., A.R.T. Piza, L.F. Tallarico (eds.) p. 142. Rio de Janeiro. Brasil. *Sociedade Brasileira de Malacologia* (ISBN 978-85-61417-02-4).

Doering D.A. (1876) Apuntes sobre la fauna de moluscos de la República Argentina (Tercera parte). *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias Exactas en Córdoba* 2: 300 – 339.

Doering D.A. (1877) Apuntes sobre la fauna de moluscos de la República Argentina (Continuación). *Periódico Zoológico* 2: 219 – 259.

Douris V., R.A.D. Cameron, G.C. Rodakis, R. Lecanidou (1998) Mitochondrial phylogeography of the land snail *Albinaria* in Crete: long-term geological and short-term vicariance effects. *Evolution* 52: 116 – 125.

Emberton K.C. (1995) Land snail community morphologies of the highest diversity sites of Madagascar, North America, and New Zealand, with recommended alternatives to height diameter plots. *Malacologia* 36: 43 – 66.

ESRI (2008) ArcGIS v.9.3. ESRI, Redlands, California, USA.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783 – 791.

Fernández D. (1973) Catálogo de la malacofauna terrestre argentina. *Monografías* 4: 1 – 183. La Plata: Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

Fernández D. (1978) Nota sobre *Strophocheilus* sinistrales (Moll. Gastr.). *Neotropica* 24(72): 149 – 150.

Fernández D., Z.J.A. Castellanos (1973) Clave genérica de la malacofauna terrestre argentina. *Revista del Museo de La Plata (Nueva Serie) Sección Zoología* 11(107): 265 – 285.

Fernández D., A. Rumi (1984) Contribución al conocimiento de la malacofauna del Parque Nacional "El Rey" Prov. de Salta República Argentina I (en especial del Cerro Maldonado). *Revista del Museo de La Plata (Nueva Serie) Sección Zoología* 13: 211 – 222.

Figueiras A. (1963) Enumeración sistemática de los moluscos terrestres del Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 1(4): 79 – 96.

Folmer O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294 – 299.

Fontaneto D., J.F. Flot, C.Q. Tang (2015) Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. *Marine Biodiversity* 45(3): 433 – 451.

Fontenelle J.H. (2012) Anatomia, taxonomia e distribuição geográfica dos caracóis gigantes do "Complexo *Megalobulimus granulosus*" (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). Tesis de Maestría, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações, Universidade de São Paulo, Brasil. 168 pp.

Fontenelle J.H., M.S. Miranda (2012) The use of outer lip in age estimation of *Megalobulimus paranaguensis* (Gastropoda, Pulmonata). *Strombus* 19: 15 – 22.

Fontenelle J.H., D.C. Cavallari, L.R.L. Simone (2014) A new species of *Megalobulimus* (Gastropoda, Strophocheilidae) from Brazilian shell mounds. *Strombus* 21(1-2): 30 – 37.

Forsdyke D.R. (2012) Functional constraint and molecular evolution. En: *eLS*. Chichester: John Wiley y Sons Ltd. [doi: 10.1002/9780470015902.a0001804.pub3]. 9 pp.

Freeland J. (2005) *Molecular Ecology*. West Sussex: John Wiley and Sons. 308 pp.

Frenguelli J. (1923) Conchas de *Borus* en los paraderos indígenas del Río San Roque (Sierra Chica de Córdoba-Departamento de Punilla). *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias en Córdoba* 26: 404 – 418.

Frézal L., R. Leblois (2008) Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 727 – 736.

Goodacre S.L., C.M. Wade (2001) Patterns of genetic variation in Pacific Island land snails: the distribution of cytochrome *b* lineages among Society Island *Partula*. *Biological Journal of the Linnean Society* 73: 131 – 138.

Green M.R., J. Sambrook (2012) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2028 pp.

Gutiérrez Gregoric D.E., V. Núñez, R.E. Vogler, A. Rumi (2011) Invasion of the Argentinean Paranense rainforest by the giant African snail *Achatina fulica*. *American Malacological Bulletin* 29(1-2): 135 – 137.

