

**Diferenciación de especies pertenecientes al  
género *Biomphalaria* Preston, 1910;  
actualización de su distribución en el  
departamento de Cerro Largo  
(Uruguay) y su importancia sanitaria ante la potencial  
extensión de la Esquistosomiasis.**



Bach. Natalia Carolina Contenti Pacce

Pasantía de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Profundización en Ecología

Orientador: Dra. Verónica Gutiérrez

Co-Orientador: Msc. Cristhian Clavijo

Sección Genética Evolutiva

**Diciembre, 2016**

## **Agradecimientos**

A toda mi **familia**, por su apoyo incondicional en cada cosa que emprendo y el sostén emocional en este último tiempo.

A **Gonzalo**, por estar siempre a mi lado, apoyarme y comprenderme a lo largo de todos estos años.

A **Verónica Gutiérrez**, por guiarme en cada paso, por la confianza, paciencia, dedicación y la consideración necesaria en cada momento; al lado de ella aprendí mucho acerca de técnicas en Biología Molecular.

A **Cristhian Clavijo**, quien me abrió las puertas desde un comienzo para la realización de mi Pasantía de grado y de quién aprendí enormemente acerca de *Biomphalaria*.

A la Facultad de Ciencias, **Sección Genética Evolutiva**, por permitirme la realización de la Pasantía de grado.

Al **Museo Nacional de Historia Natural (MNHN)**, por permitirme la revisión de las colecciones presentes en el museo.

A **Olivia Lluch** por aportar gentilmente ejemplares de las localidades de Itacuruzú y Los Mimbres.

A **Graciela Garcia** por facilitarme bibliografía necesaria y por sus palabras de aliento.

A **todas mis amigas**, que fueron testigos de este proceso y conté con todo su apoyo comprensión y contención.

## Índice

<b>Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>4</b>
El género <i>Biomphalaria</i>	5
Relevancia epidemiológica del género <i>Biomphalaria</i>	6
Modo de transmisión de la Esquistosomiasis mansonica	8
ADN mitocondrial como herramienta en análisis filogeográficos	9
Hipótesis	13
<b>Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>15</b>
Revisión de colecciones y mapas de distribución específicos	15
Obtención de las muestras y área de estudio	15
Extracción de ADN sin fenol-cloroformo	21
Calidad del ADN extraído	21
Amplificación <i>in vitro</i> y secuenciación del gen mitocondrial <i>COI</i>	22
Detección de polimorfismos en las secuencias parciales del gen <i>COI</i> y análisis filogenéticos	23
<b>Resultados.....</b>	<b>27</b>
Mapas de distribución específicos	27
Colecta de ejemplares en la naturaleza	28
Extracción de ADN	31
Amplificación <i>in vitro</i>	31
Análisis de las secuencias parciales del gen <i>COI</i>	33
<b>Discusión.....</b>	<b>39</b>
<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>43</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>50</b>

## Resumen

Los Pulmonados constituyen un grupo muy numeroso de gasterópodos continentales. Dentro del orden Hygrophila se encuentra la familia Planorbidae, Rafinesque, 1815. Los planórbidos del género *Biomphalaria* incluyen especies que actúan como vectores de *Schistosoma mansoni*, el cual produce esquistosomiasis. Por lo tanto, los registros de *Biomphalaria* resultan particularmente importantes. La distribución del género en Uruguay abarca principalmente aquellas localidades fronterizas y sobre todo las vinculadas con las Cuencas del Río Uruguay, encontrándose tanto en ambientes lénticos como lóticos con flujos de velocidad bajos, de escasa profundidad y con macrófitas asociadas. Existen diferencias interespecíficas para este género de difícil discriminación con técnicas de taxonomía morfológica, lo que conduce a la necesidad de análisis moleculares para identificación de especies. Con el objetivo de caracterizar los linajes del género *Biomphalaria* transmisores de esquistosomiasis que hasta el momento no se habían llevado a cabo en nuestro país, se realizó un análisis filogenético en base a secuencias del gen mitocondrial *citocromo oxidasa I (COI)*. Los análisis incluyeron 12 individuos procedentes de cinco localidades del Departamento de Cerro Largo, así como secuencias homólogas obtenidas del GenBank. El fragmento de 637 pb obtenido presentó 559 sitios conservados, 75 sitios variables y 66 sitios filogenéticamente informativos. Los análisis filogenéticos muestran tres clados monofiléticos definidos con un soporte robusto para el género *Biomphalaria*: el clado de *B. tenagophila*, el de *B. straminea* (naturalmente hospedadoras intermedias de *S. mansoni*) y el clado de *B. peregrina*. Sin embargo el agrupamiento de ejemplares dentro de los mismos mostró particularidades puesto que para el caso de las *B. tenagophila* las separa de las *B. tenagophila guaibensis* lo que sugiere la validez de *B. tenagophila guaibensis* como una subespecie. Para el caso de las *B. peregrina* también mostró diferencias entre los ejemplares. En este sentido, no se descarta que por su semejanza morfológica parte de los ejemplares asignados a *B. peregrina* correspondan a *B. oligoza* dado su registro cercano a la zona de muestreo. Por otro lado, se caracterizaron los ambientes en los que *Biomphalaria* está presente. Estudios en este sentido son particularmente relevantes, ya que el control antrópico de los vectores de esquistosomiasis depende del conocimiento de los aspectos taxonómicos, además de las condiciones ecológicas y fisicoquímicas del ambiente acuático en el que viven, dado que estos factores pueden ser limitantes o favorecer la supervivencia de estos potenciales vectores.

## Introducción

Los gasterópodos pulmonados del orden Hygrophila se encuentran representados en Uruguay por cuatro familias: Chiliniidae Dall, 1870, Physidae Fitzinger, 1833, Lymnaeidae Rafinesque, 1815 y Planorbidae Rafinesque, 1815 (Scarabino, 2004). Habitan diversos ambientes de agua dulce y se caracterizan por poseer, en general, una concha cónica, discoidal o pateliforme, sin opérculo, con un par de tentáculos contráctiles y ojos situados en la base de los mismos (Souza & Lima, 1990). Pueden habitar ambientes lénticos y lóticos, preferentemente sitios de escasa o nula profundidad, estando estrechamente vinculados con la vegetación acuática, alimentándose así de plantas y detritos. Como todos los gasterópodos, constituyen un componente importante en las comunidades de los ecosistemas acuáticos. Debido a su rol en el procesamiento de materia orgánica y detritos, son considerados de interés tanto económico como sanitario (Landoni, 1992; Domínguez & Fernández, 2009). Presentan hábitos sedentarios y diferente resistencia a las variaciones ambientales, considerándose a estos organismos como buenos o excelentes indicadores de contaminación. Dentro de los moluscos dulceacuícolas, la familia Planorbidae incluye a las especies más resistentes a la contaminación (Naranjo, 2003).

En Uruguay, actualmente la familia Planorbidae está representada por los géneros *Biomphalaria*, *Drepanotrema* y *Antillorbis*, presentando un total de 11 especies (Scarabino, 2004).

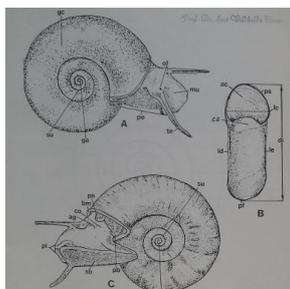
Adicionalmente, el estudio de planórbidos del género *Biomphalaria* resulta de gran importancia sanitaria ya que incluye especies que actúan como vectores (hospedadores intermediarios) de especies tales como el trematodo digeneo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), que produce esquistosomiasis (parasitosis humana) (Teles *et al.*, 1991).

### **El género *Biomphalaria***

La distribución geográfica del género *Biomphalaria* es muy amplia, con un total de 22 especies descritas en América y 12 especies que se distribuyen en África, Madagascar y Medio Oriente (DeJong *et al.*, 2001). Particularmente, en la región Neotropical, especies de *Biomphalaria* fueron descritas en países como Chile, Perú, Bolivia, Cuba, Paraguay, Argentina, Brasil y Uruguay (Olazarri, 1981; Teles & Vaz, 1987; Teles *et al.*, 1991; Vidigal, 2001; Borda & Rea, 1997, 2007; Da Silva, 2004; Núñez *et al.*, 2010; Tuan *et al.*, 2012). Análisis moleculares basados en genes mitocondriales y nucleares soportan la hipótesis de un origen americano y no africano como se sostuvo por mucho tiempo mostrando a *B. glabrata* como la especie hermana de todas las especies africanas del género *Biomphalaria* (Campbell *et al.*, 2000).

Las especies de *Biomphalaria* presentan una anatomía externa que se caracteriza por una concha planispiral, tentáculos filiformes y ojos situados en la base de los tentáculos (Figura 1). Son hermafroditas, capaces de reproducirse por autofecundación o por fertilización cruzada. Son ovíparas, producen un número variable de huevos que son envueltos por una masa gelatinosa. Luego de siete días empiezan a eclosionar y los juveniles presentan un aspecto similar al de los adultos pero de menor tamaño. Los individuos alcanzan la madurez a los 30 días aproximadamente por lo que un individuo puede producir en pocos meses una descendencia numerosa (Souza & Lima, 1990; Salinas, 2010). Tales características reproductivas le ofrecen a las poblaciones de *Biomphalaria* estrategias de supervivencia que les permiten recolonizar y colonizar nuevos ambientes, jugando un papel importante en la formación de poblaciones aisladas o semiaisladas (Campbell *et al.*, 2000; Salinas, 2010; Tuan *et al.*, 2012). Estos caracoles pueden encontrarse en una gran variedad de hábitats ya que presentan amplia tolerancia a variaciones fisicoquímicas y biológicas (Olazarri, 1981; Da Silva, 2004). La distribución del género incluye ambientes límnicos de aguas poco profundas, con baja velocidad (encontrados tanto en ambientes lénticos como lóticos) y con altos tenores de materia orgánica. Se alimentan principalmente de algas, aunque en general

ingieren todo lo que encuentran en el sustrato sin discriminación aparente entre lo orgánico e inorgánico, por lo que además son capaces de vivir saprofiticamente (Olazarri, 1981; Salinas, 2010). Estas características particulares confieren plasticidad a las poblaciones de este género, sin embargo los factores climáticos como las precipitaciones y la temperatura determinan fluctuaciones importantes en sus poblaciones debido a la muerte de numerosos individuos.



**Figura 1.** Anatomía externa del género *Biomphalaria*, tomado de Souza & Lima, 1990

### **Relevancia epidemiológica del género *Biomphalaria***

Tal como fue mencionado anteriormente, algunas especies del género *Biomphalaria* actúan como vectores del trematodo digeneo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), el cual causa esquistosomiasis. Originalmente la enfermedad parasitaria fue registrada en África, e introducida con el comercio de esclavos a comienzos de siglo XVII en América del Sur (Da Silva, 2004). Desde su introducción por el sector caribeño de América del Sur, se ha dispersado hacia el Sur por el Este y Noreste de Brasil. La abolición de la esclavitud facilitó la movilidad de la endemia debido a las migraciones, generando que en los inicios del siglo XX las condiciones epidemiológicas para el establecimiento y mantenimiento de la enfermedad estuvieran dadas (Da Silva, 2004).

En países pobres y subdesarrollados esta enfermedad genera grandes problemas de salud pública e implica importantes impactos socio-económicos. Actualmente se ha registrado en 76 países principalmente del continente Africano, países del medio oriente, Venezuela, Surinam, Puerto Rico, República Dominicana, varias islas de las Antillas menores y Brasil que es considerado el país con mayores focos endémicos del parásito (Da Silva, 2004; Salomón & Rumi, 2013). Tal distribución se entiende en relación a las condiciones sanitarias en las que viven estas poblaciones.

Según la ONU, la degradación ambiental en aguas superficiales, el aumento del flujo migratorio y las condiciones básicas de saneamiento contribuyen al aumento de casos de la enfermedad en áreas donde es considerada endémica. El comportamiento humano es uno de los principales componentes en el riesgo de contaminación. El mal manejo del recurso agua aumenta la probabilidad de transmisión de los parásitos, afectando como fue mencionado principalmente a las poblaciones más pobres. A su vez, otro factor importante en la propagación de focos de infección se da a partir de la movilidad de individuos afectados. Cabe resaltar que el área de distribución de *S. mansoni* puede extenderse aún más para lo que la acción del hombre es clave. La construcción de represas, así como la explotación de nuevas áreas de agricultura por proyectos de irrigación, modifican los ambientes causando condiciones favorables para estos moluscos hospederos del parásito (Salomón & Rumi, 2013).

Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, presentan un clima y condiciones socio-económicas favorables para la transmisión de la esquistosomiasis. Estas incluyen migraciones sin control sanitario en las fronteras y una deficiente infraestructura sanitaria y de saneamiento que contribuyen a un entorno global de potencial transmisión (Borda & Rea, 1997). En Argentina, las áreas de mayor riesgo de generación de focos endémicos se encuentran en el Noreste relacionados con los ríos más importantes de la Cuenca del Plata (Núñez et al., 2010; Salomón & Rumi, 2013), mientras que en Brasil se encuentran cerca de las fronteras con Uruguay y Argentina (Martorelli et al., 2013).

