

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Diversidad y estructura genética de *Bostryx scalariformis* (Mollusca, Gastropoda) en base a polimorfismos del gen mitocondrial 16S rRNA

TESIS

para optar el título profesional de Biólogo

AUTOR

Pedro Eduardo Romero Condori

ASESOR

Rina Ramírez

Lima – Perú

2008

"Adieu, dit le renard. Voici mon secret. Il est très simple: on ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux."

Antoine de Saint-Exupéry

"Le Petit Prince"

A Pedro y Emma,
mis mentores para toda la vida

AGRADECIMIENTOS

Mi entera gratitud a mis padres, Pedro y Emma, por su apoyo incondicional, su confianza, y esfuerzo invaluable para salir adelante, el éxito de mis aventuras siempre será parte de ellos.

A mi asesora, Dra. Rina Ramírez, gracias por encaminarme en este maravilloso mundo lleno de árboles, redes e ideas; encontré en ella no sólo una fuente de conocimientos sino una gran amiga.

Este trabajo no hubiera podido ser realizado sin el apoyo de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos a través del Vicerrectorado de Investigación y el Instituto de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi financiando los proyectos: “Biogeografía de la biota del desierto entre áreas de endemismo: Componentes específicos y poblacional de la biodiversidad de moluscos (Mollusca: Gastrópoda) de lomas y bases para el estudio de su diversidad genética”, y “Genómica y evolución de la biota del desierto: Relación entre poblaciones de caracoles Bulimúlidos (Mollusca, Gastrópoda) de ecosistemas de lomas y de la vertiente occidental de los andes”, ambos a cargo de la Dra. Rina Ramírez.

A mis amigos del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía y del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Ana Luz, Jorge, Carlos, Víctor, Pável, Jenny, Daniel y Norma por su inmensurable apoyo en este trabajo, por las extraordinarias salidas de campo y las interminables horas en el laboratorio. Esta sociedad de amigos de los caracoles puede hacer cosas realmente fabulosas.

Este trabajo no hubiera podido haber sido realizado sin la ayuda del Dr. Pablo Ramírez y todo el equipo del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Gracias por su colaboración y paciencia.

Las salidas de campo hacia los lugares de colecta no hubieran sido posibles sin el apoyo de mis tíos Rodolfo y Raúl, quienes me permitieron llegar hasta aquellos hermosos paisajes de desierto y lomas.

A todos los que de una u otra forma estuvieron involucrados en la consecución de esta meta:

Gracias.

RESUMEN

Bostryx scalariformis (Mollusca, Gastropoda) es un molusco terrestre endémico de las lomas costeras de la costa central del Perú que habita principalmente las zonas arenosas. Sólo se encuentran individuos vivos en las siguientes lomas del departamento de Lima: Ancón, Pasamayo, Lachay y Cerro de Agua. Además, posee morfotipos geográficamente aislados, uno en Ancón-Pasamayo y el otro en Lachay-Cerro de Agua. La fragmentación de su hábitat y la disminución en su tamaño poblacional pueden haber conllevado al decremento en su diversidad genética y una diferenciación genética entre sus poblaciones.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la diversidad genética en *B. scalariformis* comparándola con su distribución geográfica y morfotipos, para así obtener información sobre la estructura genético-poblacional de la especie. Para ello, se realizó un análisis morfométrico del diseño de la concha en 200 individuos. De las 10 variables utilizadas, 8 fueron digitalizadas y procesadas para encontrar las distancias entre los puntos de medición; a este conjunto se sumaron las variables: número de costillas por cada 3 mm y número de vueltas. Luego, se utilizaron individuos colectados vivos para la extracción de DNA total a partir de tejido del músculo del pie y se realizaron las amplificaciones del gen mitocondrial 16S rRNA por PCR. Los productos de amplificación fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se utilizaron en el análisis filogenético intraespecífico y poblacional.

El análisis morfométrico demostró diferencias entre las poblaciones de Ancón-Pasamayo con Lachay-Cerro de Agua. El alineamiento múltiple de las 61 secuencias presentó 224 sitios conservados, 111 posiciones variables y 55 sitios informativos. Los análisis de las relaciones intraespecíficas muestran una gran separación de los haplotipos de Lachay – Cerro de Agua con Pasamayo – Ancón. El análisis de la red de haplotipos de las poblaciones estudiadas demuestra también la divergencia genética entre ambos grupos, Lachay-Cerro de Agua comparte un haplotipo, mientras que Ancón-Pasamayo no presentan haplotipos comunes.

El análisis poblacional revela diferencias genéticas dentro del morfotipo Ancón-Pasamayo mientras que las diferencias son menores en el otro morfotipo (Lachay-Cerro de Agua).

El desierto costero ha jugado un papel importante en el aislamiento y diferenciación genética de las poblaciones del molusco. Sin embargo, los cambios climáticos producidos principalmente por eventos El Niño extraordinarios en el pasado permitieron la mantención de una alta diversidad genética. Este trabajo ha permitido reconocer la estructura genética de las poblaciones de *B. scalariformis*, y muestra que las lomas son focos de alta diversidad. La conservación de estos ecosistemas es de suma importancia para mantener el potencial evolutivo de la biota que las habita, así como la gran biodiversidad que presentan.

ABSTRACT

Bostryx scalariformis (Mollusca, Gastropoda) is a land snail species from central Peru. It is endemic to coastal "lomas" ecosystem and inhabits mainly in sand formations. Alive individuals have only been found in Ancon, Pasamayo, Lachay and Cerro de Agua lomas from Lima department. This species has two morphotypes, which in turn are geographically isolated, one morphotype inhabits in Ancon-Pasamayo lomas and the other one in Lachay-Cerro de Agua. Habitat fragmentation and decreasing of population size could have lead to reduction of genetic diversity and to genetic differentiation between its populations. The aim of this research was to evaluate genetic diversity in *B. scalariformis* comparing it with both its geographical distribution and morphotypes, in order to know about its population genetic structure. A morphometrical analysis was performed with 200 shells from the four localities using 10 variables from the shell. Alive snails were used to extract total DNA from foot muscle and 16S rRNA gene was amplified by PCR. PCR products were sequenced and these data were used in phylogenetic and population analyzes. Morphometric analyses reveals differences – mainly in ornamentation- between populations from Ancon-Pasamayo and Lachay-Cerro de Agua. Multiple alignment of 61 sequences shows 224 conserved sites, 111 variable sites and 55 informative sites. Intraspecific phylogeny reveals two monophyletic clades inside *B. scalariformis*: Ancon-Pasamayo and Lachay-Cerro de Agua. Population analysis shows two groups of haplotypes corresponding to morphotypes. Network analysis shows also genetic divergence between morphotypes. Genetic differentiation resulted obvious between isolated morphotypes being the differences within Ancon-Pasamayo higher than Lachay-Cerro de Agua. Coastal desert has played a key role isolating populations and allows genetic differentiation between morphotypes. Historical climate changes as ENSO had also influenced in maintaining genetic diversity in land snails. This work reveals *B. scalariformis* population genetic structure and the importance of lomas formations as "hotspots" of diversity. Conservation of these habitats is important because its key role in maintaining evolutionary potential of species an the high biodiversity present.

CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
CONTENIDO	9
LISTA DE TABLAS	12
LISTA DE FIGURAS	14
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 Objetivos	20
2. ANTECEDENTES	21
2.1 Posición de <i>Bostryx scalariformis</i> dentro del Phylum Mollusca	21
2.2 Aspectos generales de la especie	21
2.3 El DNA mitocondrial y su uso en estudios poblacionales	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1. Área de estudio	32
3.1.1 Clima	32
3.1.2 Vegetación	32
3.2. Análisis Morfológico	33
3.2.1 Colecta	33
3.2.2 Morfometría	34
3.3. Análisis Molecular	35
3.3.1 Extracción de DNA total	35
3.3.2 Amplificación de DNA	35
3.3.3 Electroforesis de DNA	36
3.3.4 Secuenciación de DNA	37
3.3.5 Edición y Alineamiento múltiple de secuencias	37

3.3.6 Caracterización de secuencias	38
3.3.7 Diversidad Genética	38
3.3.8 Análisis Filogenéticos	38
3.3.9 <i>Networks</i>	39
3.3.10 Análisis de estructura poblacional	40
3.3.11 Patrones demográficos	40
3.3.12 Tiempos de Divergencia	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Análisis Morfométrico	41
4.1.1 Descripción de los datos morfométricos	41
4.1.2 Análisis de Componentes Principales	43
4.1.3 Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas	45
4.2 Análisis Molecular	47
4.2.1 Descripción de las secuencias obtenidas	47
4.2.2 Alineamiento Múltiple de Secuencias	48
4.2.3 Diversidad Genética	54
4.2.4 Análisis filogenético	58
4.2.5 <i>Networks</i>	64
4.2.6 Estructura y Diferenciación Poblacional	66
4.2.7 Patrones demográficos	69
4.2.8 Tiempos de Divergencia	74
5. DISCUSIÓN	77
5.1 Análisis Morfométrico	77
5.2 Análisis Molecular	79
5.2.1 Filogenia intraespecífica	80
5.2.2 Análisis poblacional	81
5.2.3 Patrones demográficos	83
5.2.4 Filogeografía	84
5.2.5 Especiación	88
5.2.6 Conservación	90

6. CONCLUSIONES	93
7. RECOMENDACIONES	94
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
9. ANEXOS	106
Anexo 1.- Adquisición de datos morfométricos usando los programas TPSDig y LMDis	106
Anexo 2.- Fotografías de algunos individuos utilizados en el estudio	107