Gutiérrez Gregoric D.E., V. Núñez, R.E. Vogler, A.A. Beltramino, A. Rumi (2013a) Gasterópodos terrestres de la provincia de Misiones, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 61(4): 1759 – 1768.

Gutiérrez Gregoric D.E., A.A. Beltramino, R.E. Vogler, M.G. Cuezzo, V. Núñez, S.R. Gomes, M. Virgillito, S.E. Miquel (2013b) First records of four exotic slugs in Argentina. *American Malacological Bulletin* 31(2): 245 – 256.

Hajibabaei M., J.R. deWaard, N.V. Ivanova, S. Ratnasingham, R.T. Dooh, S.L. Kirk, P.M. Mackie, P.D.N. Hebert (2005) Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1959 – 1967.

Hajibabaei M., D.H. Janzen, J.M. Burns, W. Hallwachs, P.D.M. Hebert (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 968 – 971.

Hall T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95 – 98.

Hammer Ø., D.A.T. Harper, P.D. Ryan (2013) PAST (Paleontological Statistics) version 2.16. Software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica* 4: 1 – 9.

Hebert P., T. Gregory (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54: 852 – 859.

Hebert P., S. Ratnasingham, J.R. deWaard (2003a) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London* 270: S596 – S599.

Hebert P., A. Cywinska, S.L. Ball, J.R. deWaard (2003b) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270: 313 – 321.

Hebert P., M.Y. Stoeckle, T.S. Zemlak, C.M. Francis (2004) Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology* 2(10): 1657 – 1663.

Heethoff M., M. Laumann, G. Weigmann, G. Raspotnig (2011) Integrative taxonomy: combining morphological, molecular and chemical data for species delineation in the parthenogenetic *Trhypochthonius tectorum* complex (Acari, Oribatida, Trhypochthoniidae). *Frontiers in Zoology* 8(2): 1 – 10.

Hickerson M.J., C.P. Meyer, C. Moritz (2006) DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology* 55: 729 – 739.

Hickson R.E., C. Simon, A. Cooper, G.S. Spicer, J. Sullivan, D. Penny (1996) Conserved sequence motifs, and secondary structure for the third comain of animal 12S rRNA. *Molecular Biology and Evolution* 13(1): 150 – 169.

Holznagel W. (1998) A nondestructive method for cleaning gastropod radulae from frozen, alcohol-fixed, or dried material. *American Malacological Bulletin* 14: 181 – 183.

Horn A.C.M., M. Achaval, D.M. Zancan (2005) The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948) (Gastropoda, Pulmonata). *Brazilian Journal of Biology* 65: 459 – 467.

Hugall A.F., J. Stanisic, C. Moritz (2003) Phylogeography of terrestrial mollusks: the case of the *Sphaerospira* lineage and history of Queensland rainforests. En: Lydeard C., D. Lindberg (eds.) *Molecular systematics and phylogeography of mollusks*. pp. 270 – 301. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press.

Hughes A.L. (2005) Selective and Structural Constraints. En: *eLS*. Chichester: John Wiley y Sons Ltd. [doi: 10.1038/npg.els.0005124]. 3 pp.

Hylton Scott M.I. (1939) Estudio anatómico del Borus "*Strophocheilus lorentzianus*" (Doer.) (Mol. Pulm.). *Revista del Museo de La Plata (Nueva Serie) Sección Zoología* 1(7): 217 – 278.

ICZN (1936) Opinions rendered by the International Commission on Zoological Nomenclature, Opinion 124 to 133. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 73(8): 1 – 44.

Ihering H. (1891) Sur les rélations naturelles des Cochlides et des Ichnopodes. *Bulletin Scientifique de la France et de la Belgique* 23: 148 – 254.