Algunas especies de *Biomphalaria* son naturales hospedadoras intermediarias de *S. mansoni* tales como *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848) y *B. peregrina*; estas tres últimas registradas en Uruguay (Scarabino, 2004). Los estudios realizados in vitro por Borda & Rea (1997, 2007) han probado la existencia de linajes de *Biomphalaria* susceptibles a la infección de *S. mansoni* en Argentina y Uruguay. Sin embargo dichos autores han determinado a su vez que dentro de estas especies no todos los linajes son susceptibles a la infección de *S. mansoni*. Esto resulta particularmente relevante, ya que el control antrópico de los vectores de esquistosomiasis depende del conocimiento de los aspectos taxonómicos, además de las condiciones ecológicas y fisicoquímicas del ambiente acuático en el que viven, dado que estos factores pueden ser limitantes o favorecer su supervivencia.

#### **Modo de transmisión de la Esquistosomiasis mansonica**

El ciclo de vida del parásito *S. mansoni* alterna entre reproducción sexual (dentro de los vasos sanguíneos de los animales infectados) y la multiplicación asexual en los caracoles. Los parásitos adultos residen en las venas intestinales o vesicales del hospedero definitivo donde inician su reproducción sexual. Pueden oficiar como hospederos definitivos el hombre y otros mamíferos como roedores, marsupiales, bovinos y primates. Los huevos son depositados por éstos a través de las heces; en el agua eclosionan los miracidios que al ser ciliados y móviles nadan y penetran a los moluscos (hospederos intermediarios) a través de su parte blanda externa. Dentro del molusco se produce la reproducción asexual dando origen a las cercarías (con cola bifurcada) las cuales salen del cuerpo del molusco dispersándose en el agua. En contacto con un hospedero definitivo, penetran su piel perdiendo la cola y reanudándose el ciclo (Figura 2) (Souza & Lima, 1990; Da Silva, 2004; Jardon *et al.*, 2006).

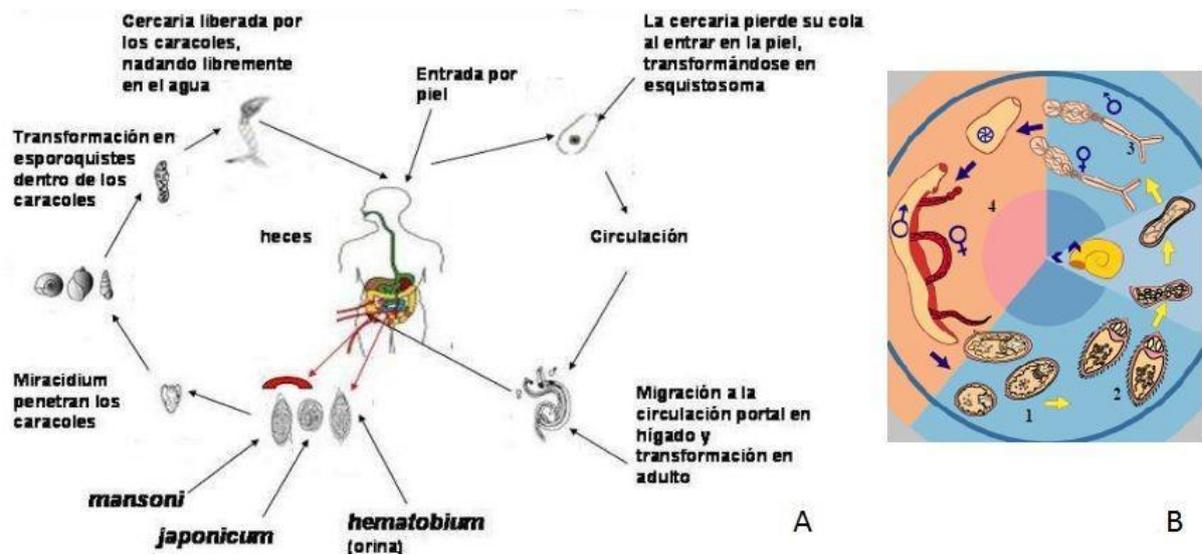


Figura 2: Esquemas del ciclo de vida de *Schistosoma* spp. A. Ciclo de vida de Schistosomiasis., tomado de Jardon *et al.*, 2006 B. Ciclo de vida de *S. mansoni*, tomado de Da Silva., 2004.

Teniendo en cuenta que no sólo el hombre, sino otros mamíferos son hospederos definitivos del parásito, los ambientes que propicien la presencia de linajes susceptibles de *Biomphalaria* con heces presentando huevos viables constituye un gran foco potencial de infección (Salomón & Rumi, 2013).

### ADN mitocondrial como herramienta en análisis filogeográficos

La mayor parte de los estudios taxonómicos en *Biomphalaria* se han basado en el análisis de características anatómicas y/o conquiológicas que permiten la clasificación de los organismos dando cuenta de la relación entre la forma y la evolución. Actualmente, la

utilización de técnicas de biología molecular ha permitido una identificación más precisa y rápida de especies dentro del género *Biomphalaria*. En este contexto, varios estudios dan cuenta de la utilización de estas técnicas que no sólo permiten caracterizar las especies, sino también inferir posibles orígenes (Campbell *et al.*, 2000; Vidigal *et al.*, 2001; DeJong *et al.*, 2001). Existen diferencias interespecíficas para este género de difícil discriminación con técnicas de taxonomía morfológica, ya sea por la similitud entre las especies, por el tamaño de los caracoles, o por la complejidad de ciertas estructuras de diagnóstico. Esto ocasiona identificaciones erróneas y a la promoción de alertas sanitarias innecesarias en relación a las especies que son potencialmente transmisoras de esquistosomiasis (Vidigal, *et al.*, 2001; Tuan *et al.*, 2012).

La implicancia de esfuerzos económicos, políticos y sociales basados en una caracterización errada; establece un escenario más fuerte en relación a la importancia de estudios moleculares en la identificación de especies de este género. Es así que la utilización de técnicas moleculares comienza a tener un mayor desarrollo auxiliar a esta problemática y habilita así a superar las mencionadas dificultades de clasificación, conduciendo a una mejor atención sanitaria en relación a estas cuestiones. En este contexto, el análisis de marcadores moleculares es considerado una herramienta ventajosa para establecer hipótesis de relaciones filogenéticas entre organismos, transformándose en un análisis complementario a los datos morfológicos.

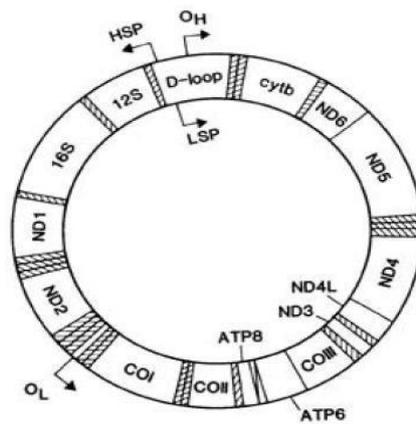
Es de esta forma que la biología molecular abarca un aspecto de la filogeografía, campo que conforma el análisis de la distribución de linajes en relación a patrones y procesos históricos, ecológicos y evolutivos que determinan su distribución geográfica. Se considera así a la filogeografía como una subdisciplina de la biogeografía, articulando conceptos de genética molecular, genética de poblaciones, sistemática filogenética, demografía, etología y paleontología (Avice, 2001). Desde la filogeografía es posible encontrar puntos de unión entre la sistemática y la genética de poblaciones. A partir de las genealogías genéticas es posible analizar la evolución de las poblaciones, realizar inferencias

o hipótesis sobre posibles orígenes y eventos de dispersión así como las posibles causas ecológicas al comparar patrones filogeográficos de varias poblaciones. Comprende estudios filogenéticos de la distribución espacial de cualquier característica como pueden ser las morfológicas (Lanteri & Confalonieri, 2003).

Los marcadores moleculares ocupan un lugar relevante en el estudio de la variabilidad genética. Representan regiones o marcas del genoma, ya que se encuentran cercanos a genes de interés, que identifican genes implicados en la expresión de un conjunto de caracteres, así como los polimorfismos que causan la variación genética (Alcántara, 2007). Pueden ser utilizados para evidenciar polimorfismos en las secuencias de ADN entre individuos, detectados en la variación de un nucleótido. Es así que los marcadores moleculares presentan características particulares que les otorgan un lugar relevante en los estudios de genética evolutiva, tales como su rápida identificación y análisis, su posible detección en estadíos tempranos del desarrollo, su herencia mendeliana no epistática y el ser altamente polimórficos o variables dentro o entre especies. Por su parte, el uso particular de secuencias de ADN nuclear como marcador molecular conduce a desviar las genealogías debido a los eventos de recombinación durante el apareamiento de los cromosomas homólogos en la meiosis (Lanteri & Confalonieri, 2003). De esta forma, la mayoría de los estudios en filogeografía utilizan marcadores moleculares de herencia citoplasmática no mendeliana, asegurándose que las secuencias de ADN no sufran eventos de recombinación. En este contexto y a partir del conocimiento de la molécula de ADN mitocondrial (ADNmt) hacia mediados de la década de 1970 y principios de 1980, las técnicas más utilizadas en filogeografía incluyen el ADNmt como marcador molecular (Avisé, 2001; Vázquez *et al.*, 2009).

El ADNmt animal es una molécula circular covalente cerrada, con un tamaño de 16-20 kilobases. Presenta una alta tasa de mutación debido a sus escasos mecanismos de reparación y la carencia de histonas asociadas, así como recombinación prácticamente nula. Su herencia es principalmente materna, lo cual hace que se comporte como un único locus.

El ADN doble hebra presenta una cadena L (liviana) y otra H (pesada) que posee la mayoría de las secuencias codificantes. Presenta 13 genes estructurales que codifican para diferentes subunidades de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial (tres subunidades de la citocromo c oxidasa (*COI*, *COII* y *COIII*) (complejo IV), una subunidad de la citocromo b oxidasa (*cyt b*) (complejo III), siete subunidades del complejo NADH (*ND-1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *6* y *7*) (complejo I) y dos subunidades del complejo ATP sintetasa (*6* y *8*) (complejo V)) (Figura 3) (Domínguez, 2006). El gen mitocondrial *COI* es considerado el más apropiado para establecer diferencias dentro de una especie y entre especies relacionadas en este grupo (Hebert, 2003).



**Figura 3.** Esquema de organización genómica del ADNmt: Se detallan: los 13 genes estructurales, OH: origen de replicación de la cadena H, OL: origen de replicación de la cadena L, HSP y LSP: promotores de las cadenas H y L respectivamente, ARNs ribosomales (16 S, 12 S), tomado de Domínguez 2006.

La alta tasa de mutación del ADNmt produce que en una misma célula puede haber distintos tipos de ADNmt (heteroplasmia), los cuales serán transmitidos en la descendencia hasta que alcancen un estado homoplásico a nivel individual y se fijen en la población. Puesto que el ADNmt sigue un modelo de evolución neutral, la fijación se produce

aleatoriamente por deriva genética y el polimorfismo es el estado intermedio previo a la fijación en una población (Domínguez, 2006). En este sentido, los análisis de ADNmt proporcionan una herramienta robusta para realizar inferencias acerca de los posibles procesos ecológicos y evolutivos que se verían reflejados en análisis filogeográficos.

El género *Biomphalaria* presenta diferencias interespecíficas de difícil identificación por técnicas de taxonomía morfológica, lo cual sugiere la urgente necesidad de estudios moleculares que hasta el momento no se habían realizado para este género en nuestro país. Caracterizar de esta forma los linajes de *Biomphalaria*, particularmente en regiones limítrofes del país que tienen gran influencia de cuencas desde Brasil, como el caso del Departamento de Cerro Largo, así como la distribución del género en todo el territorio proporciona un escenario inicial para desarrollar estrategias que permitan un buen manejo de estos potenciales vectores, evitando o controlando así la presencia de esquistosomiasis en Uruguay. Por lo tanto, se plantea la siguiente Hipótesis y objetivos generales y específicos del presente trabajo.

### **Hipótesis**

Existen diferentes linajes de *Biomphalaria* potencialmente transmisores de esquistosomiasis en Uruguay.

## Objetivos

### **Objetivo general**

Analizar los patrones de distribución y variabilidad genética de los linajes del género *Biomphalaria* transmisores de esquistosomiasis presentes en Uruguay.

### **Objetivos específicos**

1. Construir mapas de distribución específicos para el género *Biomphalaria* en Uruguay.
2. Caracterizar los ambientes y comunidades en las localidades donde está presente *Biomphalaria*.
3. Caracterizar mediante análisis filogenéticos del gen mitocondrial *citocromo oxidasa I* (*COI*) los linajes de *Biomphalaria* presentes en cinco localidades del Departamento de Cerro Largo.