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación geográfica de los lugares de colecta, se muestran valores de coordenadas, altitud y distancia al mar.	33
Tabla 2. Distancia lineal (en kilómetros) entre las localidades de colecta.	33
Tabla 3. Valores mínimo, máximo, media y desviación estándar para las variables utilizadas en el análisis morfométrico de <i>Bostryx scalariformis</i> . D.E: Desviación Estándar.	42
Tabla 4. Análisis de Componentes Principales. Coeficientes de variación para las 10 variables utilizadas para las cuatro poblaciones de <i>Bostryx scalariformis</i> . Un mayor valor absoluto indica una mayor responsabilidad en la variación encontrada.	43
Tabla 5. Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas en las poblaciones de <i>Bostryx scalariformis</i> . Coeficientes de variación para las 10 variables.	45
Tabla 6. Frecuencia de bases nitrogenadas para cada población de <i>Bostryx scalariformis</i> . N = Número de secuencias.	47
Tabla 7. Sitios polimórficos informativos al analizar el conjunto total de secuencias del gen mitocondrial 16S rRNA, obtenidas de <i>B. scalariformis</i> , <i>B. sordidus</i> , <i>B. modestus</i> y <i>B. conspersus</i>	51
Tabla 8. Haplotipos (grupos de secuencias iguales) encontrados en las poblaciones de <i>B. scalariformis</i> a partir de 27 sitios variables. Los números indican los 44 sitios variables. N = Número de secuencias. Sólo un haplotipo (H3) está compartido entre las poblaciones de Lachay y Cerro de Agua. Ancón y Pasamayo no presentan haplotipos compartidos. El haplotipo más divergente (H17) pertenece a 7 individuos de la población de Pasamayo. Hap: Haplotipos. Pob.: Poblaciones (A: Ancón, C: Cerro de Agua, L: Lachay, P: Pasamayo).	55
Tabla 9. Distribución de los haplotipos de <i>B. scalariformis</i> con respecto a las localidades de muestreo. La línea punteada indica que no existen haplotipos compartidos entre las localidades de Ancón-Pasamayo y Lachay-Cerro de Agua.	56
Tabla 10. Valores de diversidad genética (H), para las poblaciones estudiadas de <i>B. scalariformis</i> . N = Tamaño muestral. Nótese los altos valores de diversidad genética encontrados salvo en el caso de Ancón.	56
Tabla 11. Distancia genética a pares (Kimura 2-parámetros) dentro de cada población (diagonal) y entre cada una de las poblaciones (debajo de la diagonal). Nótese la mayor diferencia al comparar entre las poblaciones que dentro de ellas, salvo para el caso de Pasamayo.	57

Tabla 12. Valores de <i>Fst</i> entre las poblaciones de <i>B. scalariformis</i> . Valores cercanos a 1 indican diferenciación genética entre las poblaciones. Todos los valores fueron altamente significativos ($p < 0.001$), excepto para el caso de Lachay y C. de Agua.	66
Tabla 13. Valores de <i>Fst</i> entre las poblaciones de <i>B. scalariformis</i> sin considerar al haplotipo H17. Valores cercanos a 1 indican diferenciación genética entre las poblaciones. Todos los valores fueron altamente significativos ($p < 0.001$), excepto para el caso de Lachay y Cerro de Agua.	67
Tabla 14. Valores de <i>Fst</i> entre los cuatro grupos propuestos para <i>B. scalariformis</i> . Los valores cercanos a 1 indican diferenciación genética entre las poblaciones. Todos los valores fueron significativos ($p < 0.001$).	67
Tabla 15. Análisis de Varianza Molecular entre los morfotipos (Cerro de Agua-Lachay y Pasamayo-Ancón) de <i>Bostryx scalariformis</i> . Los estadísticos resultaron significativos ($p < 0.0001$), salvo en (*).	68
Tabla 16. Análisis de Varianza Molecular para los cuatro grupos genéticamente diferentes (Cerro de Agua-Lachay, Pasamayo, Ancón, y Pasamayo H17) propuestos dentro de <i>Bostryx scalariformis</i> . Los estadísticos resultaron significativos ($p < 0.0001$) sólo en (*).	69
Tabla 17. Valores del promedio de diferencias a pares, sitios polimórficos y diversidad nucleotídica para cada una de las poblaciones de <i>B. scalariformis</i> . k = Promedio de diferencias a pares, s = Número de sitios polimórficos, π = Diversidad nucleotídica. Se añadieron los datos de número de haplotipos y diversidad genética (H) a modo de comparación.	70
Tabla 18. Valores del estadístico F_s de F_u para cada población de <i>B. scalariformis</i> (A) o para los grupos de morfotipos (B). (*) resultado significativo ($p < 0.05$).	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Individuos de *Bostryx scalariformis* provenientes de las localidades de Ancón (a), Pasamayo (b), Lachay (c) y Cerro de Agua (d). Obsérvese las diferencias en el diseño de la concha, entre los grupos de Ancón – Pasamayo y Lachay – Cerro de Agua. La escala representa: 5 mm. 23
- Figura 2. Área de estudio. (a) Las cuatro lomas se encuentran en la costa central de Perú, departamento de Lima. (b) Ancón y Pasamayo. (c) Lachay y Cerro de Agua. Modificado de Google Maps. 27
- Figura 3. Lomas de Ancón: (a) Mapa de relieve, (b) tilandsiales ubicados en la zona oriental y vegetación predominante, (c) cactáceas y (d) *Tilandsia* sp. (e) Muestreo buscando entre los tilandsiales. Relieve tomado de Google Maps. Fotos: P. Romero y J. Ramirez. 28
- Figura 4. Lomas de Pasamayo: (a) Mapa de relieve. (b) y (c) Individuos de *B. scalariformis* asociados a las herbáceas presentes y/o vegetación seca. (d) *Solanum multifidum*, especie típica de la zona. (e) Muestreo en la vegetación herbácea cerca de la carretera. Relieve tomado de Google Maps. Fotos: P. Romero y J. Ramirez. 29
- Figura 5. Lomas de Lachay: (a) Mapa de relieve. (b) Individuo de *B. scalariformis* asociado a la vegetación seca. Vegetación presente en el lugar como (c) *Nicotiana* sp. o (d) cactáceas. (e) Colecta de individuos. Relieve tomado de Google Maps. Fotos: P. Romero y V. Borda. 30
- Figura 6. Lomas de Cerro de Agua. (a) Mapa de relieve. (b) Predomina la vegetación herbácea, principalmente el género *Solanum*. (c) Individuo de *B. scalariformis* asociado a la vegetación seca. La loma muestra una marcada diferencia entre la estación seca (d) y la estación húmeda (e). Relieve tomado de Google Maps. Fotos: P. Romero y J. Ramirez. 31
- Figura 7. Tipos de lomas costeras. La flecha indica la dirección de la brisa marina. Tomado de Ono (1986). 32
- Figura 8. Puntos de medición (*landmarks*) utilizados en el análisis morfométrico multivariado. En la figura se muestra la foto digitalizada y los puntos anotados por el programa tpsDig. En total son 15 landmarks utilizados. Estas ocho variables sumadas al número de costillas en 3 mm y el número de vueltas completan las diez variables utilizadas en el estudio. 34
- Figura 9. Porción del genoma mitocondrial del molusco terrestre *Albinaria coerulea*. Se muestra la posición del gen 16S rRNA (l-RNA) en relación a los genes COX1 y ND6. Modificado de la base de datos Genbank–NCBI (www.ncbi.gov). Número de Acceso (GI): NC_001761. 36

Figura 10. Análisis de Componentes Principales en las poblaciones de <i>Bostryx scalariformis</i> . Los valores representan datos normalizados que fueron comparados contra las componentes con mayor responsabilidad en la variación. Componente 1 (tamaño) y Componente 2 (ornamentación).	44
Figura 11. Análisis de Discriminantes Canónicos en las poblaciones de <i>Bostryx scalariformis</i> . Los valores representan datos normalizados que fueron comparados contra las funciones con mayor responsabilidad en la variación. Función 1 (ornamentación), Función 2 (forma de la abertura).	46
Figura 12. Porción del cromatograma obtenido luego de la secuenciación del gen mitocondrial 16S rRNA para un individuo de <i>Bostryx scalariformis</i> de la población de Ancón.	47
Figura 13. Transiciones y tranversiones comparadas contra las distancias a pares entre las secuencias de <i>B. scalariformis</i> . Ts=Transiciones (círculos), Tv=Tranversiones (rombos). El modelo de distancia utilizado fue el de Kimura 2-Parámetros (K80).	48
Figura 14. Primera porción del alineamiento múltiple de secuencias del gen mitocondrial 16S rRNA observada a través del programa ClustalX. La imagen muestra los primera zona alineada, nótese la conservación de las primeras posiciones y la formación del primer gap (flecha) provocado por <i>B. conspersus</i>	49
Figura 15. Porción central del alineamiento múltiple de secuencias. Los individuos de Lachay y Cerro de agua provocan la formación de un gap debido a la inserción de timinas (TTTT). La flecha indica la inserción.	50
Figura 16. Porción final del alineamiento múltiple de secuencias. La última parte corresponde al primer 16S-R472. Las secuencias se encuentran bastante conservadas, los <i>gaps</i> son provocados por la especie hermana <i>B.sordidus</i>	53
Figura 17. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de <i>B. scalariformis</i> . Árbol obtenido en MEGA utilizando las distancias calculadas con el modelo Kimura 2-Parámetros y el método de Neighbour Joining. Se muestran los valores de <i>bootstrap</i> mayores a 70%. La escala representa la distancia genética.	59
Figura 18. Relaciones filogenéticas de los haplotipos de <i>Bostryx scalariformis</i> . Árbol obtenido en PAUP utilizando el método de Máxima Parsimonia. Se muestran los valores de <i>bootstrap</i> mayores a 70%.	61
Figura 19. Relaciones filogenéticas de los haplotipos de <i>Bostryx scalariformis</i> . Árbol obtenido en PAUP utilizando el método de Máxima Verosimilitud. Se muestran los valores de <i>bootstrap</i> mayores a 70%.	62