Indrusiak L.F., J.L.M. Leme (1985) A comparative anatomical study of three species of *Mirinaba* Morretes, 1952 (Gastropoda, Strophocheilidae) from Paraná State, Brazil. *Acta Biológica Paranaense* 14: 163 – 180.

IUCN (2015) IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2015.2. ttp://www.iucnredlist.org. Acceso 02 Agosto 2015.

Ivanova N., C. Grainger (2006) COI amplification. En: *CCDB Protocols*. Canadian Centre for DNA Barcoding (www.dnabarcoding.ca). 2 pp.

Jaramillo Roldán E., J. López Martínez, R. Ramírez, L.E. Velásquez Trujillo (2014) Morphological analysis of the reproductive system and molecular identification by mitochondrial markers COI and 16S rRNA of *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Strophocheilidae) of Colombia. *Revista Peruana de Biología* 21(1): 79 – 88.

Kalil-Gaspar P., S. Marcuzzo, P. Rigon, C. Goulart Molina, M. Achaval (2007) Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: evidence for TRPV-1 signaling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comparative Biochemistry and Physiology* A148: 286 – 291.

Katoh K., G. Asimenos, H. Toh (2009) Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods in Molecular Biology* 537: 39 – 64.

Kawano T., J.L.M. Leme (1994) Chromosomes of three species of *Megalobulimus* (Gastropoda: Mesurethra: Megalobulimidae) from Brazil. *Malacological Review* 27: 47 – 52.

Klappenbach M.A., J. Olazarri (1965) Nota sobre Strophocheilidae (Moll. Gastr.), *Strophocheilus parodizi*, nueva especie de la provincia de Corrientes-Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"* 4(1):1 – 5.

Larkin M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947 – 2948.

Leme J.L.M. (1973) Anatomy and systematics of the neotropical Strophocheiloidea (Gastropoda, Pulmonata) with the description of a new family. *Arquivos de Zoologia* 23: 295 – 337.

Leme J.L.M. (1989) *Megalobulimus lopesi* sp. n., uma nova espécie de Pulmonata terrestre da Mata Atlântica brasileira (Mollusca, Gastropoda, Megalobulimidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 84(4): 313 – 318.

Leme J.L.M. (1993) Estudo anatómico sobre *Megalobulimus auritus* (Sowerby, 1838) (Gastropoda, Megalobulimidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 38(7): 95 – 105.

Leme J.L.M., L.F. Indrusiak (1990) *Megalobulimus parafragilior* sp. n., uma nova espécie de Pulmonata terrestre da Serra do Mar (Gastropoda, Megalobulimidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 37(5): 97 – 105.

Leme J.L.M., L.F. Indrusiak (1995) Anatomia e consideracoes sobre *Megalobulimus proclivis* (Martens, 1888). *Iheringia, série Zoologia* 78: 19 – 27.

Librado P., J. Rozas (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451 – 1452.

López Soriano J. (2004) Técnicas de biología molecular aplicadas a la taxonomía y filogenia de moluscos. *Spira* 1(4): 23 – 33.

Madec L., A. Bellido (2007) Spatial variation of shell morphometrics in the subantarctic land snail *Notodiscus hookeri* from Crozet and Kerguelen Islands. *Polar Biology* 30: 1571 – 1578.

Madec L., A. Bellido, A. Guiller (2003) Shell shape of the land snail *Cornu aspersum* in North Africa: unexpected evidence of a phylogeographical splitting. *Heredity* 91: 224 – 231.

Mansur M.C.D., J.L.M. Leme (1996) The endangered giant *Megalobulimus* from the Atlantic Forest of Brazil. *Tentacle* 6: 14 – 15.

Márquez F., J. Robledo, G.E. Peñaloza, S. Van der Molen (2010) Use of different geometric morphometrics tools for the discrimination of phenotypic stocks of the striped clam *Ameghinomya antiqua* (Veneridae) in north Patagonia, Argentina. *Fisheries Research* 101: 127 – 131.