## **Materiales y métodos**

### **1. Revisión de colecciones y mapas de distribución específicos**

Se realizó una revisión de las dos colecciones de *Biomphalaria* existentes en el Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (MNHN): la colección de José Olazarri y la colección del MNHN. Se identificó cada especie de cada lote mediante las características morfológicas mencionadas anteriormente. A su vez se construyó una base de datos que permitió reunir dicha información georreferenciado cada lote mediante la utilización de la herramienta Google Earth.

Una vez construida la base de datos, ésta se ingresó como matriz en el programa QGIS-Essen 2.14 (QGIS Development Team, 2016) para realizar diferentes mapas de distribución del género *Biomphalaria* en todo el País a lo largo de los años.

### **2. Obtención de las muestras y área de estudio**

Las localidades muestreadas representan ambientes de dos de las principales cuencas del Uruguay: la Cuenca de la Laguna Merín y la Cuenca del Río Negro, respectivamente (Tabla 1, Figura 4). Se colectaron individuos del género *Biomphalaria* en dos localidades del Departamento de Cerro Largo: Fraile Muerto y Melo (Figura 5, Figura 6). En cada una de ellas se realizó un relevamiento de algunos parámetros que caracterizan el ambiente (Tabla 2).

La colecta de los ejemplares se realizó con redes de mano con las que se raspó el fondo y las plantas sumergidas como fue propuesto por Souza & Lima (1990) y se tuvo en

cuenta tiempo y el esfuerzo de muestreo. Los individuos colectados fueron rotulados y conservados en etanol (EtOH) 95% en el lugar.

Para este estudio se incluyeron además individuos de la localidad de Paso del Centurión, que fueron obtenidos y analizados en el marco del curso de Educación Permanente de la UdelaR: “Biodiversidad y Recursos Zoogenéticos”, dictado en octubre del 2015 en la Ciudad de Melo. Los resultados de dicho trabajo son utilizados posteriormente en este estudio.

También se analizaron individuos de *Biomphalaria* de las localidades de Itacuruzú y Los Mimbres, que fueron donados por la Prof. Olivia Lluch (Tabla 1, Figura 7, Figura 8).

Posteriormente en el laboratorio, las muestras de las distintas localidades fueron analizadas: se contabilizaron los individuos y se clasificaron en relación a las características morfológicas descritas por Souza & Lima (1990), para luego ser utilizados en posteriores análisis. En este sentido fueron clasificadas como *B.tenagophila* aquellos individuos que en su anatomía externa se evidenciaba su conchilla con un giro central hacia la izquierda y fundamentalmente un lado izquierdo más cóncavo que el derecho. Por otra parte se clasificaron como *B.peregrina* aquellos individuos con una conchilla con giro central hacia la derecha y el lado derecho aplanado.

**Tabla 1.** Localidades de muestreo en el Departamento de Cerro Largo, número de ejemplares colectados en cada una y coordenadas geográficas.

<i>Localidad</i>	<i>Nº de ejemplares colectados</i>	<i>Coordenadas</i>
FRAILE MUERTO	6	32° 31'11.5" S, 54° 31'42.4" W
MELO	2	32° 22'04.5" S, 54° 11' 22.9" W
ITACURUZÚ	5	32° 04' 9.06" S, 54° 09' 32.30" W
PASO DEL CENTURIÓN	6	32° 13' 26.16" S, 53° 73' 41. 06" W
LOS MIEMBRES	3	32° 07'30.41" S, 54° 09' 16.69" W



**Figura 4.** Mapa de distribución de las zonas de muestreo en el Departamento de Cerro Largo, Uruguay, los puntos en verde corresponden a las localidades muestreadas.



**Figura 5.** Fotografía tomada en el sitio de colecta de la localidad de Melo. **A.** Se muestra el cuerpo de agua de tipo bañado. **B y B'.** Se muestran las macrófitas asociadas.



**Figura 6.** Fotografía tomada en el sitio de colecta de la localidad de Fraile Muerto. **A.** Se muestra el cuerpo de agua de tipo arroyo (ambiente A), **A'**. Se muestran sus macrófitas asociadas, **B.** Se muestran el cuerpo de agua de tipo cañada (ambiente B).



**Figura 7.** Fotografía tomada en el sitio de colecta de la localidad de Itacuruzú, se muestra el cuerpo de agua y la vegetación asociada.



**Figura 8.** Fotografía tomada en el sitio de colecta de la localidad de Los Mimbres, se muestra el cuerpo de agua y la vegetación asociada.

### **3. Extracción de ADN sin fenol-cloroformo**

La extracción de ADN genómico total se realizó a partir del pie de cada individuo colectado, conservado en EtOH 95 %. Se utilizó el protocolo de Medrano *et al.* (1990) con modificaciones. La composición de todos los buffers y soluciones empleadas se detallan en el Anexo 1. El protocolo consistió en dos lavados consecutivos del tejido 1,0 mL de buffer STE 1X (pH 8 frío). Posteriormente se procedió a retirar el buffer 1X STE y a la homogeneización mecánica del tejido. A continuación se agregaron 550 µL de buffer de lisis (pH 8), y 11,0 µL de Proteinasa K (10 mg/mL), y se dejó incubando en una estufa toda la noche a 55 °C. Finalizada la incubación se agregaron 6,0 µL de RNAsa A (10 mg/mL) y las muestras se dejaron dos horas más a 55 °C. Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugaron 10 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente y se transfirieron 550 µL del sobrenadante a otro tubo. Se agregaron 350 µL de NaCl 5M y se realizó otra centrifugación de 30 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente. Luego se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y el ADN se precipitó con el doble del volumen de EtOH absoluto durante 72 horas a 4°C. Con el fin de obtener el ADN precipitado se realizó una centrifugación de 30 minutos a 12000 rpm y se lavó el pellet dos veces con 1 mL de EtOH 70%, con una centrifugación de 5 minutos a 6000 rpm entre cada lavado.

Por último el pellet conteniendo el ADN se secó en estufa a 55 °C hasta la evaporación completa del EtOH 70%, se lo resuspendió en 50 µL de buffer 1X TE (pH 8), se sometió a un baño a 65 °C durante 20 minutos y los tubos se guardaron a – 20 °C.

### **4. Calidad del ADN extraído**

La calidad y concentración del ADN extraído fue analizada y estimada mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% con Buffer TAE 1X y teñido con bromuro

de etidio (5  $\mu$ L/100 mL buffer). En cada pocillo se sembraron 2  $\mu$ L de buffer de corrida con 5  $\mu$ L del ADN extraído de cada muestra. Se agregó una línea con 3  $\mu$ L de marcador de peso molecular (1 Kb PLUS DNA ladder, Invitrogen). La corrida electroforética se realizó durante 40 minutos a 80 V y los ADN extraídos se visualizaron en un transiluminador de luz UV (MultiDoc-It 125 Digital Imaging System). La composición de los buffers empleados se detalla en el Anexo 2.

### **5. Amplificación *in vitro* y secuenciación del gen mitocondrial COI**

La amplificación *in vitro* del gen mitocondrial COI se realizó mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los oligonucleótidos específicos LCO 1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994), que amplifican un fragmento de 700 pb aproximadamente. Las condiciones de la reacción ya fueron puestas a punto previamente en el laboratorio de Genética Evolutiva de Modelos Animales (GEMA) de la Sección Genética Evolutiva (Facultad de Ciencias, UdelaR).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un Termociclador automático (PTC-100, MJ Research, Inc). Se utilizó 1  $\mu$ L del ADN genómico total extraído como molde y 9  $\mu$ L de una mezcla de reacción (o MIX) compuesta por 1X buffer (Invitrogen), 1,5 mM de Mg<sub>2</sub>Cl (50 mM), 0,2 mM de cada uno de los dNTPs (10 mM), 0,5  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos (10  $\mu$ M) y 0.5 U de Taq (5U/  $\mu$ L) (Invitrogen).

El ciclado utilizado en la PCR fue: un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, pegado de los oligonucleótidos a 45°C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 2 minutos y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

La calidad y concentración de los productos amplificados fueron estimadas mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa 1% como se describió anteriormente.

Una vez verificada la amplificación del gen *COI* se procedió a una reamplificación para obtener una mayor concentración del producto amplificado.

De igual forma, la concentración de los productos reamplificados fue verificada y analizada mediante una corrida electroforética en un gel de agarosa al 1% según se describió previamente.

Los productos amplificados fueron enviados a purificar y secuenciar a la empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea).

#### **6. Detección de polimorfismos en las secuencias parciales del gen *COI* y análisis filogenéticos**

Las secuencias parciales del gen *COI* obtenidas se editaron utilizando el programa FinchTV versión 14.0 (Geospiza, Inc). Luego se ingresaron en el programa MEGA versión 7.0 (Kumar *et al.*, 2016) y se alinearon mediante el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). A partir del alineamiento múltiple de las secuencias se determinaron el número de sitios variables y filogenéticamente informativos con motivo de evaluar los niveles de variabilidad genética.

Para los análisis filogenéticos se obtuvieron del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.gov/genbank>) secuencias homólogas aisladas de diferentes especies de *Biomphalaria*: *B.tengophila* (N° de acceso: KF926194.1- KF926197.1- KX354448.1- KX354447.1, KX354446.1), *B.straminea* (N° de acceso: KF926195.1- KF926187.1-

KF926191.1), *B.peregrina* (N° de acceso: GU168593.1- JN621901.1- GU168093.1 KX354446.1). Como grupos externos se incluyeron secuencias pertenecientes a la familia *Ferrissia fragilis* (N° de acceso: HQ732256.1- HQ732257.1- HQ732255.1). Se determinó el número de haplotipos mediante el programa DNAsp v.5.0 (Librado y Rozas, 2009).

Con el fin de caracterizar los linajes de *Biomphalaria* presentes en el departamento de Cerro Largo se realizaron diferentes análisis filogenéticos basados en distancias moleculares (Unión de vecinos (o “Neighbor Joining” (NJ)) (Saitou y Nei, 1987)) y en caracteres (Máxima Parsimonia (MP) (Henning, 1966) y Máxima Verosimilitud (MV) (Cavalli y Sforza, 1967).

El método de NJ es una versión simplificada del método de “Evolución mínima” (ME) (Rzhetsky y Nei, 1993) el cual no se basa en la suposición de una tasa de evolución constante y por lo tanto requiere de un grupo externo para encontrar la raíz del árbol (Nei y Kumar, 2000). Es un método de descomposición de estrella, que supone la construcción de un árbol con todos los taxones y la evaluación de los posibles árboles resultantes a partir de la unión de dos nodos terminales en un nuevo grupo. Las distancias evolutivas se calcularon usando el modelo Kimura 2-parámetros, el cual estima la tasa evolutiva de sustituciones de bases (transiciones y transversiones) a través de estudios comparativos de las secuencias de nucleótidos (Rzhetsky y Nei, 1993).

El método de máxima parsimonia (MP) utiliza un criterio de decisión por el cual las especies son agrupadas en la filogenia seleccionando aquel árbol que minimice el número de pasos evolutivos para explicar un conjunto de datos. Su aplicación resulta útil cuando se trabaja con un número reducido de taxones (Morrone, 2000). Utiliza el estado del carácter como fuente de información y asume que cualquier carácter heredable es una homología potencial (Peña, 2011). La dispersión del modelo se mide por lo tanto en número de pasos o eventos de cambio. Los datos se recogen en una matriz formada por las secuencias de ADN previamente alineadas, compuesta por los estados de los cuatro nucleótidos (A, G, T, C). En

la matriz se asigna uno o varios caracteres a cada taxón. El criterio de parsimonia permite el examen lógico de la congruencia entre cada columna de la matriz de datos; la interacción lógica de varias similitudes particulares (columnas de la matriz) congruentes entre sí, selecciona el conjunto de hipótesis de homologías putativas y distingue las similitudes homoplásicas. El número de pasos se obtiene contabilizando el número total de cambios (homologías y homoplasias), según el orden de estados especificados por un modelo. Por ejemplo, el modelo de Fitch considera como un paso al cambio de estado de un carácter (De Luna *et al.*, 2005). Todos los modelos aplicados implican que la topología resultante será aquella que implique el menor número de pasos (criterio de parsimonia). El árbol más parsimonioso se obtuvo utilizando el algoritmo *Subtree-Pruning-Regrafting* (SPR) (Nei & Kumar, 2000).

El método de Máxima Verosimilitud (MV) es un método estadístico basado en modelos de evolución molecular. Se basa en la optimización de una función de verosimilitud obtenida a partir del árbol bajo el establecimiento de un modelo de evaluación y unas premisas o hipótesis simplificadoras. Utiliza todos los datos, el estado del carácter y la distancia, y encuentra el árbol que con mayor probabilidad haya dado origen a los datos observados. Necesita calcular cada árbol posible que puede ser derivado de los datos según el modelo de evolución seleccionado. Calcula la probabilidad de obtener los datos (D, la matriz) dada una determinada hipótesis (H, el árbol y el modelo de sustitución) ( $P(D/H)$ ), evalúa así la verosimilitud L (probabilidad relativa) del árbol y busca maximizarla (la verosimilitud L del árbol es directamente proporcional a  $P(D/H)$ ). Comienza con una topología obtenida por un método rápido NJ o MP, sobre la cual se ajustan los valores de los parámetros del modelo. Se emplea algún método de reajuste de topología y se ajustan las longitudes de rama cerrando el ciclo. En múltiples ciclos consecutivos se va optimizando la topología y la longitud de rama hasta que convergen en la estima de máxima verosimilitud global.