Figura 20. Relaciones filogenéticas de los haplotipos de *Bostryx scalariformis*. Árbol obtenido en Mr. Bayes utilizando el análisis bayesiano. Los valores indican la probabilidad de los clados. Se muestran las probabilidades mayores a 0.70.63

Figura 21. Red de haplotipos de *B. scalariformis*. Los colores representan a la poblaciones: Ancón (verde), Pasamayo (azul), Lachay (rosa), Cerro de Agua (lila). Los cambios mutacionales dentro de los grupos se muestran en rojo y entre los grupos en negro. El tamaño de los círculos es proporcional al haplotipo correspondiente (ver escala). 65

Figura 22. Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para las poblaciones de *B. scalariformis*, En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. Un mejor ajuste de la distribución observada (azul) a la distribución esperada (rojo) implica un episodio de expansión poblacional súbita. (a) Ancón, (b) Pasamayo sin H17, (c) Lachay, (d) Cerro de Agua. 72

Figura 23. Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para las poblaciones de *B. scalariformis*, En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. Un mejor ajuste de la distribución observada (azul) a la distribución esperada (rojo) implica un episodio de expansión poblacional súbita. (a) Pasamayo sin el haplotipo H17, (b) Cerro de Agua + Lachay, (c) Ancón + Pasamayo, (d) Ancón + Pasamayo sin H17. 73

Figura 24. Tiempos de divergencia en la especie *Bostryx scalariformis*. (A) Tiempo de divergencia de *B. scalariformis* con respecto a *B. sordidus* (700 mil años). La escala inferior representa la distancia genética y la superior el tiempo en millones de años. 75

Figura 25. Tiempos de divergencia en las poblaciones de *B. scalariformis*. Cada población esta indicada con un color: Ancón (verde), Pasamayo (azul), Lachay (rojo), y Cerro de Agua (morado). La escala inferior representa la distancia genética y la superior el tiempo en miles de años. (A) Divergencia entre los clados de *B. scalariformis* (410 mil años). (B) Divergencia de los haplotipos de Pasamayo de la población de Ancón (110 mil años). 76

Figura 26. El mismo árbol linearizado de la figura anterior mostrando la divergencia entre las poblaciones de *B. scalariformis* ahora comparado con los datos encontrados por Lea *et al.* (2000) de temperaturas superficiales del mar (SST), la barra gris representa el aumento de la temperatura hace 130 mil años que coincidió con eventos el Niño extraordinarios (Modificado de Ramírez, 2004). 87

1. INTRODUCCIÓN

El clima de la mayor parte de la costa peruana está ligado principalmente a la corriente marina de Humboldt. Las bajas temperaturas de esta corriente producen el fenómeno de inversión térmica por el cual las aguas frías del mar enfrían la capa de aire hasta unos 800 metros de altitud (Muñoz-Schick *et al.*, 2001). El fenómeno de inversión térmica aunado con la presencia de la Cordillera de los Andes – que impide el paso de nubes productoras de lluvia- produce las condiciones hiperáridas características del litoral costero (Ramírez, 2004).

La ausencia de precipitación provoca la acumulación de humedad en forma de neblina, la cual es trasladada por la brisa marina hacia la zona occidental de la Cordillera de los Andes. La condensación produce garúas que permiten la aparición de ecosistemas estacionales conocidos como "lomas", islas de vegetación separadas por el desierto hiperárido, ubicadas entre los 5º y 30º LS (Rundel *et al.*, 1991). La vegetación presente alcanza su mayor densidad entre los meses de agosto y septiembre permitiendo la aparición de una biota característica (Cano *et al.*, 1999).

El clima de la costa desértica es afectado por el Fenómeno El Niño/Oscilación Sur (ENSO), existiendo evidencia arqueológica de su existencia hace más de 10000 años (Sandweiss, 2003). Este fenómeno ha sido señalado como una de las principales causas de la variabilidad climática en gran parte del mundo (Arntz & Fahrback, 1996), y sus efectos en la zona intertropical de la cuenca del Océano Pacífico resultan en el aumento de temperatura y la generación de precipitaciones excepcionales en la costa del Perú y Chile. Las precipitaciones producen un aumento en la extensión de las lomas costeras transformando el paisaje del desierto (Dillon, 1997).

Durante el Pleistoceno existieron cambios climáticos globales que afectaron a América del Sur. Las nieves perpetuas de los Andes descendieron provocando el retroceso de la línea de vegetación, las áreas húmedas de los trópicos recibieron menor precipitación mientras lo contrario sucedía en las regiones áridas subtropicales (Clapperton, 1993). Los eventos ENSO, que posiblemente fueron anuales durante la última glaciación pueden haber sido los causantes del incremento de la humedad permitiendo la persistencia de la vegetación y el aumento de su distribución a extensiones mayores que en la actualidad (Campbell, 1982).

El estudio de la biota actual puede contribuir en la búsqueda de explicaciones acerca de la historia natural de las lomas costeras. Entre los elementos conspicuos de la biota de las lomas encontramos a los moluscos terrestres, los cuales están adaptados para sobrevivir bajo las condiciones climáticas de esta región (Ramírez, 2004). Entre las especies de moluscos terrestres presentes tenemos a los nativos *Bostryx aguilari*, *Bostryx conspersus*, *Bostryx modestus*, *Bostryx sordidus*, *Bostryx scalariformis*, *Scutalus proteus*, *Scutalus versicolor* y *Succinea peruviana*, además de la especie introducida *Helix aspersa* (Ramírez *et al.*, 2003). *Bostryx* y *Scutalus* pertenecen a la familia Orthalicidae, cuyos miembros están adaptados a ambientes áridos y a condiciones difíciles, pudiendo sellar la apertura de la concha para prevenir la desecación (Pfenninger & Magnin, 2001).

Sin embargo los cambios climáticos así como la acción del hombre sobre los ecosistemas ponen en grave peligro la preservación de las lomas y de su biota característica (Mena *et al.*, 2007). La desaparición de los ecosistemas de lomas repercute en las poblaciones de moluscos terrestres (Ramírez *et al.*, 2001). Esta reducción del hábitat disminuye el potencial evolutivo de las poblaciones por la reducción del número de individuos y de la diversidad genética (Nei *et al.*, 1975).

La diversidad genética es uno de los componentes de la diversidad biológica, y comprende la variabilidad de genes entre los individuos y poblaciones de las especies (Primack & Rodrigues, 2001). La importancia del estudio y la conservación de la diversidad biológica -y por ende, de la diversidad genética- quedó resaltada luego de la cumbre de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (CDB, 1992). Las conclusiones de esta cumbre han sido ratificadas por el Estado peruano, el cual

además se comprometió en promover la conservación de la diversidad biológica (Constitución Política del Perú: Artículo 68, 1993).

El DNA del genoma mitocondrial es usado en los estudios de diversidad a nivel molecular debido a su capacidad de revelar patrones de estructuración y diferenciación poblacional, y estimar la diversidad genética dentro y entre las poblaciones al tener las siguientes características: Una tasa de mutación alta que permite mayor variación intraespecífica; y en herencia materna que limita la recombinación genética permitiendo la reconstrucción de genealogías intraespecíficas (Avice, 1996, 2004). Los marcadores mitocondriales se han venido utilizando en las últimas décadas para estudios de variabilidad genética en poblaciones de mamíferos, aves, peces, moluscos, entre otros.

Bostryx scalariformis (Broderip in Broderip & Sowerby, 1832) es una especie de molusco terrestre endémica de las lomas costeras, encontrándose principalmente en zonas arenosas (Aguilar & Arrarte, 1974; Aguilar, 1976; Ramírez, 2004). Al presente, individuos vivos de *B. scalariformis* han sido encontrados sólo en las lomas de Ancón, Pasamayo y Lachay (Ramírez, 2004). Recientemente se añadió una nueva localidad (Zona de arenales cerca al Cerro de Agua - Km 115 de la Carretera Panamericana Norte) como resultado del proyecto: "Biogeografía de la biota del desierto entre áreas de endemismo: Componentes específicos y poblacional de la biodiversidad de moluscos (Mollusca: Gastrópoda) de lomas y bases para el estudio de su diversidad genética" del Instituto de Investigación en Ciencias Biológicas "Antonio Raimondi" (ICBAR) – UNMSM. Sin embargo, de las cuatro lomas que habita, sólo Lachay tiene condición de Reserva Nacional.

El estudio de la diversidad genética en esta especie puede darnos respuestas sobre la historia de la región y sobre los patrones de variación actual entre los individuos, estas respuestas cobran importancia para la conservación de los ecosistemas de lomas. Por ello, se realizó el presente trabajo para evaluar la diversidad genética de las poblaciones de *Bostryx scalariformis* basada en polimorfismos del gen mitocondrial 16S rRNA y compararla con su distribución geográfica actual.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General:

Estimar la diversidad genética de *Bostryx scalariformis* a partir de polimorfismos del gen mitocondrial 16S rRNA, comparándola con su distribución geográfica y morfotipos, para obtener datos con implicancias en la conservación de esta especie endémica.