Martinez-Pereira M.A., R. da Cunha Franceschi, G. de Freitas Antunes, B. Paranhos Coelho, M. Achaval, D.M. Zancan (2013) General morphology and innervation of the midgut and hindgut of *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata). *Zoological Science* 30: 319 – 330.

Merritt T.J.S., L. Shi, M.C. Chase, M.A. Rex, R.J. Etter, J.M. Quattro (1998) Universal cytochrome *b* primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7(1):7 – 11.

Meyer C.P., G. Paulay (2005) DNA Barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3: e422.

Miquel S.E., M.L. Aguirre (2011) Taxonomía de los gasterópodos terrestres del Cuaternario de Argentina. *Revista Española de Paleontología* 26(2): 101 – 133.

Miquel S.E., H. Parent (1996) Moluscos gasterópodos de la provincia de Santa Fe, Argentina. *Malacological Review* 29: 107 – 112.

Miranda M.J., M.G. Cuezzo (2010) Biodiversidad de gasterópodos terrestres (Mollusca) en el Parque Biológico Sierra de San Javier, Tucumán, Argentina. *Revista de Biología Tropical* 58(3): 1009 – 1029.

Miranda M.J., M.G. Cuezzo (2014) Taxonomic revision of the *Bostryx stelzneri* species complex, with description of a new species (Gastropoda: Orthalicoidea: Bulimulidae). *American Malacological Bulletin* 32(1): 74 – 93.

Miranda M.S., J.H. Fontenelle, I.L. Pecora (2015) Population structure of a native and an alien species of snail in an urban area of the Atlantic Rainforest. *Journal of Natural History* 49(1-2): 19 – 35.

Monteiro L., S.F.D. Reis (1999) *Principíos de morfometria geometrica*. Riberão Preto: Holos Editora. 188 pp.

Moraes G.D., M. Achaval, M.M. Dal Piva, M.C Faccioni-Heuser, G.F. Wassermann, D.M. Zancan (2010) Ultrastructural analysis of the dorsal body gland of the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Becquaert, 1948). *Brazilian Journal of Biology* 70(2): 341 – 350.

Moritz C., T.E. Dowling, W.M. Brown (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269 – 292.

Morretes F.L. (1949) Ensaio de catálogo dos moluscos do Brasil. *Arquivos do Museu Paranaense* 7: 5 – 216.

Morretes F.L. (1952) Novas espécies brasileiras da familia Strophocheilidae. *Arquivos de Zoologia* 8(4): 109 – 128.

Morretes F.L. (1953) Adenda e corrigenda ao ensaio de catálogo dos moluscos do Brasil. *Arquivos do Museu Paranaense* 10(1): 37 – 76.

Morrone J.J. (2014) Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782: 1 – 110.

Nei M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.

Nei M., S. Kumar (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. New York: Oxford University Press. 333 pp.

Nei M., W.H. Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76: 5269 – 5273.

Nóblega H.G., F. Rigon, C. Stenert, M.C. Faccioni-Heuser, M. Achaval (2006) Permeability of the haemolymph-neural interface in the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Gastrópoda, Pulmonata): an ultrastructural approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 144(1): 119 – 124.

Núñez V. (2011) Revision of two species of Physidae. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 93 – 108.

Parodiz J.J. (1951) Métodos de conquiliometría. *Physis* 20(58): 241 – 248.

Parodiz J.J. (1957) Catalogue of the land mollusca of Argentina. *The Nautilus* 70: 127 – 135.

Parodiz J.J. (1982) Distribution and origin of the continental South America malacofauna. *Malacologia* 22: 421 – 425.

Pena M.S., N. Campos Salgado, A.C. dos Santos Coelho (2004) Recharacterization of *Strophocheilus miersi* Da Costa (Mollusca, Pulmonata, Strophocheilidae). *Revista Brasileira de Zoologia* 21(1): 45 – 50.

Peña C. (2011) Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología* 18: 265 – 267.