Dado que el método supone que la tasa de sustitución varía de una rama a la otra, la probabilidad (considerando todos los sitios de nucleótidos para todas las secuencias)

supone el producto de las probabilidades para todos los sitios (Nei & Kumar, 2000). Así la probabilidad de registro de todo el árbol deviene en:

$$\ln L = \sum_{k=1}^n \ln L_k$$

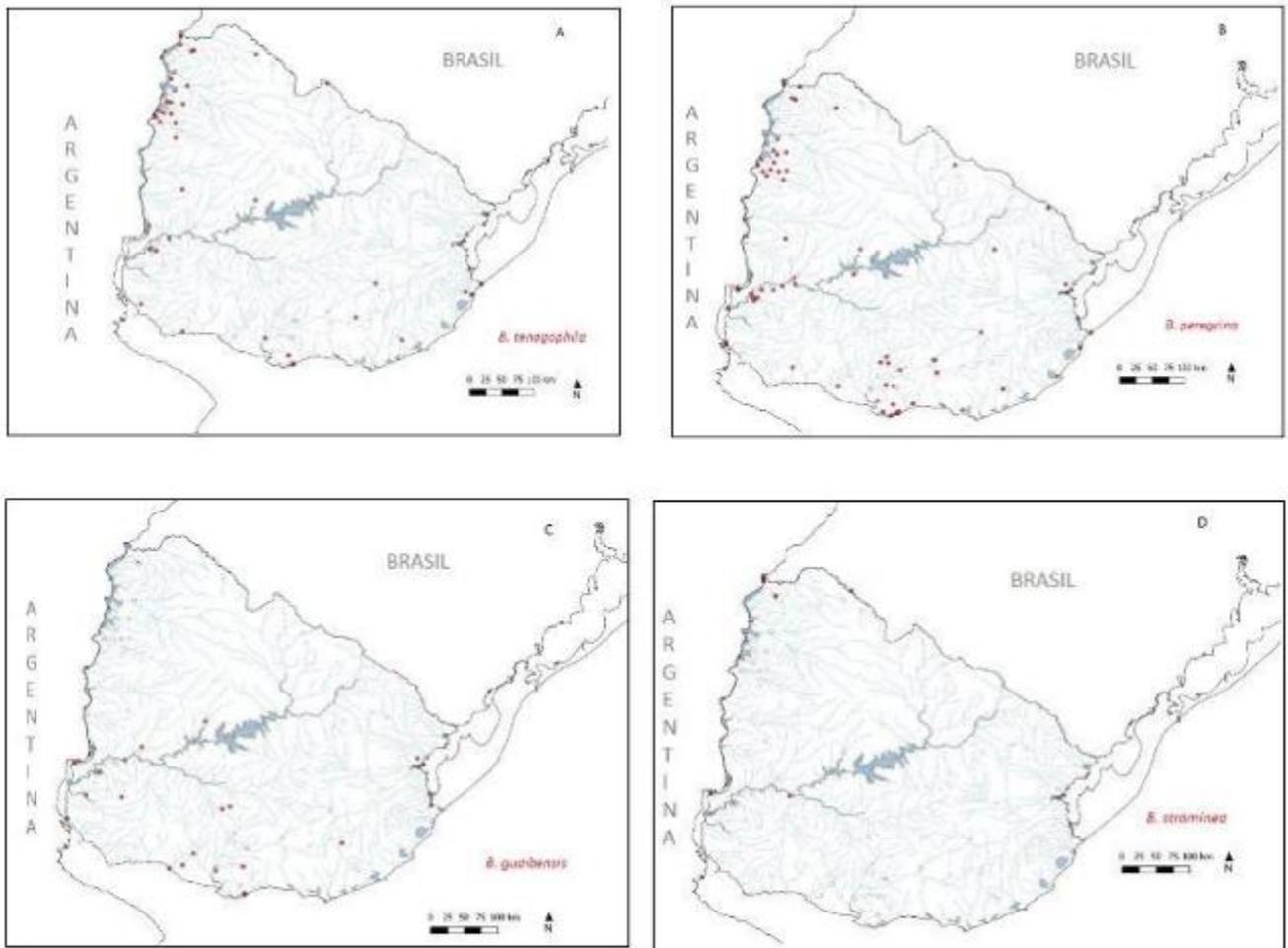
El modelo de evolución molecular utilizado fue el de Kimura 2-parámetros. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando el algoritmo de NJ a una matriz de distancia pareada calculada usando el método de *Maximum Composite Likelihood* (MCL) y seleccionando la topología con probabilidad mayor.

Los diferentes análisis filogenéticos fueron realizados en el programa MEGA versión 7.0 (Kumar *et al.*, 2016); el soporte de los nodos se obtuvo a través de 1000 pseudoréplicas del test Bootstrap (Felsenstein, 1985) considerándose como válidos los valores mayores al 70% y fueron usadas como grupo externo las cuatro secuencias del género *F.fragilis* (Tryon, 1863).

## Resultados

### 1. Mapas de distribución específicos

A partir de las colecciones de *Biomphalaria* del MNHN, se generó una base de datos específica georeferenciando cada lote (Anexo 3). A partir de la misma se construyeron mapas de distribución específicos para todo el País (Figura 9, A-D). Los mismos permitirán evidenciar la ocurrencia de distintas especies en diferentes zonas del territorio Uruguayo. En la figura 9, se muestra la distribución del género *Biomphalaria* en el territorio nacional. *A priori*, se evidencia una mayor representación de especies hacia la región Norte del país y alrededores de la región metropolitana. *Biomphalaria tenagophila* mostró una distribución a lo largo de todo el territorio, abarcando fundamentalmente regiones del noreste, si bien muestra distribución hacia el sur (Figura 9A). *Biomphalaria peregrina* presentó una distribución semejante a la especie anterior y abarcó mayores muestreos hacia el centro del País próximo a localidades vinculadas con la cuenca del Río Negro (Figura 9B). Para el caso de la especie *B.guaibensis* se observó una distribución exclusiva hacia el centro y sur del país (Figura 9C), mientras que *B.straminea* es la especie con menor representación, abarcando únicamente localidades del norte y centro del País (Figura 9D).



**Figura 9.** Distribución de las diferentes especies del género *Biomphalaria* en Uruguay. **A.** *B. tenagophila*. **B.** *B. peregrina*. **C.** *B. guibensis*. **D.** *B. straminea*. En cada figura, los puntos rojos indican los sitios de colecta de las diferentes especies.

## **2. Colecta de ejemplares en la naturaleza**

Se colectaron seis individuos en la localidad de Fraile Muerto, dos de los cuales fueron identificados como *B. peregrina* y los otros cuatro como *B. tenagophila*. En la localidad de Melo, se colectaron dos individuos, ambos identificados como *B. peregrina*.

Se observó para la localidad de Melo, el ambiente de colecta fue un bañado dentro del Bioparque de Melo (Figura 3B). En el mismo se identificaron a las macrófitas *Azolla* y *Salvinia sp.* e individuos pertenecientes a los géneros *Pomacea*, *Heleobia*, *Corbicula*,

*Hebetancylus* y *Drepanotrema*. Las especies del género *Biomphalaria* colectados en dicho ambiente fueron identificadas como *B. peregrina* (Tabla 3).

Para el caso de la localidad de Fraile Muerto se observó un ambiente A (arroyo) (Figura 6A) presentando el curso de agua una velocidad unidireccional baja, un suelo de carácter rocoso y limoso en algunos sectores, y un ambiente B (cañada) (Figura 6B) con un curso de agua intermitente y suelo limoso. Ambos ambientes presentaron una profundidad menor a 0,50 m. Los individuos del arroyo se encontraban junto con las macrófitas *Eichhornia azurea*, *Echinodorus* sp., *Schoenoplectus californicus* e *Hydrocotyle* así como con individuos del género *Pomacea*, *Heleobia*, *Corbicula* y *Hebetancylus* (Tabla 2). Para el caso del ambiente B se caracterizaron especies de *Eichhornia azrrura* e *Hydrocotile*, mientras que los organismos asociados encontrados fueron *Pomacea* y *Drepanotrema*. En ambos ambientes de la localidad de Fraile Muerto se encontraron especies que se identificaron como *B.peregrina*, mientras que *B.tenagophila* solo fue encontrada en el arroyo (Tabla 2).

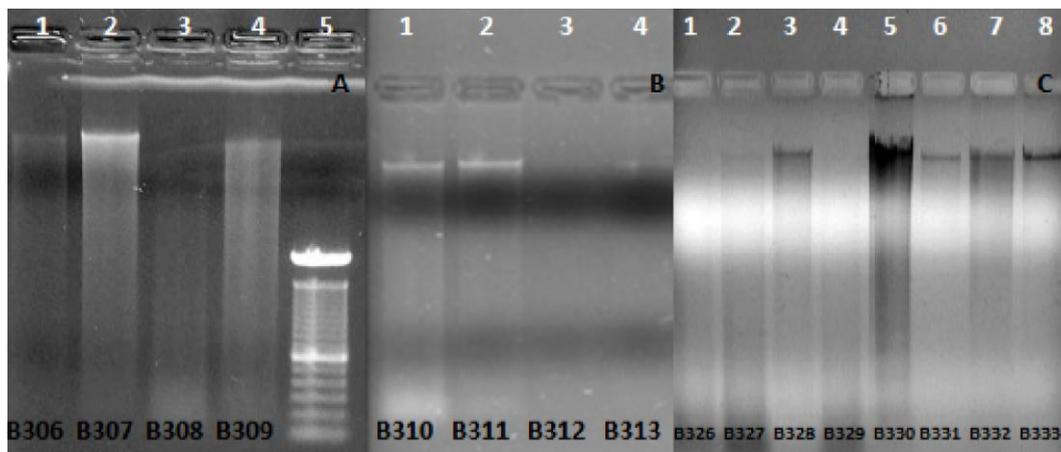
**Tabla 2.** Localidades muestreadas, coordenadas geográficas y parámetros ambientales.

Localidad	FRAILE MUERTO Ambiente A	FRAILE MUERTO Ambiente B	MELO
Coordenadas	32° 31' 11.5" S 54° 31' 42.4" W	32° 31' 15,8" S 54° 31' 33,1" W	32° 22' 04.5" S 54° 11' 22.9" W
Hora/ Tiempo de esfuerzo de muestreo	13: 00 hs 25 minutos de muestreo/ 3 personas	13:40 hs 40 minutos de muestreo 2 personas	16:00 hs 40 minutos de muestreo 3 personas
Tipo de sistema	Arroyo (Velocidad unidireccional baja)	Cañada frente al arroyo	Bañado
Sustrato	Roca y Limo	Limo	Limo
Profundidad	< 0.50 m	< 0.50 m	< 0.30
Vegetación asociada	- <i>Eichornia azurea</i> - <i>Echinodorus sp</i> - <i>Schoenoplectus californicus</i> - <i>Hydrocotyle</i>	- <i>Eichornia azurea</i> - <i>Hydrocotyle</i>	- <i>Azolla</i> - <i>Salvinia sp</i> - <i>Poacia indet.</i>
Organismos asociados	- <i>Pomacea</i> - <i>Heleobia</i> - <i>Corbicula</i> - <i>Hebetancylus</i>	- <i>Pomacea</i> - <i>Drepanotrema</i>	- <i>Pomacea</i> - <i>Heleobia</i> - <i>Corbicula</i> - <i>Hebetancylus</i> - <i>Drepanotrema</i>
Especies de <i>Biomphalaria</i> colectadas	<i>Biomphalaria tenagophila</i> <i>Biomphalaria peregrina</i>	<i>Biomphalaria peregrina</i>	<i>Biomphalaria peregrina</i>
Observaciones	Próximo al Puente y a la Usina de OSE	Curso intermitente	Bioparque

En relación a los individuos donados para este estudio, de los cinco provenientes de la localidad de Itacuruzú (Figura 7), cuatro fueron identificados como *B. tenagophila* y uno como *B.peregrina*, mientras que los ejemplares colectados en la localidad de Los Mimbres (Figura 8) fueron todos identificados como *B. peregrina*.

### **3. Extracción de ADN**

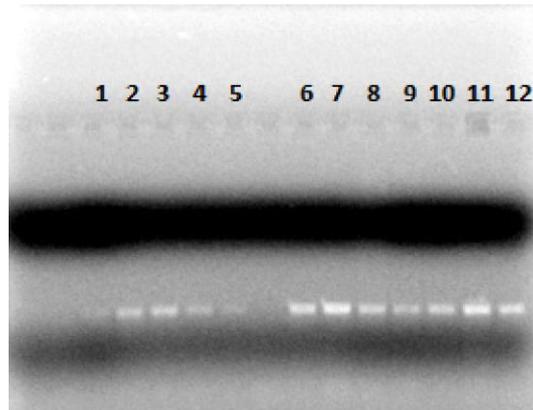
Se realizó la extracción de ADN genómico total a 16 muestras de *Biomphalaria* colectadas en diferentes localidades del Departamento de Cerro Largo (Figura 10). Como se observa en la figura solamente se obtuvo una buena concentración para 12 individuos.