1.1.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la diversidad genética en *Bostryx scalariformis* usando el marcador mitocondrial 16S rRNA.
- Reconstruir la filogenia de los haplotipos del marcador 16S rRNA encontrados en *Bostryx scalariformis*.
- Evaluar la relación de la arquitectura genética de *Bostryx scalariformis* con la distribución geográfica de la especie.
- Evaluar el grado de aislamiento de las poblaciones de *Bostryx scalariformis* con un análisis de flujo génico.
- Evaluar cuantitativamente las características de la concha dentro y entre las poblaciones de *Bostryx scalariformis*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Posición taxonómica de *Bostryx scalariformis* (Broderip in Broderip & Sowerby, 1832) dentro del Phylum Mollusca

- Phylum: Mollusca
- Clase: Gastropoda
- Orden: Pulmonata
- Familia: Orthalicidae*
- Género: *Bostryx*
- Especie: *Bostryx scalariformis*

*El género *Bostryx* ha pertenecido clásicamente a la familia *Bulimulidae* (Ramírez, 2004). Sin embargo, se ha propuesto cambiar el nombre oficial de la familia que lo contiene de *Bulimulidae* a *Bulimulinae* (Breure, 1979). En la última clasificación propuesta por Bouchet y Rocroi (2005), *Bulimulidae* se convierte en subfamilia dentro de la familia *Orthalicidae*.

2.2 Aspectos generales de la especie

Bostryx scalariformis es un molusco terrestre que pertenece a la familia Orthalicidae, esta familia presenta una distribución neotropical y es característica del desierto costero del Perú, donde presenta varias áreas de endemismo. En el Perú, el género *Bostryx* es predominante dentro de esta familia (Breure, 1977).

Su distribución se restringe a la zona de arenales de las siguientes lomas de la provincia de Lima: Ancón, Pasamayo, Lachay (Ramírez, 2004) y Cerro de Agua (Ramírez, com. per.). La especie tipo fue descrita por el naturalista británico William Broderip en 1832 a partir de individuos colectados en la localidad de Ancón (Broderip & Sowerby, 1832). En 1896, Pilsbry hace un recuento de la distribución de la especie donde menciona además de Ancón a Lima y Chancay. Hidalgo (1893 - 1900) incrementa la distribución indicando que la especie es encontrada también en "Cerro Las Conchitas" y "Lomas de Pumará" en las cercanías de Lima. Estos datos

demuestran que su distribución geográfica pudo haber sido mayor que en la actualidad. Ramírez (2004) recorrió las localidades mencionadas sin encontrar ejemplares vivos en "Las Conchitas" (actualmente Villa El Salvador/Villa María del Triunfo: Zona sur de Lima) ni en "Pumará" (considerada por la investigadora como sinónimo de Lomas de Pucará también al sur de Lima).

La forma de la concha es de color blanco grisáceo y de tipo piramidal con la superficie ornamentada con costillas longitudinales regulares (Fig. 1). *B. scalariformis* presenta dos variedades o morfotipos diferenciados principalmente por el diseño de su concha, siendo las diferencias más saltantes el número, ancho y espacio de las costillas (Ramírez, 2004). Además, estas dos variedades se encuentran geográficamente aisladas, una en las lomas de Ancón y Pasamayo (costillas más finas) y la otra más al norte en la Lomas de Lachay y Cerro de Agua (costillas más espaciadas).

Se ha reportado un mayor rango de distribución geográfica de la especie (Pilsbry, 1895-1896; Hidalgo, 1893-1900), sin embargo ahora sólo se encuentran individuos vivos en las localidades arriba mencionadas. Esta disminución del rango de distribución, así como la fragmentación de las poblaciones podrían llevar a un decremento de la diversidad genética y a una disminución del potencial evolutivo de la especie (Hall *et al.*, 1996; Wilson & Provan, 2003).

2.3 El ADN mitocondrial y su uso en estudios poblacionales

Una característica propia de los eucariotas es poseer organelos, algunos de los cuales -como los cloroplastos y mitocondrias- poseen genoma propio y son capaces de replicarse autónomamente. Se ha postulado el origen de ambos organelos como producto de la endosimbiosis entre un organismo eucariota y un procariota (Margulis & Sagan, 2001). En el caso de las mitocondrias, luego de la endosimbiosis existió una transferencia de genes desde el organelo hacia el núcleo disminuyendo el tamaño de su genoma (Gray *et al.* 1999).

Figura 1. Individuos de *Bostryx scalariformis* provenientes de las localidades de Ancón (a), Pasamayo (b), Lachay (c) y Cerro de Agua (d), las cuales son los únicos lugares donde se han registrado individuos vivos. Obsérvese las diferencias en el diseño de la concha, entre los grupos de Ancón – Pasamayo y Lachay – El Agua. La escala representa: 5 mm.



El contenido génico del ADN mitocondrial en metazoos celomados es constante: Consiste en 13 genes que codifican proteínas ligadas, principalmente, a los eventos de respiración oxidativa y generación de ATP; 2 genes para la subunidad mayor y menor del RNA ribosomal y 22 genes de RNA de transferencia (Hatzoglou *et al.* 1995). El DNA mitocondrial presenta variaciones tanto en la secuencia de nucleótidos como en el orden de los genes presentes.

Los moluscos terrestres poseen una baja habilidad de dispersión permitiendo preservar en su genoma los patrones de diversidad genética y convirtiendo a estas especies en organismos ideales para el estudio filogeográfico (Pfenninger *et al.* 2003). Aunque algunas especies de moluscos terrestres tienen una distribución cosmopolita, el rango de distribución de la mayoría es restringido debido a sus requerimientos de hábitat particulares y baja dispersión. Estas características previenen a los moluscos terrestre de escapar a las condiciones cambiantes en los ecosistemas (Pfenninger & Posada, 2002). Además, las conchas son bien preservadas lo que permite conocer las distribuciones geográficas pasadas, estas cualidades los hacen candidatos para estudiar los procesos evolutivos (Pfenninger & Magnin, 2001).

El gen mitocondrial 16S rRNA (RNA de la subunidad mayor ribosomal), es un gen extremadamente importante en todos los organismos por lo que es una de las regiones del genoma mitocondrial más conservadas y su tasa de cambio evolutivo ha sido calculada para varios organismos (Chiba, 1999) lo que permite su uso en el estudio de filogenias interespecíficas, Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la alta tasa de mutación (aún mayor en moluscos) y transmisión uniparental del DNA mitocondrial permiten también su uso en el estudio de filogenias intraespecíficas. Por ello, este gen se ha convertido en uno de los principales segmentos utilizados en el estudio de poblaciones de moluscos terrestres.

Como ejemplos tenemos el estudio de Chiba (1999) que demostró la rápida evolución en las secuencias del DNA mitocondrial entre moluscos del género *Mandarina* que habitan las islas del Océano Pacífico, encontrando que la radiación adaptativa en hábitats fragmentados conlleva a una gran diferenciación de caracteres morfológicos y genéticos. Ross (1999), quien encontró una relación entre la distancia genética y

geográfica del molusco *Discus macclintocki*, además de una alta diversidad genética en una región de 4000 km² debido a la presencia de corrientes de agua que permitieron el desplazamiento de los individuos y el flujo génico entre las poblaciones; y Ramírez (2004), quien hizo el primer estudio general de la sistemática y filogeografía de moluscos terrestres de las lomas de la costa peruana, haciendo una revisión de la nomenclatura taxonómica, y encontrando patrones demográficos relacionados al ENSO.

Recientemente, se han compilado trabajos en base al análisis molecular, entre ellos del genoma mitocondrial (Lydeard & Lindberg, 2003); como ejemplo cabe citar el estudio de Hugall *et al.* (2003) sobre la filogeografía de moluscos terrestres en el bosque lluvioso australiano, con implicancias en su conservación.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

Las zonas estudiadas se ubican en la costa central del Perú, departamento de Lima (Fig. 2). Las lomas se ubican entre los 11° 20' LS y los 11° 40' LS (Tabla 1), material vivo de *B. scalariformis* sólo ha sido encontrado en:

- Lomas de Ancón: Lomas ubicadas cerca al Km 56 de Panamericana Norte (Autopista variante), de tipo arenosas y con densa neblina, predominan las formaciones de tilandsiales (Fig. 3). Coordenadas: LS 11° 43' 31,02"; LW 77° 10' 37,8'. Altitud: 400 – 800 msnm.
- Lomas de Pasamayo: Ubicada cerca al Km 65 de la Panamericana Norte (Autopista variante). Se encuentra en una zona con presencia de densa neblina (Fig. 4). En esta zona existe gran cantidad de individuos de *B. scalariformis*, asociados con la especie *Solanum multifidum* (obs. per.) entre los 400 y 600 msnm. Coordenadas: LS 11° 38' 36,2"; LW 77° 12' 11,9". Altitud: 200 – 750 msnm.
- Lomas de Lachay: El único ecosistema de lomas considerado como Reserva Nacional, lo que ha permitido la realización de varios estudios en diversidad y ecología de su biota. Se ubica en el Km 105 de la carretera Panamericana Norte (Fig. 5), *B. scalariformis* se ubica en las zonas bajas cerca a la carretera. Coordenadas: LS 11° 20' 49,2"; LW 77° 23' 02,7". Altitud: 150 – 650 msnm.
- Cerro de Agua: Zona arenosa que se encuentra en el kilómetro 115 de la carretera Panamericana Norte, debido a la humedad el paisaje se modifica radicalmente siendo aprovechado por las comunidades campesinas de lugares cercanos para ganadería (Fig. 6). Coordenadas: LS 11° 22' 17,5"; LW 77° 26' 22,6". Altitud: 200 – 400 msnm.

El área de colecta abarcó aproximadamente 50 kilómetros lineales. Las distancias lineales entre los puntos de colecta se presentan en la Tabla 2.

Figura 2. Área de estudio. (a) Las cuatro lomas se encuentran en la costa central de Perú, departamento de Lima. (b) Ancón y Pasamayo. (c) Lachay y Cerro de Agua. Modificado de Google Maps.