Pilsbry H.A. (1895-1896) American Bulimi and Bulimuli. *Strophocheilus, Plekocheilus, Auris, Bulimulus. Manual of Conchology, Structural and Systematic, with Illustrations of the Species; Second Series: Pulmonata* 10. Philadelphia: Conchological Section, Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 213 pp. + 51 Pls. [septiembre de 1896: parte 40, pp. 145 – 213 + Pls. 41 – 51].

Pilsbry H.A. (1900) New South American land snails. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 52: 385 – 394.

Pilsbry H.A. (1901–1902) Oriental bulimoid Helicidae; Odontostominae; Cerionidae. *Manual of Conchology, Structural and Systematic, with Ilustrations of the Species; Second Series: Pulmonata* 14. Philadelphia: Conchological Section, Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 302 pp. + 62 Pls. [6 de septiembre de 1901: parte 54, pp. 65 – 128 + Pls. 16 – 21; abril de 1902: parte 56, pp. 193 – 302 + Pls. 37 – 62].

Pilsbry H.A. (1902) Classification of Bulimulidae and index to volumes X, XI, XII, XIII and XIV. *Manual of Conchology, Structural and Systematic, with Illustrations of the Species; Second Series: Pulmonata.* Philadelphia: Conchological Section, Academy of Natural Sciences of Philadelphia. xcix pp.

Pinto de Oliveira M., G.J.R. Rezende, G.A. Castro (1984) *Megalobulimus* (*Phaiopharus*) *granulosus* Rang, 1831 (Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora, Strophocheilidae). *Ministério da Educação e Cultura, Universidade Federal de Juiz de Fora, Comunicações Malacológicas* 15: 1 – 18.

Pizá J., N.J. Cazzaniga (2010) Allopatry and anatomical distinctiveness of two puzzling land snails in genus *Plagiodontes*, from Argentina (Gastropoda: Orthalicidae, Odontostominae). *Malacologia* 53(1): 1 – 24.

Plomp K.A., U.S. Viðarsdóttir, D.A. Weston, K. Dobney, M. Collard (2015) The ancestral shape hypothesis: an evolutionary explanation for the occurrence of intervertebral disc herniation in humans. *BMC Evolutionary Biology* 15(1): 68. [doi:10.1186/s12862-015-0336-y].

Quintana M.G. (1982) Catálogo preliminar de la malacofauna del Paraguay. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"* 11(3): 61 – 158.

Rambaut A., A.J. Drummond (2009) Tracer v1.5. http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer.

Ramírez R., C. Paredes, J. Arenas (2003) Moluscos del Perú. *Revista de Biología Tropical* 51(3): 225 – 284.

Ramirez J., R. Ramírez, P. Romero, A. Chumbe, P. Ramírez (2009) Posición evolutiva de caracoles terrestres peruanos (Orthalicidae) entre los Stylommatophora (Mollusca: Gastropoda). *Revista Peruana de Biología* 16(1): 51 – 56.

Ramírez R., V. Borda, P. Romero, J. Ramirez, C. Congrains, J. Chirinos, P. Ramírez, L.E. Velásquez, K. Mejía (2012) Biodiversity and endemism of the western Amazonia land snails *Megalobulimus* and *Systrophia*. *Revista Peruana de Biología* 19(1): 59 – 74.

Rengifo Vásquez A.P., P. Padilla Pérez, L. Mori Pinedo (2004) Caracterización morfológica del "congonpe" *Megalobulimus maximus* (Sowerby, 1825) y posibilidades de su cultivo, Iquitos, Perú. *Memorias: Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonia y Latinoamérica*. pp. 269 – 275.

Rigon P., J. de Castilhos, L. Saur, M.F. Rodrigues, M. Achaval, L.L. Xavier (2009) NADPH-diaphorase activity in the nociceptive pathways of land snail *Megalobulimus abbreviatus*: the involvement of pedal ganglia. *Invertebrate Neuroscience* 9(3-4): 155 – 165.