**Figura 10.** Extracción de ADN genómico total. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio. **A.** Pocillos 1-4: Localidad de Fraile Muerto. Pocillo 5: Marcador de peso molecular (1 Kb PLUS DNA ladder, Invitrogen). **B.** Pocillos 1-2 Localidad de Fraile Muerto, Pocillo 3 - 4: Localidad de Melo. **C.** Pocillos 1-5: Localidad de Itacuruzú, Pocillos 6-8: Localidad de Los Mimbres.

### **4. Amplificación in vitro**

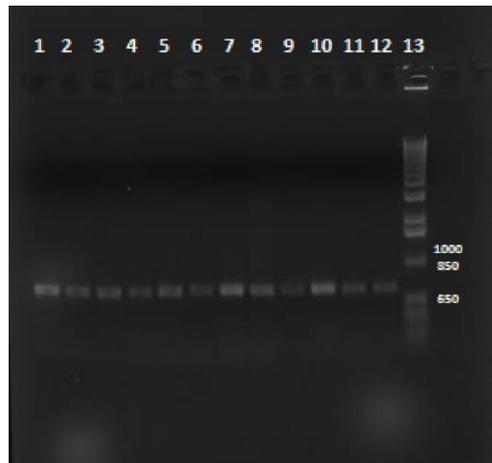
Se amplificaron aproximadamente 700 pb del gen mitocondrial *COI* en 12 individuos del género *Biomphalaria* provenientes del Departamento de Cerro Largo (Figura 11).



**Figura 11.** Amplificación *in vitro* del gen *COI*. Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

Pocillo 1: B306. Pocillo 2: B307. Pocillo 3: B309. Pocillo 4: B310. Pocillo 5: B311. Pocillo 6: B313. Pocillo 7: B326.  
 Pocillo 8: B327. Pocillo 9: B328. Pocillo 10: B329. Pocillo 11: B332. Pocillo 12: B333.

La reamplificación se realizó tal como fue descrita anteriormente y su calidad y concentración fueron estimadas mediante una corrida electroforética (Figura 12).



**Figura 12.** Gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio donde se observa la calidad final de los productos amplificados, previos a ser enviados a purificar y secuenciar.

Pocillo 1: B306. Pocillo 2: B307. Pocillo 3: B309. Pocillo 4: B310. Pocillo 5: B311. Pocillo 6: B313. Pocillo 7: B326.  
 Pocillo 8: B327. Pocillo 9: B328. Pocillo 10: B329. Pocillo 11: B332. Pocillo 12: B333. Pocillo 13: Marcador de peso molecular (1 Kb PLUS DNA ladder, Invitrogen).

### **5. Análisis de las secuencias parciales del gen COI:**

Las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen *COI* aisladas en los 12 individuos colectados en el Departamento de Cerro Largo, así como las secuencias homólogas obtenidas del GenBank y las cuatro secuencias del grupo externo *F.fragilis*, fueron alineadas con el programa Clustal W implementado en el MEGA versión 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Dentro del género *Biomphalaria*, el análisis de polimorfismos de las 12 secuencias nucleotídicas de Cerro Largo, reveló que los 637 pares de bases aislados presentaban 559 sitios conservados, 75 sitios variables y 66 sitios filogenéticamente informativos. Las seis secuencias de *B.peregrina* presentaron 597 sitios conservados, 28 sitios variables y 20 sitios filogenéticamente informativos. Por otro lado las seis secuencias de *B.tenagophila* presentaron 622 sitios conservados, tres sitios variables y dos sitios filogenéticamente informativos.

Se estimaron las distancias genéticas pareadas dentro de *B.peregrina* y dentro de *B.tenagophila* (Tabla 3). Mientras que las distancias genéticas pareadas entre los grupos definidos y en relación al grupo externo se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 3.** Divergencia pareada (D) intraespecífica para *B.peregrina* y *B.tenagophila*, utilizando el modelo Kimura 2P. S.E: Error estándar.

	D (%)	S.E.
<i>B. peregrina</i>	2,400	0,005
<i>B. tenagophila</i>	0,200	0,001

**Tabla 4.** Divergencia pareada (D) interespecífica para *B.peregrina* y *B.tenagophila*, utilizando el modelo Kimura 2P. S.E: Error estándar.

	D (%)	S.E.
<i>B.peregrina</i> vs <i>B.tenagophila</i>	10,100	0,012
<i>B.peregrina</i> vs <i>F.fragilis</i>	17,500	0,018
<i>B.tenagophila</i> vs <i>F.fragilis</i>	14,200	0,016

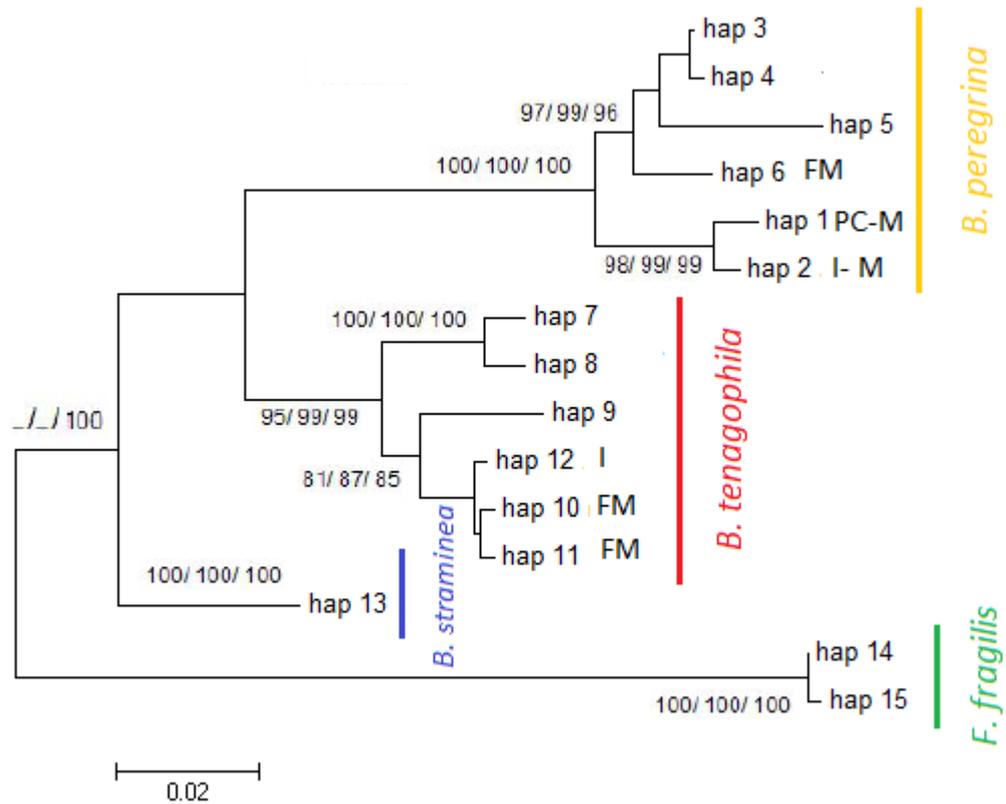
Se obtuvieron 15 haplotipos en el set de datos (Tabla 5). Como se observa en la Tabla 5, algunos haplotipos están compuestos por secuencias aisladas en individuos procedentes de diferentes localidades de Cerro Largo, otros corresponden a una única localidad y otros abarcan las secuencias obtenidas del GenBank.

Las relaciones evolutivas entre las secuencias de *Biomphalaria* fueron analizadas mediante diferentes métodos (MP, NJ y MV). La topología del árbol resultante de MV con una probabilidad de registro de -1797.59, fue similar a la obtenida mediante los otros métodos. Por lo tanto, el árbol de la figura 13 sintetiza los tres resultados. La topología del árbol revela que las especies de *Biomphalaria* conforman un grupo monofilético con soporte de Bootstrap para MP= 100% y la presencia de tres linajes monofiléticos dentro del género *Biomphalaria*. El primer clado abarca la especie *B.straminea* con un soporte de MV= 100%, de NJ= 100% y de MP=100%; el segundo incluye la especie *B.tenagophila* con un soporte de MV= 95%, de NJ= 99% y de MP=99%; el tercer y último clado representa a la especie *B.peregrina* con soportes de MV= 100%, de NJ= 100% y de MP=100%. Dentro del clado de *B.peregrina*, se observan dos subclados. Uno con soportes del nodo de MV= 97%, de NJ= 99% y de MP=96%, formado por los haplotipos 3, 4, 5 y 6 de las localidades de Melo, Fraile Muerto y algunas secuencias del GenBank; y otro con soportes de MV= 98%, de NJ= 99% y

de MP=99% formado solamente por los haplotipos 1 y 2 correspondientes a individuos de las localidades de Itacuruzú, Los Mimbres y Paso del Centurión. Por otro lado, dentro del clado de *B.tenagophila* se observan dos subclados, uno con soportes de MV=81%, de NJ= 87% y de MP=85% formado por los haplotipos 9, 10, 11 y 12 de las localidades de Fraile Muerto e Itacuruzú y algunas secuencias del GenBank; y otro con soportes MV= 100%, de NJ= 100% y de MP= 100% formado por los haplotipos 7 y 8 de secuencias del GenBank. Por último el clado de las *B.straminea* con soportes de MV= 100%, de NJ= 100% y de MP= 100% formado por el haplotipo 13. Para el caso del grupo externos con soportes de MV= 100%, de NJ= 100% y de MP= 100% formado por los haplotipos 14 y 15 (Tabla 5).

**Tabla 5.** Haplotipos obtenidos para el género *Biomphalaria*. En amarillo representado el clado de *B. peregrina*, en rojo el clado de *B. tenagophila* y en azul el clado de *B. straminea*.

Haplotipos	Muestras/localidad	Nº de acceso (GenBank)	Especie
1	B251, B252, B253, B254, B255, B256, B333 <b>PASO DEL CENTURIÓN, LOS MIMBRES</b>	_____	<i>B. peregrina</i>
2	B330, B332 <b>ITACURUZÚ, LOS MIMBRES</b>	_____	<i>B. peregrina</i>
3	<i>B. peregrina</i> GenBank	GU168593.1	<i>B. peregrina</i>
4	<i>B. peregrina</i> GenBank	JN621901.1	<i>B. peregrina</i>
5	<i>B. peregrina</i> GenBank	KX354445.1	<i>B. peregrina</i>
6	B306, B307, B313 <b>FRAILE MUERTO</b>	_____	<i>B. peregrina</i>
7	<i>B. tenagophila</i> GenBank	KF926194.1	<i>B. tenagophila</i>
8	<i>B. tenagophila guaibensis</i> GenBank	KF926197.1	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
9	<i>B. tenagophila guaibensis</i> GenBank	KX354447.1, KX354448.1, KF926155, KX354446.1	<i>B. tenagophila guaibensis</i>
10	B309 <b>FRAILE MUERTO</b>	_____	<i>B. tenagophila</i>
11	B310, B311 <b>FRAILE MUERTO</b>	_____	<i>B. tenagophila</i>
12	B326, B327, B328 <b>ITACURUZÚ</b>	_____	<i>B. tenagophila</i>
13	<i>B. straminea</i> GenBank	KF926191.1, KF926187.1, KF926195.1	<i>B. straminea</i>
14	<i>F. fragilis</i> GenBank	HQ732255.1, HQ732256.1	<i>F. fragilis</i>
15	<i>F. fragilis</i> GenBank	HQ732257.1	<i>F. fragilis</i>



**Figura 13. Análisis filogenético basado en el método de “Máxima Verosimilitud” para el género *Biomphalaria*.** El árbol se dibuja a escala con longitudes de ramas medidas en el número de sustituciones por sitio, los números encima de las ramas corresponden a los valores de soporte de *Bootstrap* (>70%) para cada nodo obtenidos en los tres análisis: Máxima Verosimilitud (MV)/ Unión de vecinos (NJ) / Máxima Parsimonia (MP). En amarillo se indica el clado de *B. peregrina*, en rojo el clado de *B. tenagophila*, en azul el clado de *B. straminea* y en verde el grupo externo compuesto por dos haplotipos de *F. fragilis*. Se indican las localidades de Fraile Muerto como FM, Los Mimbres como M, Itacuruzú como I y Paso del Centurión como PC.

Debido a los altos valores de divergencia pareada dentro del clado de las *B. peregrina* (Tabla 3) fueron calculados valores de divergencia entre los subclados de este grupo, distancia que se muestra en la Tabla 6. Así mismo se calcularon los valores de divergencia pareada dentro de los subclados de *B. tenagophila* (Tabla 6).

**Tabla 6.** Divergencia pareada (D) interespecífica para los subclados de *B. peregrina* y *B. tenagophila*, utilizando el modelo Kimura 2P. S.E: Error estándar.