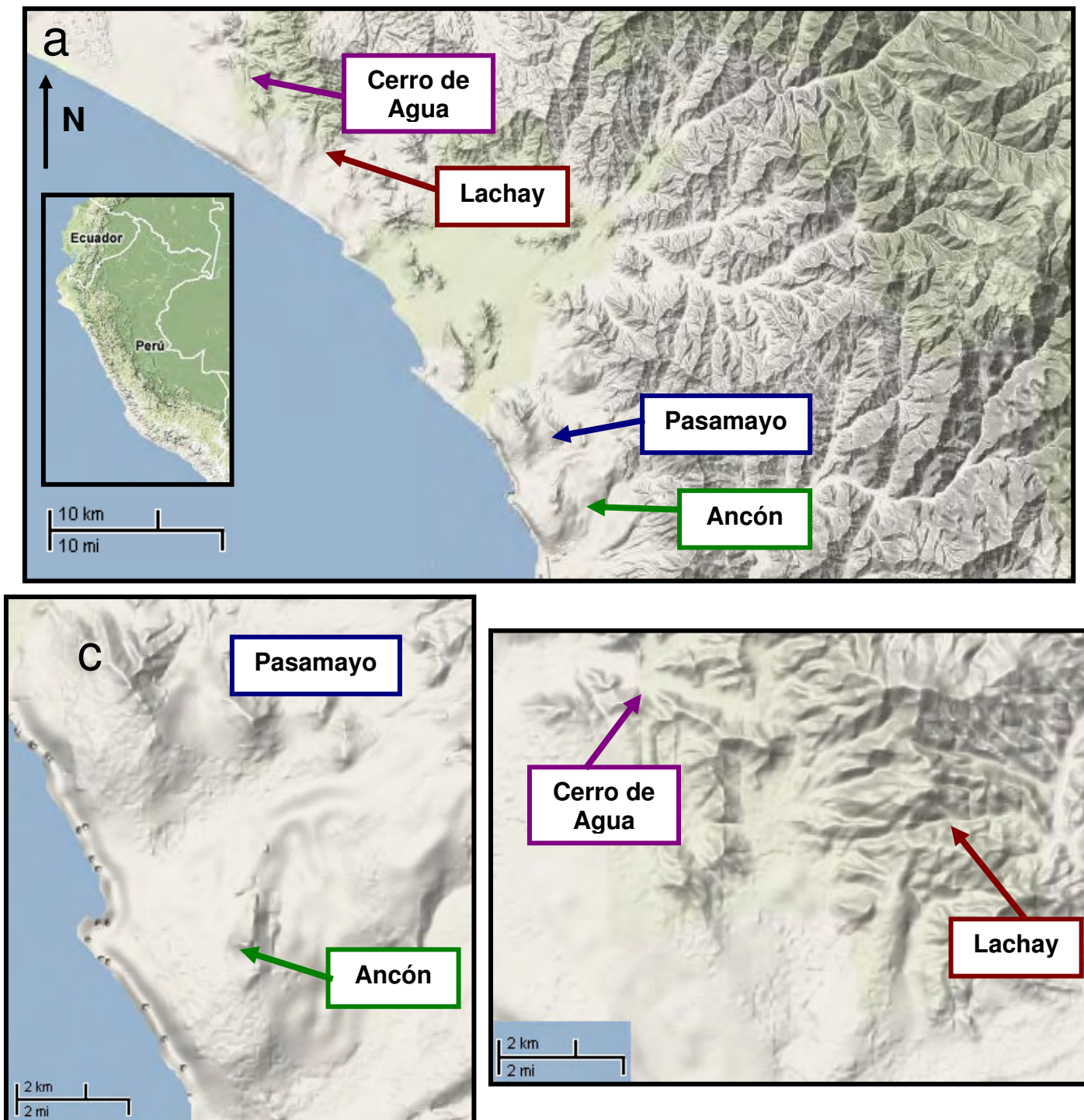


Figura 3. Lomas de Ancón: (a) Mapa de relieve, (b) tilandsiales ubicados en la zona oriental y vegetación predominante, (c) cactáceas y (d) *Tilandsia* sp. (e) Muestreo buscando entre los tilandsiales. Relieve tomado de Google Maps. Fotos: P. Romero y J. Ramirez.

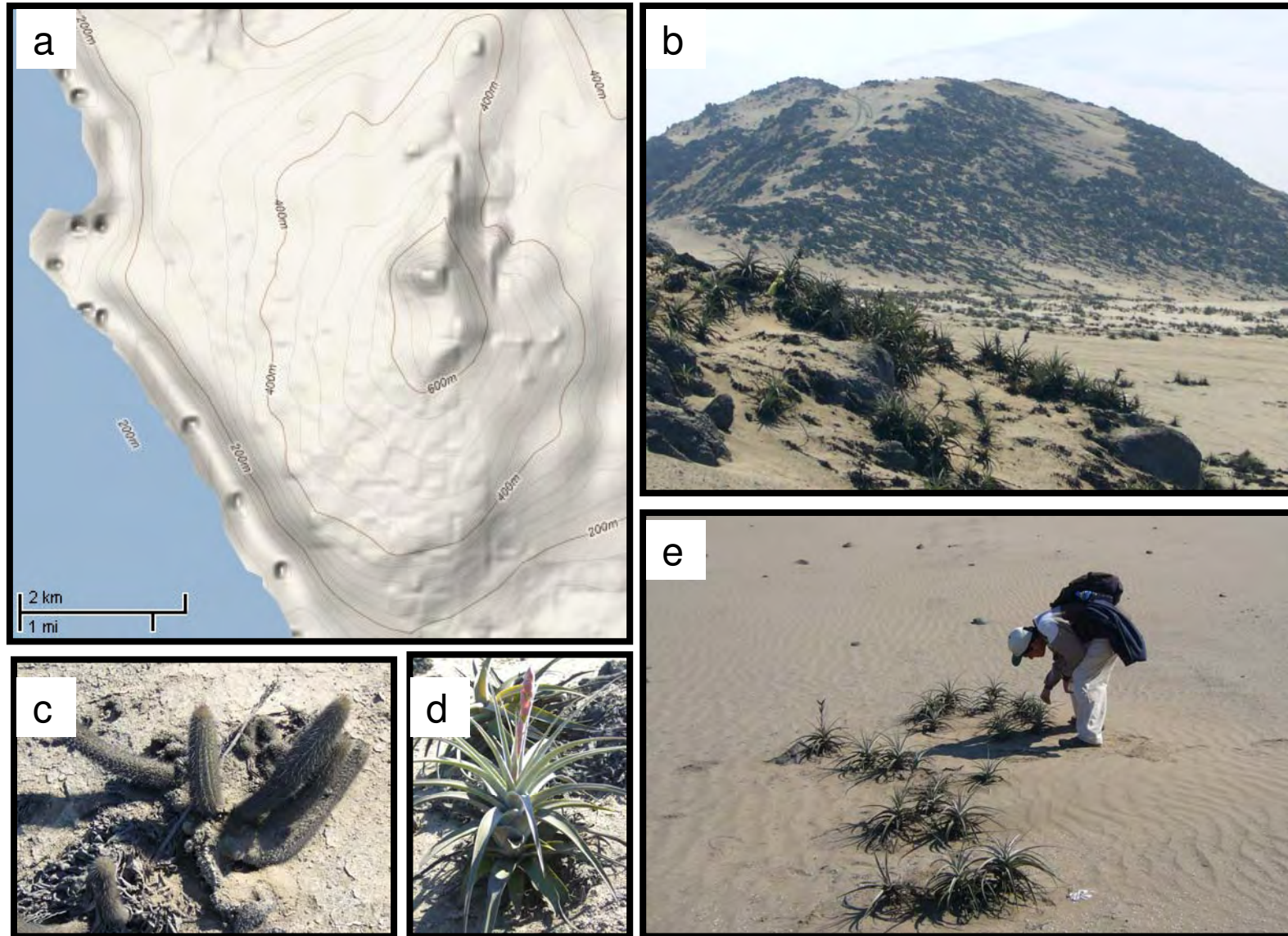


Figura 4. Lomas de Pasamayo: (a) Mapa de relieve. (b) y (c) Individuos de *B. scalariformis* asociados a las herbáceas presentes y/o vegetación seca. (d) *Solanum multifidum*, especie típica de la zona. (e) Muestreo en la vegetación herbácea cerca de la carretera. Relieve tomado de Google Maps. Fotos: P. Romero y J. Ramirez.