Rigon F., G. Mânica, F. Guma, M. Achaval, M.C. Faccioni-Heuser (2010) Ultrastructural features of the columellar muscle and contractile protein analyses in

different muscle groups of *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata). *Tissue and Cell* 42: 53 – 60.

Rohlf F. (1993) Relative warp analysis and an example of its application to Mosquito. En: Marcus L., E. Bello, A. García-Valdecasas (eds.) *Contributions to morphometrics*. pp. 131 – 159. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.

Rohlf F. (1999) Shape statistics: procrustes superimpositions and tangent spaces. *Journal of Classification* 16: 197 – 223.

Rohlf F. (2008) TPSDIG: Version 2.12. New York State University at Stony Brook.

Rohlf F. (2010) TPSRELW: Version 1.49. New York State University at Stony Brook.

Rohlf F. (2011) TPSREGR: Version 1.38. New York State University at Stony Brook.

Rohlf F., L.F. Marcus (1993) A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 129 – 132.

Rohlf F., D. Slice (1990) Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39: 40 – 59.

Rohlf F., A. Loy, M. Corti (1996) Morphometric analysis of Old World Talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial-warp scores. *Systematic Biology* 45: 344 – 362.

Romero S.M.B. (2004) Growth of *Megalobulimus mogianensis* (Gastropoda: Megalobulimidae) raised in the laboratory from hatching to adulthood. *American Malacological Bulletin* 18(1-2): 79 – 85.

Ronquist F., M. Teslenko, P. van der Mark, D.L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M.A. Suchard, J.P. Huelsenbeck (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539 – 542.

Rozas J. (2009) DNA sequence polymorphism analysis using DnaSP. *Methods in Molecular Biology* 537: 337 – 350.

Saccone C., C. De Giorgi, C. Gissi, G. Pesole, A. Reyes (1999) Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238: 195 – 209.

Saitou N., M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406 – 425.

Sawaya P., J.A. Petersen (1962) Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (Molusco, Gastrópode) no Rio Grande do Sul. *Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Boletim* 261(24): 31 – 42.

Scarabino F. (2003) Lista sistemática de los Gastropoda terrestres vivientes de Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 8(78–79): 203 – 214.

Schade F.H. (1965) Lista de los moluscos del Guaira (Villarrica - Paraguay) conocidos hasta el presente. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 1(8): 209 – 221.

Schneider H. (2007) *Métodos de análise filogenética: um guía prático. 3ra ed*. Riberão Preto: Holos Editora and Sociedade Brasileira de Genética. 200 pp.

Semper C. (1870) Landmollusken. *Reisen im Archipel der Philippinen* 3: 1 – 391.

Simison W.B., J. Boore (2008) Molluscan evolutionary genomics. En: Ponder E.F., D.R. Lindberg (eds.) *Phylogeny and evolution of the Mollusca*. pp. 447 – 461. Berkeley: University of California Press.

Simone L.R.L. (2006) *Land and freshwater mollusc of Brazil*. São Paulo: EGB Fapesp. 390 pp.

Simone L.R.L. (2012) Taxonomical study on a sample of pulmonates from Santa Maria da Vitória, Bahia, Brazil, with description of a new genus and four new species (Mollusca: Orthalicidae and Megalobulimidae). *Papéis Avulsos de Zoologia* 52(36): 431 – 439.

Simone L.R.L., J.L.M. Leme (1993) Considerações sobre o Holótipo de *Strophocheilus sanctipauli pygmaeus* Bequaert, 1948 (Gastropoda, Megalobulimidae). En: *XIII*

Encontro Brasileiro de Malacologia. p. 37. Rio de Janeiro, Brasil. Sociedade Brasileira de Malacologia.

Simone L.R.L., J.L.M. Leme (1998) Two new species of Megalobulimidae (Gastropoda, Strophocheiloidea) from north São Paulo, Brazil. *Iheringia, série Zoologia* 85: 189 – 203.