	D (%)	S.E.
Subclados de <i>B.peregrina</i>	4,200	0,007
Subclados de <i>B.tenagophila</i>	2,700	0,007

## Discusión

El primer objetivo de este trabajo fue caracterizar los ambientes y comunidades donde *Biomphalaria* está presente. Se evidenció que las características de los ambientes de las localidades de Cerro Largo en los que se encontraron individuos de *Biomphalaria* se corresponden con lo reportado en la literatura (Da Silva, 2004; Olazarri, 1981a,b,c,d; Salinas, 2010), las cuales dan cuenta de que tipo de ambiente colonizan así como los organismos asociados a éstos. Fueron encontrados tanto en ambientes lénticos como lóuticos con flujos de velocidad bajos, de escasa profundidad y con macrófitas asociadas. Resulta relevante destacar que ciertos factores físicoquímicos tales como oxígeno disuelto, conductividad y turbidez, los cuales pueden ser útiles para inferir el grado de tolerancia ambiental de estos individuos (Naranjo, 2003), así como una caracterización más completa de los ambientes que colonizan, no fueron evaluadas en este estudio. De todas formas es posible inferir que son ambientes ricos en nutrientes. La presencia de hidrófitas flotantes libres asociadas a estos ambientes da cuenta de esto debido a que sólo crecen en ambientes con alto porcentaje de nutrientes puesto que no están relacionadas con el sustrato (Arocena & Conde, 1999). La importancia de la presencia de macrófitas tales como *Hydrocotyle*, *Eichhornia azurea*, *Echinodorus* sp. o *Schoenoplectus californicus* no sólo proporcionan el mantenimiento de la calidad de agua del ambiente, sino también el reciclaje de nutrientes de la cuenca y sedimentos así como el refugio, sostén, protección, alimentación y hábitat para estos invertebrados (Olazarri, 1981c).

En general, los gasterópodos Pulmonados son capaces de vivir en la interfase sólido-agua y con posibilidades así de dispersarse en aguas anaeróbicas (Arocena & Conde, 1999). Lo antedicho da cuenta del amplio espectro de hábitat que pueden colonizar y la adaptación a la variabilidad de ambientes de estos organismos, los cuales pueden vivir en aguas recicladas como con altos tenores de materia orgánica (Olazarri, 1981a; Salinas, 2010). Como otras poblaciones de macrozoobentos, se ubican en posiciones centrales en las redes tróficas puesto que son consumidores primarios y pueden tener efectos positivos o

negativos sobre la producción primaria del ecosistema según los niveles tróficos que soporte, dada la disponibilidad de nutrientes. Esto conduce a que, una vez dentro de la red trófica sean depredados por otros consumidores secundarios, por lo que estudios al respecto serán de suma importancia ya que podrán controlar las poblaciones de *Biomphalaria* potencialmente transmisoras de esquistosomiasis.

En lo que refiere a la distribución del género en nuestro país y haciendo referencia al segundo objetivo de este trabajo, cabe resaltar que en la región central del territorio uruguayo los muestreos son muy escasos, por lo que no puede asegurarse la ausencia de *Biomphalaria* en ese sector. Si bien los resultados muestran la amplia distribución del género en regiones cercanas al Río Uruguay (Figura 7, A y B) (vinculadas con la represa de Salto Grande), es importante destacar que esa distribución no es uniforme para todas las especies, encontrándose a *B.guaibensis* sólo en la región Sur del país (Figura 7C). En acuerdo con Olazarri (1980), tanto *B.peregrina* como *B.tenagophila* muestran similar distribución, principalmente asociada con la represa de Salto Grande donde a partir de su período de formación en 1979 fueron creciendo gradualmente las poblaciones de moluscos. A su vez, tal distribución presenta mayor representación de *B.peregrina* y sobre todo hacia sectores metropolitanos. En este sentido, Figueiras (1964) reporta como localidad puntual de *B.peregrina* a Montevideo y Durazno, lo cual no es consecuente con la distribución presentada, puesto que su predominio no se muestra sólo hacia zonas metropolitanas sino que también se encuentra representada hacia el sector Noroeste del país en ese vínculo con la represa de Salto Grande.

La evidencia molecular constatada a partir de los análisis filogenéticos mostró congruencia con la identificación morfológica detallada, lo cual se ajusta a lo esperado. Dentro de los ejemplares identificadas como *B.tenagophila* la divergencia pareada intraespecífica mostró valores bajos (menores al 2%) lo que sustenta más su clasificación, ya que para el gen *citocromo oxidasa c* se considera que hay diferencia interespecífica cuando los valores de divergencia pareada superen el 2% (Hebert, 2003). Sin embargo, al momento de agruparlas se diferenciaron de las *B.tenagophila guaibensis* obtenidas del Genbank, por

lo cual, fueron calculadas las distancias pareadas entre esos dos subclados (*B.tenagophila* y *B.tenagophila guaibensis*) mostrando una divergencia de 2,700 %, SE= 0.007 (Tabla 6). Esto sugiere la validez de *B.tenagophila guaibensis* como una subespecie.

Por otra parte, no ocurrió lo mismo para *B.peregrina* cuyos valores de divergencia pareada intraespecífica superaron el 2%, lo cual sugiere que dentro de los subclados definidos para el clado de las *B.peregrina* haya diferencias entre los ejemplares. Por tal motivo se calculó la divergencia pareada entre los subclados de las *B.peregrina* (por una parte el subclado que incluye ejemplares de Paso del Centurión, Los Mimbres e Itacuruzú y por otro el que incluye los ejemplares de Fraile Muerto, Melo y aquellos obtenidos del Genbank), resultado que justifica aún más dicha premisa puesto que devino en un 4,200 %, SE= 0,007 (Tabla 6). Las diferencias entre los ejemplares sugieren la posibilidad de realizar nuevos estudios que comparen estas especies con otras como *B.oligoza* Paraense, 1874, encontrada hacia el Sureste de Brasil en el arroyo Capivara (afluente del Río Jacuí en Porto Alegre) en zonas vinculadas con cultivos de arroz (Pereira *et al.*, 2000). Dada la mencionada dispersión del género, principalmente por el Sureste de Brasil, se podría pensar en especies semejantes en las localidades muestreadas y un reagrupamiento de las especies de este género distinto.

### **Conclusiones**

Estos resultados preliminares revelaron que diferentes especies de *Biomphalaria* están distribuidas en el territorio nacional, particularmente en el del departamento de Cerro Largo se encontraron dos especies, ambas potenciales transmisoras de esquistosomiasis. Por otra parte se confirmó la presencia de *Biomphalaria* en los dos tipos de ambientes límnicos.

### **Perspectivas**

Teniendo en cuenta que desde Brasil la dispersión de *Biomphalaria* viene dándose hacia el Sur y que en Argentina la región Noreste es la más colonizada por especies de este

género (Salomón y Rumi, 2013; Martorelli *et al.*, 2013) resulta importante ampliar los estudios que comprendan localidades con estrecha vinculación de los ríos más importantes de la Cuenca del Plata, así como también aumentar el muestreo en nuestro país con el objetivo de completar localidades vacías de información, como el sector central. A su vez, en este sentido resulta relevante caracterizar aquellas localidades más vulnerables a ser colonizadas por especies de *Biomphalaria*. Importa además ampliar los estudios para Uruguay en relación a la susceptibilidad de las especies de *Biomphalaria* a la infección por *S. mansoni*, con el fin de reunir toda la información suficiente en lo que respecta a la potencial transmisión de la enfermedad.

## Referencias bibliográficas

**Alcántara, M.R. (2007).** Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*, 541-566.

**Arocena, R. & Conde, D. (1999).** Métodos en ecología de aguas continentales con ejemplos de Limnología en Uruguay. *Editores Arocena, R., Conde, D. Universidad de la República. Facultad de Ciencias- DIRAC. Montevideo.*

**Avise, J.C. (2001).** Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Massachusetts. 464 pp.

**Barbosa, F.S. & Barbosa, C.S. (1994).** The bioecology of snail vectors for schistosomiasis in Brazil. *Cadernos de saúde Pública*, 10 (2), 200-209.

**Borda, C.E & Rea, M.J.F. (1997).** Susceptibilidad de *Biomphalaria tenagophila* de las cuencas de los ríos Paraná y Uruguay a *Schistosoma mansoni*. *Revista Panamericana de la Salud Pública* 1(3), 167-173.

**Borda, C.E. & Rea, M.J.F. (2007).** *Biomphalaria tenagophila* potential vector of *Schistosoma mansoni* in the Paraná River basin (Argentina and Paraguay). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102(2), 191-195.

**Campbell, G., Jones, C.S., Lockyer, A. E., Hughes, S., Brown, D., Noble, L.R., & Rollinson, D. (2000).** Molecular evidence supports an African affinity of the Neotropical freshwater gastropod, *Biomphalaria glabrata*, Say 1818, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267 (1460), 2351-2358.

**Cavalli-Sforza, L. L., & Edwards, A. W. (1967).** Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics*, 19(3 Pt 1), 233.

**Cuezzo, M.G. (2009).** Mollusca Gastropoda. Pp. 595-629. En: Domínguez, E. & Fernández, H. (Eds.) *Macroinvertebrados bentónicos sudamericanos*, R. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina. 656 pp.

**Da Silva, P.B. (2004).** Caracterização do ambiente físico-químico e biológico de *Biomphalaria glabrata* em focos litorâneos da esquistossomose em Pernambuco. Recife. *Departamento de Engenharia Civil da UFPE*. 114 pp.

**DeJong, R.J., Morgan, J.A., Paraense, W.L., Pointier, J.P., Amarista, M., Ayeh-Kumi, P.F. & de Souza, C.P. (2001).** Evolutionary relationships and biogeography of *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) with implications regarding its role as host of the human bloodfluke, *Schistosoma mansoni*. *Molecular biology and evolution*, 18 (12), 2225-2239.

**De Luna, E., Guerrero, J.A. & Chew-Taracena, T. (2005).** Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética Systematic biology: advances and directions in theory and methods of phylogenetic reconstruction. *Hidrobiológica*, 15(3), 351-370.

**De Souza, C.P & Lima, L.C. (1990).** Moluscos de interesse parasitológico do Brasil. *Belo Horizonte*. 76 pp.

**Dominguez, E.F. (2006).** *Polimorfismos de DNA mitocondrial en poblaciones antiguas de la cuenca mediterránea*. Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona.

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

**Figueiras, A. (1964).** La malacofauna dulceacuícola del Uruguay. Ensayo de catálogo sistemático y sinonímico. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 1 (7), 161-202.

**Folmer, O., Black, M., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994).** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5), 294-299.

**Hebert, P.D., Ratnasingham, S., & deWaard, J.R. (2003).** Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270 (Suppl 1), S96-S99.

**Hijmans, R.J., Guarino, L., Cruz, M. & Rojas, E. (2001).** Computer for spatial analysis of plant genetic resources data: 1. DIVA GIS. *Plant Genetic Resources Newsletter*, (127), 15 – 19.

**Jordan, M.G., Stepien, A., Banach, L., Lancaster, E. & Govender, J. (2006).** Esquistosomiasis: Estudio retrospectivo de biopsias en los últimos años. *VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica*. 16 pp.

**Kumar, S., Stecher, G. and K. Tamura. 2016.** MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 22.doi: 10.1093/molbev/msw054.

**Lanteri, A.A. & Confalonieri, V.A. (2003).** Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Pp.

185-194. En: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*, Morrone, J.J & Llorente, J. (Eds.). *Universidad Nacional Autónoma de México*. 307 pp.

**Landoni, N.A. (1992).** Inventario de los moluscos de agua dulce de la provincia de Buenos Aires. *Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Plata*. (17), 1-8.

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

**Martorelli, S.R, Aldap, P., Marcotegui, P., La Sala, L.F. & Montes, M.M. 2013.** Larval digeneans in *Biomphalaria* snails from the Salto Grande Dam area in the Uruguay River. *Publicación del laboratorio de helmintos y parásitos de crustáceos del CEPAVE*, 1-13.

**Medrano, J.F., Aasen, E. & Sharrow, L. (1990).** DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques*; 8(1), 43.

**Morrone, J. J. (2000).** Sistemática, Biogeografía, evolución: los patrones de la diversidad en tiempo-espacio. *Universidad Nacional Autónoma de México*. 132 pp.

**Naranjo, E.G. (2003).** Moluscos continentales de México: Dulceacuícolas *Revista de Biología Tropical* 51 (Supl. 3), 495-505.

**Nei, M., & Kumar, S. (2000).** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York. 330 pp.

**Núñez, V., Gutiérrez Gregoric, D. E., & Rumi, A. (2010).** Freshwater gastropod provinces from Argentina. *Malacología*, 53 (1), 47-60.

**Olazarri, J. (1980).** La formación del embalse de salto grande y sus efectos sobre la malacofauna fluvial. *Resúmenes y comunicaciones de las jornadas de ciencias naturales. Montevideo, Uruguay.* (1), 21-22.

**Olazarri, J. (1981a).** *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny 1935) ( Moll., Gastr.) en la zona de Salto Grande. I. Ambientes de cría. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 5 (40) 321-345.