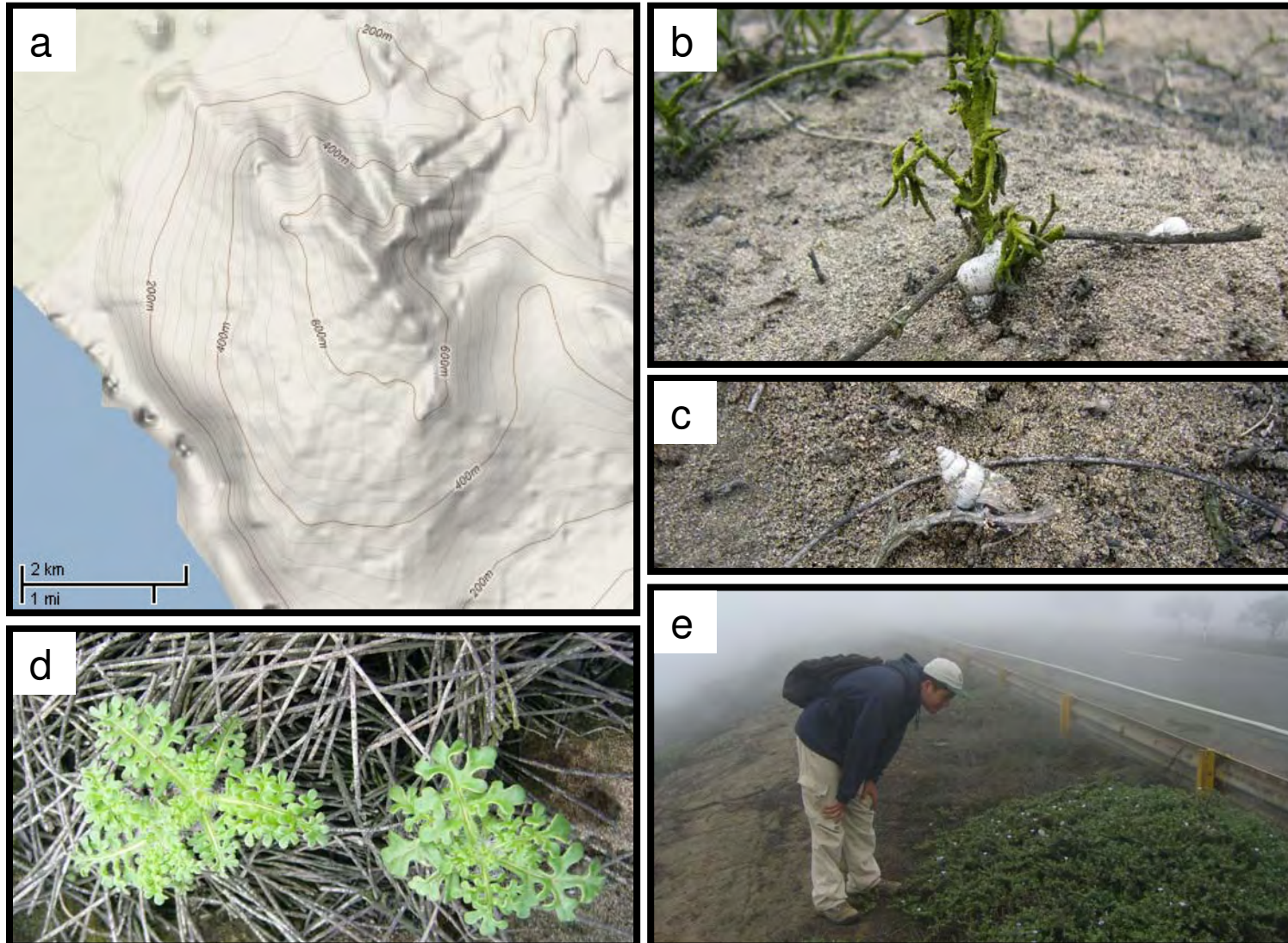


Figura 5. Lomas de Lachay: (a) Mapa de relieve. (b) Individuo de *B. scalariformis* asociado a la vegetación seca. Vegetación presente en el lugar como (c) *Nicotiana* sp. o (d) cactáceas. (e) Colecta de individuos. Relieve tomado de Google Maps. Fotos: P. Romero y V. Borda.

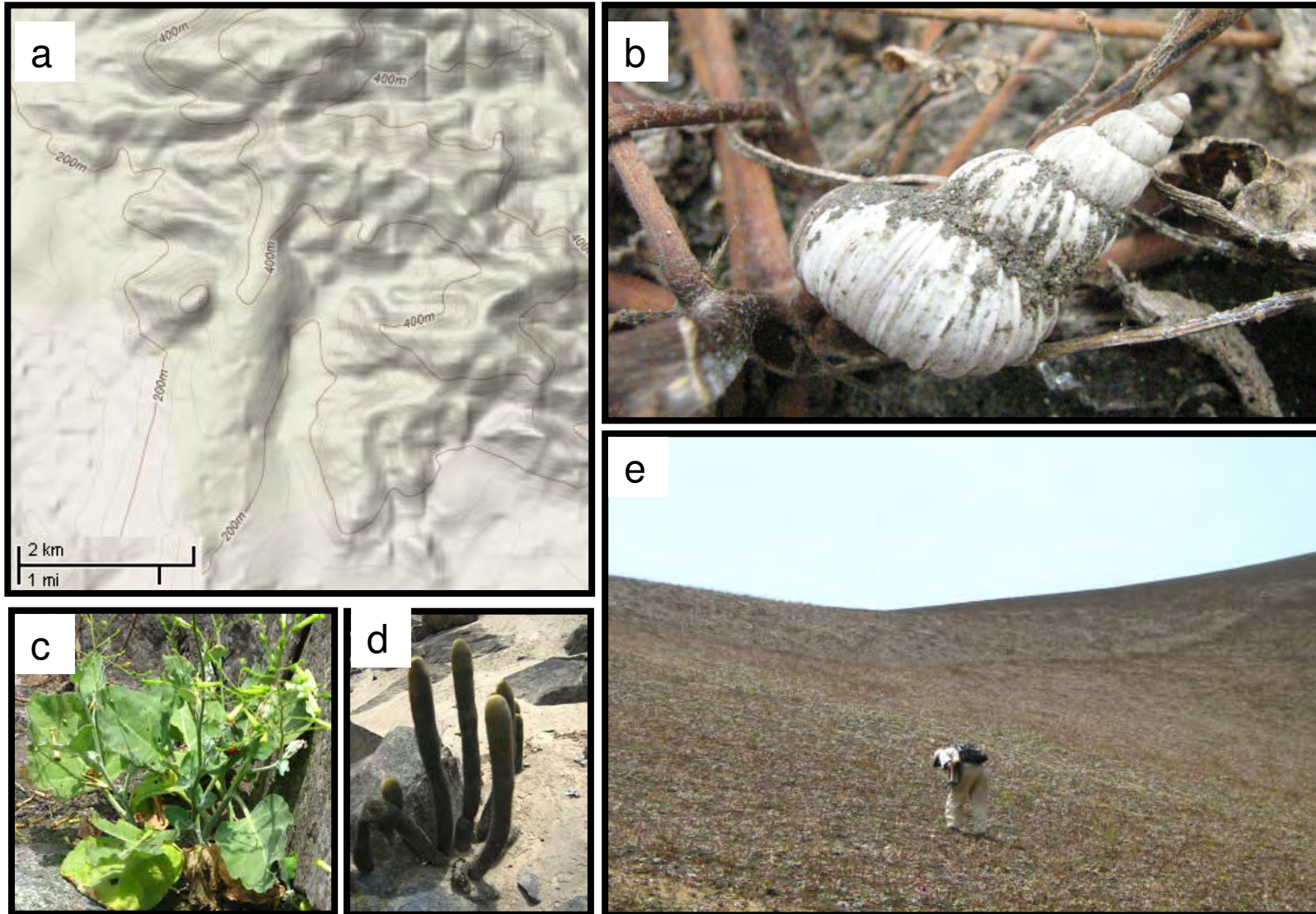
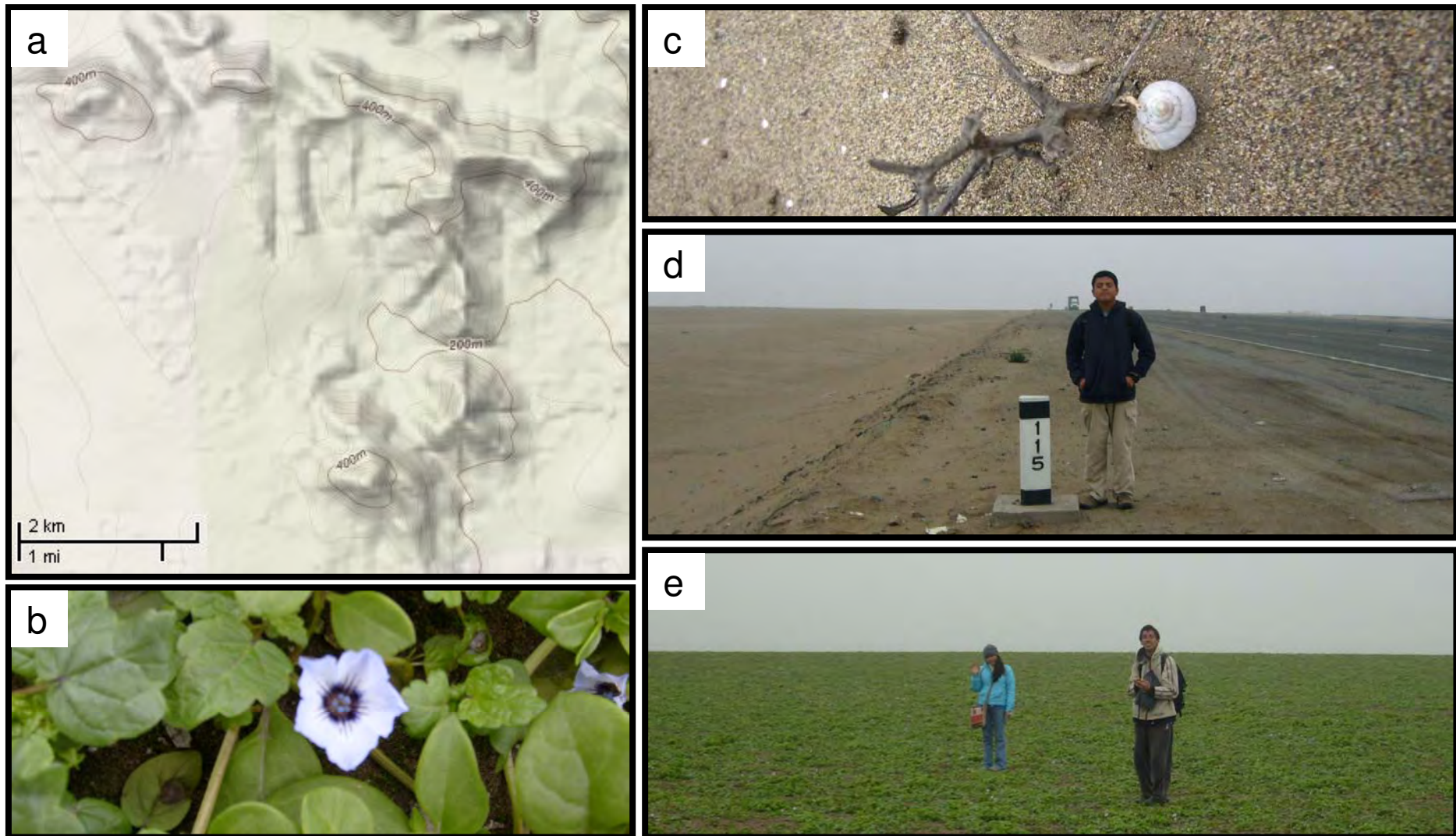