Siqueira Dornellas A.P., L.R.L. Simone (2011) Annotated list of type specimens of mollusks deposited in Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brazil. *Arquivos de Zoologia* 42(1): 1 – 81.

Solas M.R., R.N. Hughes, F. Márquez, A. Brante (2015) Early plastic responses in the shell morphology of *Acanthina monodon* (Mollusca, Gastropoda) under predation risk and water turbulence. *Marine Ecology Progress Series* 527: 133 – 142.

Stöver B.C., K.F. Müller (2010) TreeGraph 2: combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11: 7.

Strauss R.E. (2010) Discriminating groups of organisms. En: Elewa, A.M.T. (ed.) *Morphometrics for nonmorphometricians*. *Lecture Notes in Earth Sciences* 124. pp. 73 – 91. Heidelberg: Springer-Verlag.

Tamura K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731 – 2739.

Tautz D., P. Arctander, A. Minelli, R.H. Thomas, A.P. Vogler (2003) A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 70 – 74.

Thiele J. (1929-1935) *Handbuch der systematischen Weichtierkunde*. Jena: Fischer. 1154 pp.

Thomé J.W., A.E. Quillfeldt Carara, M.T. Osório Mallmann, P.T. Campos Lopes, V.I. Schneider (1994) *Manual de aulas práticas de zoologia: estudo morfo-anatômico de um molusco gastrópode Mesuretra*. Porto Alegre: EDIPUCRS. 32 pp.

Tompa A.S., K.M. Wilbur, J.H. Waite (1977) Structural proteins in the calcified egg shell of the giant land snail, *Strophocheilus oblongus* (Becquaert). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 56(3): 279 – 283.

Toro I.M.V., S.G. Manriquez, G.I. Suazo (2010) Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: de la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology* 28: 977 – 990.

Vasta G.R., M.E. Chiesa, M. Palatnik (1975) Agglutinins and protectins in the snail *Borus*. *Medicina* 36(2): 107 – 112.

Vera Ardila M.L. (2008) Lista de los géneros de moluscos terrestres de Colombia (Mollusca: Gastropoda: Prosobranchia: Mesogastropoda y Pulmonata: Stylommatophora). *Biota Colombiana* 9(1): 39 – 62.

Vogler R.E., A.A. Beltramino, D.E. Gutiérrez Gregoric, J.G. Peso, M. Griffin, A. Rumi (2012) Threatened Neotropical mollusks: analysis of shape differences in three endemic snails from High Paraná River by geometric morphometrics. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 1045 – 1052.

Wade C.M., P.B. Mordan, B. Clarke (2001) A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). *Proceedings the Royal of Society of London B* 268: 413 – 422.

Wade C.M., P.B. Mordan, F. Naggs (2006) Evolutionary relationships among the Pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society* 87(4): 593 – 610.

Ward R.D., T.S. Zemlak, B.H. Innes, P.R. Last, P.D.M Hebert (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 360: 1847 – 1857.

Watterson G.A. (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7: 256 – 276.

Wieczorek J., D. Bloom (2011) Manual for the georeferencing calculator. http://manisnet.org/GeoreferencingCalculatorManualv2.html. Ultimo acceso 18-03-2015.

Wieczorek J., Q. Guo, C. Boureau, C. Wieczorek (2001) Georeferencing calculator. http://manisnet.org/gci2.html. Ultimo acceso 18-03-2015.

Wieczorek J., Q. Guo, R. Hijmans (2004) The point-radius method for georeferencing locality descriptions and calculating associated uncertainty. *International Journal of Geographical Information Science* 18: 745 – 767.

Wieczorek J., D. Bloom, H. Constable, J. Fang, M. Koo, C. Spencer, K. Yamamoto (2012) Georeferencing quick reference guide. http://manisnet.org/GeoreferencingQuickReferenceGuide.pdf. Ultimo acceso 18-03-2015.

Zelditch M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets, W.L. Fink (2004) *Geometric morphometrics for biologists*. New York: Elsevier Academic Press. 416 pp.