**Olazarri, J. (1981b).** *Biomphalaria tenagophila* (d' Orbigny 1935) ( Moll., Gastr.) en la zona de Salto Grande. II. Factores abióticos que afectan sus poblaciones. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 5 (41) 391-417.

**Olazarri, J. (1981c).** *Biomphalaria tenagophila* (d' Orbigny 1935) ( Moll., Gastr.) en la zona de Salto Grande. III. Flora presente en sus ambientes de cría. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 6 (43) 75-85.

**Olazarri, J. (1981d).** *Biomphalaria tenagophila* (d' Orbigny 1935) ( Moll., Gastr.) en la zona de Salto Grande. IV. Fauna de posible relación con sus poblaciones. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay*, 6 (45) 131- 163.

**Olazarri, J. (1981e).** Poblaciones de moluscos terrestres afectados por el embalse de Salto Grande. *Resúmenes y comunicaciones de las jornadas de ciencias naturales. Montevideo, Uruguay.* (2) 3-4.

**Peña, C. (2011).** Métodos de inferencia filogenética. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. *Revista Peruana de biología.* 18(2): 265-267

**Pereira, D., Veitenheimer-Mendes, I. L., Mansur, M. C. D., & Silva, M. D. (2000).** Malacofauna límnic do sistema de irrigação da microbacia do arroio Capivara, Triunfo, RS, Brasil. *Biociências*, 8(1), 137-157.

**QGIS Development Team, 2016.** QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://www.qgis.org>

**Rzhetsky, A., & Nei, M. (1993).** Statistical properties of the ordinary least-squares, generalized least-squares, and minimum-evolution method of phylogenetic inference. *J Mol Evol.* 35: 367-375.

**Salinas, H. F. (2010).** Divergencia morfológica de la concha entre tres poblaciones de caracoles acuáticos del género *Biomphalaria*. Universidad de Chile. *Departamento de Ciencias Biológicas y animales*.

**Salomón, O.D. & Rumi, A. (2013).** Moluscos de interés sanitario en la Argentina / Primera Edición- Puerto Iguazú. 157 pp.

**Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4: 406- 425.

**Scarabino, F. (2004).** Lista sistemática de los Gastropoda dulceacuícolas vivientes de Uruguay. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 8 (84-85 / 86-87),347-356.

**Teles, H. M. S. & Vaz, J. F. (1987).** Distribuição de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata, Planorbidae) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Saúde pública*, 21 (6), 508-12.

**Teles, H.M.S., Pereira, P.A.C. & Richinitti, L.M.Z. (1991).** Distribuição de *Biomphalaria* (Gastropoda, Planorbidae) nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 25(5), 350-352.

**Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997).** The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25: 4876-4882.

**Tuan, R., Ohlweiler, F.P., Guimaraes, M.C.D.A., Palasio, R.G.S. & Zanna, R.D. (2012).** Pattern of Genetic Divergence of Mitochondrial DNA Sequences in *Biomphalaria tenagophila* Complex Species based on Barcode and morphological analysis. INTECH Open Access Publisher.

**Valdovinos, C. (2006).** Estado de conocimiento de los gasterópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana (Concepción)*, 70(1), 88-95.

**Vázquez, D.E., Castañeda, R.S., Garrido, G.T. & Gutiérrez, G.T. (2009).** Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82 (2), 277-297.

**Vidigal, T.H., Caldeira, R.L., Simpson, A. J. & Carvalho, O. S. (2001).** Identification of *Biomphalaria havanensis* and *Biomphalaria obstructa* populations from Cuba using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA intergenic spacer. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 661-665.

## ANEXO

### ANEXO 1: Buffer empleados para la extracción de ADN

#### Preparación de Buffers

##### Buffer STE 1 X (pH= 8)

	Concentración final
NaCl	100 mM
Tris- Cl ( pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

##### Buffer de LISIS (pH= 8)

	Concentración final
NaCl	100 mM
Tris- Cl ( pH 8)	50 mM
EDTA (pH 8)	50 $\mu$ L
SDS	1.00%

**Buffer 1 X TE (pH= 8)**

	<b>Concentración final</b>
Tris- Cl ( pH 8)	10 mM
EDTA (pH 8)	1 mM

## ANEXO 2: Buffer y soluciones empleados en la corrida electroforética.

### Buffer TAE 1X

	Cantidad
Tris- BASE	121 gr
Ácido Acético Glacial	28,55 ml
EDTA 0,5 M ( pH=8)	50 ml
Volúmen TOTAL	500 ml

\* Llevar a 500 ml con H<sub>2</sub>Odd

### Loading buffer

	Cantidad
Bromophenol Blue (0.25%)= 300 pb	0.0375 gr
Xylene Cyanol FF (0.25%)= 4 Kb	0.0375 gr

---

Glicerol 100%	4.5 ml
---------------	--------

---

H <sub>2</sub> O miliQ	10.5 ml
------------------------	---------

---

Volúmen TOTAL	15 ml (Alícuotas en eppendorf de a 1 ml)
---------------	--

---

### ANEXO 3: Base de datos específica de colecciones del MNHN con cada lote georeferenciando.

COLECCIÓN CLAZARI			
Número	Especie	Localidad	Departamento
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Estanque Inapey Constitución	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Charco inma café/s/fuente que desboca bajo Represa Palmer.	Río Negro
JOs/h	<i>B. terogophila guibensis</i>	Cañada del Sauco afl. Margizajo del arroyo Dacá, cerca Miróces	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Marantal en Minas de San Gregorio (pts. arroyo Laureles, afl. Tacuarebó) cerca de Minas de Corrales, SP	Rivera
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Barrizales en playade Batán (hoy tapada por embalse S Grande)	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo Pasodel Molino (ocañada de los Toros) afl. Margizajo Daymán	Paysandú
JOs/h	<i>Bomphalaria</i> sp	Ruta 81 km 4. Nde Treinta y Tres, cam ANMto.	Treinta y Tres
JOs/h	<i>Bomphalaria</i> sp	Cañada s/h afl. Arroyo Catalán Grande paralela a ruta 30.	Artigas
JOs/h	<i>Bomphalaria</i> sp	Charco sobre r. 21, a 4 km W de Carmelo	Colonia
JOs/h	<i>Bomphalaria</i> sp	Bañado Miravillas a 13 km de La Coronilla	Rocha
JOs/h	<i>Bomphalaria</i> sp	Estación Espinillar.	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Bañado al pie del Cerro Salamanca 30 km al NE Agüá	Maldonado
JOs/h	<i>Bomphalaria</i> sp	Arroyo Velizaz, ruta 10	Rocha
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Ruta 30 km 112, Guará	Artigas
JOs/h	<i>Bomphalaria</i> sp	Arroyo Bazochy en camino ruta 2- ruta 105	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo Dacá, ruta 21	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Lago de Palmer en obrabr de la represa	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Carretera inma Represa Palmer	Río Negro
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Cañada sin nombre (afl. arroyo Maldonado) cerca Aeródromo	Maldonado
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Charco lateral al arroyo Dacá, puente ruta 21	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo Laureles, paso Rio de los Laureles	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Cañada del Tío entrada a Panner Miróces	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Embalse Salto Grande Itapeby (en estación Los Galpones ruta 3 km 520) entrada	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Embalse Salto Grande brazo Yacuy norte ex ruta 3	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Cañada s/h afl. Embalse de Salto Grande en est. Los Galpones ruta 3 km 520	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Puntas arroyo Pantano, Est. 9	Montevideo
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Parque Guernica Miróces	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Charco inma ASantiago Vazquez, ruta 1	Montevideo
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Cañada s/h afl. obr. arroyo Dacá acc. camioneras a Miróces	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Cañada Boyas, cam E. Reg. J. es Miróces	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo Dacá lat. Anuta 21, prox Miróces	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Los Arroyos frente a Miróces	Río Negro
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Cañada Boquerón, Franquías sur de BUhoón	Artigas
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Charcos en Rincón de la Higuera oeste de Villa Soriano	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Embalse Salto Grande en pen. De Batán	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Puntas arroyo Carrasco (bañados)	Montevideo
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Embalse Salto Grande en ex arroyo Itapeby, paso Temilde	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo Palomas, Palomas	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo San Andorino Grande, cerca puente acc. A Salto Grande desde ruta 3	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo Miguel etc	Montevideo
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Agua arriba de la desemb. del arroyo Parico flaco	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo Pareya, ruta 1, km 79.5	San José
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Arroyo Velizaz, ruta 9	Rocha
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Cañada Zarja Honda, Daymán	Paysandú
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Flauta de tratamiento de residuos de ocuales de la represa de Salto Grande	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Charco lat. al arroyo Galdó Sandos	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Fuerte Salto	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Cañada de los Arañillos (cortada Chubucitos entre rutas 2 y 24)	Río Negro
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Charco lat. al arroyo San Andorino Grande ex ruta 3	Salto
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Prox. de Parada Itapeby, ruta 33	Artigas
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Tajamar en camino a Rincón de Galdó (est. La bérica), arroyo Gato	Soriano
JOs/h	<i>B. peregrina</i>	Desarrollo arroyo Chuy a 500 m del cosano Atlántico	Rocha

COLECCIÓN CLAZARR

Número	Especie	Localidad	Departamento
105/h	<i>B. peregina</i>	Desemb. del arroyo Chuy a 500 m del océano Atlántico	Rocha
105/h	<i>B. peregina</i>	Parque Guernica, Mercedes	Soriano
105/h	<i>B. peregina</i>	Cañada Boquerón Franja sur de BUhión	Artigas
105/h	<i>B. peregina</i>	Arroyo Laureles, paso de la Cadena	Salto
105/h	<i>B. peregina</i>	Estanque Inape, Constitución	Salto
105/h	<i>B. peregina</i>	Cañada de Tallaj Laureles	Salto
105/h	<i>B. peregina</i>	Cañada Boquerón Franja sur de BUhión	Artigas
105/h	<i>B. peregina</i>	Cañada del Inglés, afl. lind. marg. zq del arroyo Bequeló Pense	Soriano
105/h	<i>B. peregina</i>	Arroyo Laureles, paso de la Cadena	Salto
105/h	<i>B. peregina</i>	Canal en amocera Cont. en San Gregorio	Artigas
105/h	<i>B. peregina</i>	Charcos en depresiones de arcilla en Parque Guernica, Mercedes	Soriano
105/h	<i>B. guibensis</i>	Desemb. Río San Salvador	Soriano
105/h	<i>B. guibensis</i>	Arroyo Pereyra ruta 1 km 795	San José
105/h	<i>B. guibensis</i>	Arroyo Sauce Grande ruta 55 afl. Izq Arroyo Grande	Río Negro
105/h	<i>B. guibensis</i>	Tajamar inmi. Acañada Padilla, afl. arroyo Sauce Sarand Grande	Florida
105/h	<i>B. guibensis</i>	Charcolatal arroyo Salispueda Grande, Francia	Tacuarembó
105/h	<i>B. teragophila</i>	Bañado Miravillas a 13 km de La Coronilla	Rocha
105/h	<i>B. guibensis</i>	Bañado latal arroyo Sauce Grande ruta 13 a 19 km del NE de Agüá	Maldonado
105/h	<i>B. guibensis</i>	Rutas del arroyo Coquinto Egüa	Soriano
105/h	<i>B. guibensis</i>	Arcal 38	Tríntay Tíres
105/h	<i>B. guibensis</i>	Charco en ruta 19 aprox. A San Miguel	Rocha
105/h	<i>B. teragophila</i>	Bañado Las Miravillas, Salinas Marítimas	Rocha
105/h	<i>B. guibensis</i>	Parque Nat. Tomás Barreta (Cantera del aerod. Ub) Sarand grande	Florida
105/h	<i>B. peregina</i>	Arroyo Tropas Viejas, Cardones	Cardones
105/h	<i>B. guibensis</i>	A pie del Cerro de los Clavos, cerca de Villa Darwin	Soriano
105/h	<i>B. guibensis</i>	Canal del Inglés, afl. lind. del arroyo Bequeló Pense	Soriano
105/h	<i>B. guibensis</i>	Arroyo del Juncal, afl. marg. izq. Río Santa Lucía en camino a Parabr. Tajés	Cardones
105/h	<i>B. teragophila</i>	Canal Androni NE, ruta 9 km 814	Rocha
105/h	<i>B. teragophila</i>	Arroyo Dacá, camino ruta 2 Colón a Díaz	Soriano
105/h	<i>B. teragophila</i>	Cañada s/h (afl. del arroyo Chuy) a 2 km de ruta 9 Chuy	Rocha
105/h	<i>B. teragophila</i>	Cañada Mirigüenas, Pense cerca de Mercedes	Soriano
105/h	<i>B. teragophila</i>	Arroyo Cid del paso Felción	Soriano
105/h	<i>B. guibensis</i>	Río Uruguay al E. De Fray Bentos toma OEE	Río Negro
105/h	<i>B. straminea</i>	Estanque Inidp	Salto Grande
105/h	<i>B. straminea</i>	Cañada Boquerón Franja norte de BUhión	Artigas
105/h	<i>B. straminea</i>	Canal sal. de tajamar Ingo Espinillar	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Desague de tajamar Ingo Espinillar	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Cañada Boquerón Franja norte de BUhión	Artigas
105/h	<i>B. straminea</i>	Ental se Salto Grande en Muelle Deportivo, parque del N. De ciudad de Salto	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Canal en Ingo Espinillar	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Charcos latal río Negro en Parque la Estiba, en Villa Soriano	Soriano
105/h	<i>B. straminea</i>	Laguna Reconda, Norte de Bella Unión	Artigas
105/h	<i>B. straminea</i>	Ental se Salto Grande (brazo Yacuy) norte ex ruta 3	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Canal en Ingo Espinillar	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Tajamar en Ingo Espinillar	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Tajamar en Ingo Espinillar	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Cañada Boquerón Franja sur de BUhión	Artigas
105/h	<i>B. straminea</i>	Laguna Reconda, Norte de Bella Unión	Artigas
105/h	<i>B. straminea</i>	Ental se de Salto Grande ex cañada San José, ciudad de Belén	Salto
105/h	<i>B. straminea</i>	Canales en Ingo Espinillar cerca de Estancia	Salto