Figura 6. Lomas de Cerro de Agua. (a) Mapa de relieve. (b) Predomina la vegetación herbácea, principalmente el género *Solanum*. (c) Individuo de *B. scalariformis* asociado a la vegetación seca. La loma muestra una marcada diferencia entre la estación seca (d) y la estación húmeda (e). Relieve tomado de Google Maps. Fotos: P. Romero y J. Ramirez.



3.1.1 Clima

La zona costera de Perú y norte de Chile es uno de los desiertos más secos de la Tierra. La precipitación anual media en el desierto es de 0 - 40 mm, pero si se descartan los años de El Niño, ésta desciende a 0 - 12 mm (Noller, 1993). El clima es de tipo subtropical con abundante humedad atmosférica y ausencia de lluvias intensas. El clima de las lomas es de tipo estacional con una estación seca con mayor temperatura media (20°C, diciembre – abril) y una estación húmeda con bajas temperaturas (15°C, julio a septiembre) (Ramírez *et al.*, 2003). El paisaje es modificado por eventos El Niño que incrementan la precipitación en el verano.

3.1.2 Vegetación

La vegetación de las lomas consiste en especies anuales, el crecimiento de la vegetación ocurre durante la estación húmeda (Rundel *et al.*, 1991). La estructura de la vegetación fue presentada por Ono en 1986, modificando la clasificación propuesta por Ferreyra (1953) y clasificando a las lomas en: Lomas de herbáceas, arbustivas, de bromeliáceas (en especial de *Puya ferruginea*), de *Tillandsia*, o de cactáceas según la humedad recibida (Fig. 7).

Figura 7. Tipos de lomas costeras. La flecha indica la dirección de la brisa marina. Tomado de Ono (1986).

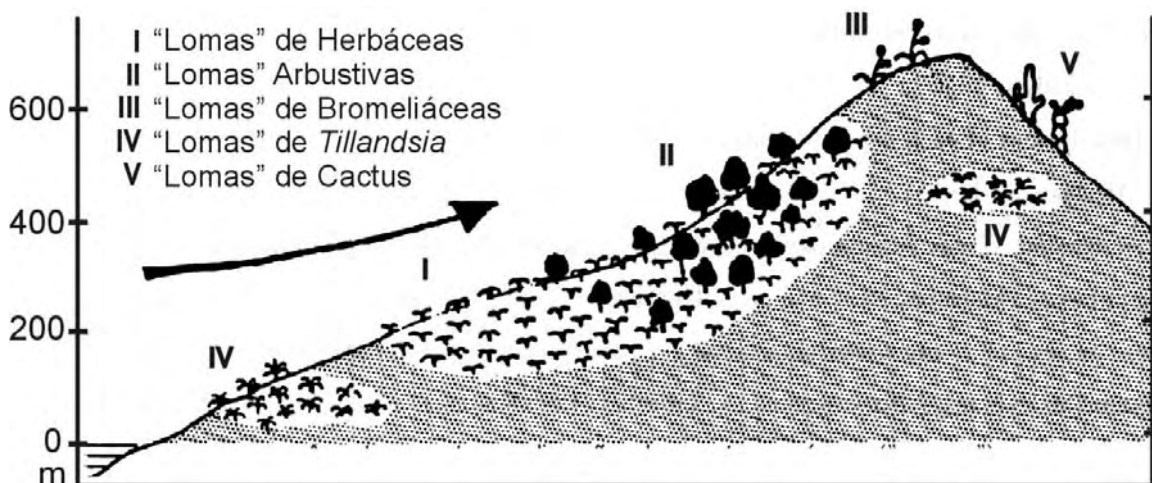


Tabla 1. Ubicación geográfica de los lugares de colecta, se muestran valores de coordenadas, altitud y distancia al mar.

	Coordenadas		Altitud (msnm.)	Distancia al mar
	LS	LW		
Ancón	11° 43' 31,02"	77° 10' 37,8'	400 - 800	1.90 km.
Pasamayo	11° 38' 36,2"	77° 12' 11,9"	200 - 750	1.03 km.
Lachay	11° 20' 49,2"	77° 23' 02,7"	150 - 650	6.57 km.
Cerro de Agua	11° 22' 17,5"	77° 26' 22,6"	200 - 400	3.97 km.

Tabla 2. Distancia lineal (en kilómetros) entre las localidades de colecta.

	Ancón	Pasamayo	Lachay	Cerro de Agua
Ancón	0.00			
Pasamayo	8.60	0.00		
Lachay	41.93	34.32	0.00	
Cerro de Agua	48.42	40.48	8.02	0.00

3.2 Análisis Morfológico

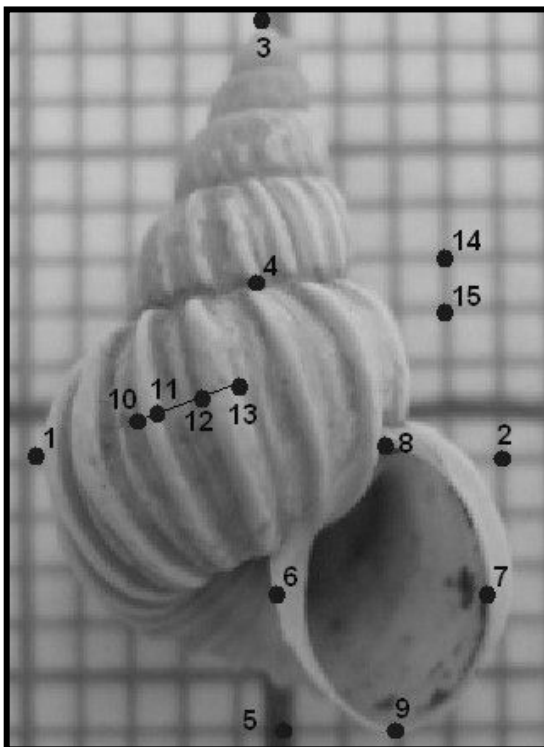
3.2.1 Colecta

Las colectas se realizaron entre septiembre de 2006 y noviembre de 2007 en las localidades de Ancón, Pasamayo, Lachay y Cerro de Agua. La colecta tuvo énfasis en individuos vivos de *Bostryx scalariformis*. Los ejemplares fueron buscados por observación directa. Los individuos colectados fueron preservados en alcohol etílico de 96%. Los especímenes colectados tanto conservados en alcohol como conchas se encuentran depositadas en el Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2.2 Morfometría

Se realizó el análisis morfométrico multivariado de 50 individuos colectados por población, 200 individuos en total. Las conchas fueron fotografiadas con una cámara digital y luego, las fotografías fueron procesadas con el programa tpsDIG 2.1 (Rohlf, 2006) en el cual se marcan los puntos de medición o "*landmarks*" de las variables utilizadas (Fig. 8): Altura de la concha, diámetro de la concha, altura de la espira, altura de la abertura, diámetro de la abertura, número de costillas en 3 mm, diámetro de la primera costilla, diámetro de la segunda costilla, distancia entre la primera y segunda costilla, y número de vueltas de la concha; en total 10 variables. El programa LMDis (Reis, 1996) se utilizó para encontrar los valores de distancia para todas las variables menos el número de vueltas. Los datos obtenidos fueron logaritmizados para linealizar su distribución. Estos datos fueron luego analizados en los programas MS Excel 2000 (Microsoft Corporation) y SPSS v. 13 (SPSS Inc.). En el SPSS se llevó a cabo dos análisis multivariados: El análisis de componentes principales (APC) y el análisis de discriminante canónico (CD).

Figura 8. Puntos de medición (*landmarks*) utilizados en el análisis morfométrico multivariado. En la figura se muestra la foto digitalizada y los puntos anotados por el programa tpsDig. En total son 15 *landmarks* utilizados. Estas ocho variables sumadas al número de costillas en 3 mm y el número de vueltas completan las diez variables utilizadas en el estudio.



Landmarks	Medida
1-2	Diámetro
3-4	Altura de la Espira
3-5	Altura
6-7	Diámetro de Abertura
8-9	Altura de Abertura
10-11	Ancho de 1º Costilla
11-12	Espacio 1º y 2º Costilla
12-13	Ancho 2º Costilla
14-15	Escala: 1 mm.