COLECCIÓN CLAZARR

Número	Espada	Localidad	Departamento
10s/n	B. stramineo	Charcos en la desembocadura del río Cuareim	Artigas
10s/n	B. stramineo	Charcos de desborde del río Negro en Parque Municipal	Soriano
10s/n	B. stramineo	Tajamar en Ing. Espinillar	Salto
10s/n	B. stramineo	Laguna Redonda, Norte de Bella Unión	Artigas
10s/n	B. stramineo	Embalse de Salto Grande en península de Belén	Salto
10s/n	B. stramineo	Península de Belén en el embalse de Salto Grande, lado Sur	Salto
10s/n	B. stramineo	Embalse de Salto Grande en entrada ciudad de Constitución	Salto
10s/n	B. stramineo	Embalse Salto Grande, brazo ex. ao. Ceibal sur, en la vieja ruta 3	Salto
10s/n	B. stramineo	Embalse Salto Grande en ex. ruta 3, ex. ao. Ceibal norte, Constitución	Salto
10s/n	B. stramineo	Embalse de Salto Grande, Parque del Lago	Salto
10s/n	B. stramineo	Embalse Salto Grande, ex. ruta 3, ex. ao. Ceibalito, N. Constitución	Salto
10s/n	B. stramineo	Charco Coronado, S. de Bella Unión	Artigas
10s/n	B. stramineo	Río Uruguay, Bahía de Fray Bentos	Río Negro
10s/n	B. tenagophilo	Ao. Santa Rosa, sur de Bella Unión	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Termas del Arapey (salida de piletas)	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Charco lateral. ao. San Antonio Gde., ex	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Termas de Daymán	Paysandú
10s/n	B. tenagophilo	Laguna al terminar calle gestido	Rivera
10s/n	B. tenagophilo	Embalse Salto Grande, Itapey (en estación Los Galpones ruta 3 km 520, entrada)	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Piletas salida agua de las Termas de Arapey	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Fuente Salto	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Canal de riego inm. al ao. Mandiyú colonia San Gregorio	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Termas del Arapey	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Canal Temporario en arrozera San Gregorio	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Fuente Salto, proximidades de la ciudad de Salto	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Charco ao. San Antonio Gde. en inm. puente vieja ruta 3	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Canal de salida de piletas de termas de Arapey	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Canal en arrozera, San Gregorio	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Ao. Falso Mandiyú, ruta 3	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Ao. Falso Mandiyú, ruta 3, cerca Col. Palma	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Embalse de Salto Grande, brazo Yacuy Norte	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Ao. Sauzal, en avda. Gariibaldi	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Cañada Guabiyú, zanja Honda, S. Constitución.	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Ao. San Antonio Gde. cerca puente acceso a Salto Grande desde ruta 3	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Tajamar en Ing. Cainsa, levante del ao. Itacumbú, Rincón España, Sur de Bella Unión	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Ao. Guaviyú, ruta 3	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Laguna Redonda, norte de Bella Unión	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Termas de Arapey	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Ao. Palmas, puente ruta 3	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Termas de Arapey	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Laguna Redonda, Franquiá, N. de Bella Unión	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Ao. Tomás Paz (all. mar. i. zq. Río Daymán)	Paysandú
10s/n	B. tenagophilo	Ao. San Antonio Gde. en camino a Cantera Salto Grande	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Cañada Boquerón, Franquiá norte de B. Unión	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Canal levante en San Gregorio establ.	Artigas
10s/n	B. tenagophilo	Fuente Salto, prox. de ciudad de Salto	Salto
10s/n	B. tenagophilo	Ao. Laureles, paso Cadena Laureles	Salto

COLECCIÓN DEL MNHN			
Número	Especie	Localidad	Departamento
MNHN 12448	<i>B. tenagophila</i>	Fuente Salto, Aprox 6 km al norte de Salto	Salto
MNHN 5683	<i>B. guaribensis</i>	Uruguay, río, Nueva Palmira	Colonia
MNHN 10328	<i>B. guaribensis</i>	Maldada, A°, Calle Artigas, al N Ciudad de San José	San José
MNHN 5666	<i>B. peregrina</i>	Carrasco	Montevideo
MNHN 5645	<i>B. peregrina</i>	Santa Lucía, cauce viejo, cerca de San Ramón	Florida
MNHN 4123	<i>B. peregrina</i>	Mangrullo	Cerro Largo
MNHN 5558	<i>B. peregrina</i>	Carrasco	Canelones
MNHN 5655	<i>B. peregrina</i>	Juan Santos, A°	Paysandú
MNHN 5659	<i>B. tenagophila</i>	Cebollati, río, R.8, km 208	Lavalleja
MNHN 5659	<i>B. peregrina</i>	Cebollati, río, R.8, km 208	Lavalleja
MNHN 5665	<i>B. peregrina</i>	Sarandí del Quebracho	Cerro Largo
MNHN 5647	<i>B. peregrina</i>	Santa Lucía, San Ramón	Canelones
MNHN 5522	<i>B. tenagophila</i>	Salsipuedes gde. A°, P° del a Horqueta a 10 km de estación Francia	Tacuarembó
MNHN 5522	<i>B. peregrina</i>	Salsipuedes gde. A°, P° del a Horqueta a 10 km de estación Francia	Tacuarembó
MNHN 5667	<i>B. tenagophila</i>	Queguay, río, Estancia San Juan	Paysandú
MNHN 5667	<i>B. peregrina</i>	Queguay, río, Estancia San Juan	Paysandú
MNHN 5649	<i>B. peregrina</i>	Calleros, A° boca,	Florida
MNHN 5643	<i>B. peregrina</i>	Virgen, A° boca	San José
MNHN 5559	<i>B. peregrina</i>	Carrasco	Montevideo
MNHN 5644	<i>B. peregrina</i>	Bañados cerca de P° Belinzón, A° Canelón Grande	Canelones
MNHN 5038	<i>B. peregrina</i>	Toledo, A° Bañados de Carrasco	Montevideo
MNHN 5646	<i>B. peregrina</i>	Chamizo, A°, cerca de	Florida
MNHN 5117	<i>B. peregrina</i>	Estanque cerca del Río Uruguay, San Gregorio	Artigas
MNHN 820	<i>B. peregrina</i>	Bañados de Carrasco	Canelones
MNHN 5657	<i>B. peregrina</i>	Salsipuedes, A°, Estación Francia	Tacuarembó
MNHN 5524	<i>B. peregrina</i>	A° proximo a Curtina	Tacuarembó
MNHN 5518	<i>B. Platanorhidae indet.</i>	Malvin, A°	Montevideo
MNHN 12449	<i>B. tenagophila</i>	Uruguay, río, Salto Grande	Salto
MNHN 5674	<i>B. tenagophila</i>	Establecimiento Espinillar	Salto
MNHN 5525	<i>B. peregrina</i>	Queguay, Río	Paysandú
MNHN 5549	<i>B. tenagophila</i>	Santa Ana, Artilleros	Colonia
MNHN 12457	<i>B. peregrina</i>	Areneras de A° Carrasco	Canelones
MNHN 10602	<i>B. tenagophila</i>	San Antoniogde. A°	Salto
MNHN 3725	<i>B. tenagophila</i>	Uruguay, río, Salto Grande	Salto
MNHN 14478	<i>B. peregrina</i>	Paso Severino	Florida
MNHN 4864	<i>B. peregrina</i>	Colonia España	Artigas
MNHN 5698	<i>B. peregrina</i>	Piedra Sola, A°, 14° Sección	Canelones
MNHN 14455	<i>B. peregrina</i>	Río de la Plata, Piedras de los Indios	Colonia
MNHN 9501	<i>B. tenagophila</i>	A° Falso Mandiyú, R.3	Artigas
MNHN 5662	<i>B. peregrina</i>	Medanos costeros entre Santa Teresa y La Coronilla	Rocha
MNHN 14464	<i>B. peregrina</i>	Salsipuedes, A°, P° Horqueta	Tacuarembó
MNHN 14272	<i>B. peregrina</i>	Ceibal, A° en el río Uruguay	Salto
MNHN 14448	<i>B. peregrina</i>	Itapebí, gde, A° P° Terrible	Salto
MNHN 14238	<i>B. peregrina</i>	Chanchos, A° del os, R.3	Paysandú
MNHN 14238	<i>B. tenagophila</i>	Itapebí, gde, A° P° Terrible	Salto

COLECCIÓN DEL MNHN

Número	Especie	Localidad	Departamento
MNHN 5652	<i>B. peregrina</i>	Itapebí, gde, A° P° Terrible	Salto
MNHN 10903	<i>B. peregrina</i>	Buceo	Montevideo
MNHN 10375	<i>B. guaibensis</i>	Tigre, A° del, Estancia El Tigre, 11 km de Colonia Palma	Artigas
MNHN 5684	<i>B. guaibensis</i>	Puntas del Catalán	Durazno
MNHN 5515	<i>B. peregrina</i>	Higuerita, A°	Colonia
MNHN 14254	<i>B. peregrina</i>	Piedras, las, A°, Las Piedras	Canelones
MNHN 14476	<i>B. peregrina</i>	Playa de Belén, Río Uruguay, Sobre boca A° Yacuí	Salto
MNHN 14135	<i>B. tenagophila</i>	Charcos margen izquierda A° Guaviyú, R.3	Artigas
MNHN 14135	<i>B. tenagophila</i>	Establecimiento Espinillar	Salto
MNHN 14274	<i>B. peregrina</i>	Establecimiento Espinillar	Salto
MNHN 5533	<i>B. tenagophila</i>	Reyna, Cda. Belén	Salto
MNHN 14273	<i>B. tenagophila</i>	Blanca, Laguna, Manantiales	Maldonado
MNHN sin ingresar	<i>B. tenagophila</i>	Segovia, Cda. R.3, Km 565	Salto
MNHN 5651	<i>B. tenagophila</i>	Toledo, A° R. 102	Canelones
MNHN sin ingresar	<i>B. tenagophila</i>	Carrasco	Montevideo
MNHN sin ingresar	<i>B. peregrina</i>	Boca Arroyo Carrasco	Montevideo
MNHN 14145	<i>B. tenagophila</i>	A° Sauce Grande, San Gregorio de Polanco	Tacuarembó
MNHN 5556	<i>B. peregrina</i>	San Antonio Grande, A°, R.3	Salto
MNHN 5672	<i>B. peregrina</i>	Paso Carrasco	Canelones
MNHN 5543	<i>B. tenagophila</i>	Minas	Lavalleja
MNHN 2603	<i>B. tenagophila</i>	Laguna Aeropuerto Carrasco	Canelones
MNHN 5548	<i>B. tenagophila</i>	Toledo, A°, bañados de Carrasco	Montevideo
MNHN 5514	<i>B. tenagophila</i>	Seré, playa, Carmelo	Colonia
MNHN 5658	<i>B. tenagophila</i>	Bañados de Carrasco	Canelones
MNHN 5546	<i>B. guaibensis</i>	Arenera Minetti	Canelones
MNHN 5660	<i>B. tenagophila</i>	Tres Cruces, A°	Artigas
MNHN 5521	<i>B. tenagophila</i>	Río Tacuarí, P° de Rodríguez	Cerro Largo
MNHN 5161	<i>B. Planorbidae</i> indet.	Laguna las Vacas, 25 km S.W. Ansina	Tacuarembó
MNHN 5545	<i>B. guaibensis</i>	Laguna Arazatí	San José
MNHN 14403	<i>B. guaibensis</i>	San José de Carrasco	Canelones
MNHN 4460	<i>B. Planorbidae</i> indet.	Playa de Belén, Río Uruguay, Sobre boca A° Yacuí	Salto
MNHN 5668	<i>B. peregrina</i>	Asencio	Soriano
MNHN 14271	<i>B. peregrina</i>	Areneras de Carrasco, frente al aeropuerto	Canelones
MNHN 14271	<i>B. tenagophila y guaibensis</i>	Itapebí, gde, A° P° Terrible	Salto