3.3 Análisis Molecular

3.3.1 Extracción de DNA total

La extracción de DNA se realizó a partir de 1-2 mm³ de tejido muscular del pie del caracol. Para la extracción y precipitación de DNA se siguió el protocolo adaptado de Ramírez (2004), el cual utiliza el método CTAB porque permite obtener buenos resultados en la amplificación por PCR al reprimir los mucopolisacáridos inhibitorios presentes en el tejido (Wade & Mordan, 2000). El protocolo es el siguiente: Las muestras de tejido son colocadas en 300µl de 100mM Tris/HCl, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB, 2% PVP 0.2% β-mercaptoetanol con 0.05mg Proteinasa K, e incubado a 60°C por 2 horas. Las proteínas son removidas utilizando 310 µl de cloroformo – alcohol isoamílico (96:4), centrifugando a 13 000 rpm por 15 minutos, y removiendo la fase acuosa, este paso se repite por una vez más. Luego, el DNA es precipitado usando 600 µl alcohol de 96% frío y 25 µl de Acetato de Amonio 3M, e incubando a -20°C por al menos 30 min y centrifugando a 13 000 rpm por 15 min. El *pellet* obtenido, es lavado en 1 ml de alcohol de 96% y luego se centrifuga a 13 000 rpm por 15 min. Finalmente, el *pellet* es secado al ambiente por 24 horas para luego ser resuspendido en 50 µl de agua bidestilada y conservado a -20 °C.

3.3.2 Amplificación de DNA

El gen mitocondrial 16S rRNA en moluscos terrestres posee alrededor de 1300 pares de bases. Se encuentra flanqueado hacia la derecha por el gen de la Citocromo Oxidasa 1 (COI), y hacia la izquierda se encuentra el gen que codifica la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa (NADH 6) (Hatzoglou *et al.*, 1995) (Fig. 9).

Un segmento de la secuencia del gen mitocondrial 16S rRNA (350 pares de bases aproximadamente) fue amplificado vía la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988).

Se utilizaron los *primers* desarrollados por Ramírez (2004):

16SF-104 (5'-GACTGTGCTAAGGTAGCATAAT-3')

16SR-472 (5'-TCGTAGTCCAACATCGAGGTCA-3')

Cada reacción fue trabajada en un volumen total de 30 µl conteniendo 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa, Solución buffer 1X, 0.2mM dNTP, 1.25mM MgCl₂, 0.2 µM de cada primer y 3 µl de DNA extraído. Los ciclos de amplificación fueron: Denaturación a 94 °C por 30 segundos, hibridación (*annealing*) de los *primers* a 48 °C por 30 segundos, y extensión a 72 °C durante 60 segundos, finalmente una extensión final a 72°C por 1 minuto. El proceso de amplificación se repite por 35 ciclos. Como control de la amplificación se utilizó 3 µl de agua destilada en vez del DNA, manteniendo tal cual los demás componentes. Cuando la reacción no fue específica y aparecieron bandas múltiples, se procedió a aumentar la temperatura de hibridación.

Figura 9. Porción del genoma mitocondrial del molusco terrestre *Albinaria coerulea*. Se muestra la posición del gen 16S rRNA (I-RNA) en relación a los genes COX1 y ND6. Modificado de la base de datos Genbank–NCBI (www.ncbi.gov). Número de Acceso (GI): NC_001761.



3.3.3 Electroforesis de DNA

Con 4 µl de la muestra amplificada y 2 µl de Azul de Bromofenol se procedió a una electroforesis submarina en gel de Agarosa al 0.8 %. Luego se tiñó el gel con Bromuro de Etidio el cual se intercala entre las hebras de DNA, observándose las bandas a la luz ultravioleta en un transiluminador. En la carga del gel se utilizaron las muestras amplificadas, la muestra control y un marcador de peso molecular GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas). La aparición de una única banda por muestra es prueba de la amplificación específica.

3.3.4 Secuenciación de DNA

Fueron seleccionados los productos de PCR que presentaron una sólo banda amplificada. El DNA amplificado fue transferido a un microtubo de 1,5 ml. Este tubo fue rotulado, sellado con *parafilm* y enviado a la compañía MACROGEN USA (Maryland - USA). MACROGEN realizó los servicios de purificación del producto de PCR (mediante el método de perlas magnéticas), y de secuenciación de DNA. Las reacciones de secuenciación, las cuales utilizaron un mínimo de 20 µl, fueron realizadas en un secuenciador automático ABI 3730xl. Se secuenciaron ambas hebras del DNA para asegurar la calidad de los datos.

3.3.5 Edición y alineamiento múltiple de secuencias

Los cromatogramas de las secuencias obtenidas fueron evaluados para corregir errores en la lectura de las secuencias mediante el programa Chromas (Technelysium PTY).

Se procedió al ensamblaje de las secuencias de la hebra molde (F) y la complementaria (R) por individuo generándose un "*contig*" o secuencia consenso. El ensamblaje se realizó mediante el software CAP3 (Huang & Madan, 1999). La secuencia consenso obtenida fue guardada en un archivo de texto simple en formato Fasta.

Al conjunto de secuencias de *B. scalariformis* obtenidas se le agregó 18 secuencias de las poblaciones de Ancón y Pasamayo obtenidas por Ramírez (2004) en el "Centro de Biología Genômica e Molecular" de la Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil). Se agregaron además secuencias de otras especies de *Bostryx* como *Bostryx sordidus* (8), *Bostryx conspersus* (1) y *Bostryx modestus* (1), que fueron obtenidas en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía, Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú) Las secuencias a utilizar fueron luego cargadas en el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), donde se realizó un alineamiento múltiple. El alineamiento múltiple consiste en la comparación de varias secuencias permitiendo encontrar sitios homólogos, este análisis es clave en el desarrollo de la investigación.

3.3.6 Caracterización de secuencias

La estimativa de frecuencia de bases fue realizada por medio del software DAMBE (Xia & Xie, 2001), aquí también se realizó la gráfica del número de transiciones y transversiones que ocurren entre cada combinación de secuencias a pares para evaluar la saturación mutacional. Se utilizó en conjunto los programas PAUP* 4.10b (Swofford, 1998) y Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) para encontrar el mejor modelo de sustitución nucleotídica que se ajuste a los datos eligiendo el modelo con el método de información de Akaike, según lo recomendado por Posada & Buckley (2004). El polimorfismo de secuencias nucleotídicas por población, incluyendo el número de sitios polimórficos (sitios variables), diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica se realizó en el programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2003), las diferencias a pares fueron estimadas en el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000).

3.3.7 Diversidad Genética

Los haplotipos fueron encontrados utilizando el programa DNAsp (Rozas *et al.* 2003). Los valores de diversidad genética (H) y nucleotídica (Pi) se obtuvieron mediante el software DNAsp. La distancia genética dentro y entre cada población fue calculada con el programa Arlequin.

3.3.8 Análisis filogenéticos

Los análisis de distancia genética y búsqueda de sitios conservados, variables y filogenéticamente informativos se realizaron con el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007).

Los análisis filogenéticos de los haplotipos encontrados se realizaron con varios métodos de construcción de árboles. El método de distancia Neighbour Joining (NJ) se realizó en el programa MEGA, incluyendo a las posiciones con transiciones y transversiones, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2 parámetros, y seleccionando la opción de eliminar los *gaps* en las comparaciones a pares. La evaluación de la topología encontrada se realizó mediante el análisis de *bootstrap* el cual consiste en un remuestreo aleatorio de las secuencias obtenidas y permite obtener un nivel de confianza para las hipótesis presentada (Felsenstein, 1985).

El análisis de Máxima Parsimonia (MP) se realizó en el programa PAUP* considerando a los gaps como un quinto estado. La evaluación de la topología encontrada se realizó con un *bootstrap* de 1000 réplicas. El análisis de Máxima Verosimilitud (ML) se realizó también en PAUP* según los datos propuestos por el Modeltest y usando el modelo de sustitución nucleotídica K81. La evaluación del soporte de los clados se realizó con 100 réplicas de *bootstrap* debido al esfuerzo computacional necesario para la obtención del árbol.

El análisis bayesiano (BA) se realizó utilizando el programa Mr. Bayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001) utilizando los parámetros propuestos por el Modeltest y evaluando las topologías mediante el algoritmo *Metropolis Coupled Monte Carlo Markov Chain* (MCMCMC), utilizando 2 cadenas de Markov con 1 millón de generaciones cada una.

La observación de los resultados se realizó mediante la opción Tree Explorer para los resultados de distancias (NJ) en MEGA, y utilizando el software TreeView (Page, 1996) para los árboles obtenidos con el PAUP* (NJ, MP, ML). En el caso del análisis bayesiano se observó primero la distribución de probabilidades de los árboles para luego realizar un *burning* (eliminando algunas hipótesis) de 3000 árboles, el consenso de los árboles restantes (cuya probabilidad es la más alta) se observó de igual forma con la aplicación TreeView. Para el análisis filogenético se utilizó como grupos externos a *Bostryx sordidus*, *Bostryx modestus* y *Bostryx conspersus* según lo propuesto por Ramírez (2004).

3.3.9 Networks

El análisis de filogenia intraespecífica utilizando "*networks*" o redes de haplotipos fue realizado con el programa NETWORK (Bandelt *et al.*, 1999) con el algoritmo "median joining" sólo para las secuencias del gen mitocondrial 16S rRNA obtenidas en *B. scalariformis*.

3.3.10 Análisis de estructura poblacional

En el programa Arlequín se realizó la evaluación de diferenciación poblacional y flujo génico mediante el cálculo del estadístico F_{st} a partir de los datos de haplotipos. Además, se utilizó el Arlequín para evaluar la estructura poblacional dentro y entre los grupos de morfotipos con el test de AMOVA.

3.3.11 Patrones demográficos

Los estadísticos resumen: Promedio de diferencias a pares (k), sitios polimórficos (s) y diversidad nucleotídica (π) fueron calculados con el DNAsp, estos valores permiten tener una idea de la diversidad genética en las secuencias, así como de los parámetros de crecimiento poblacional. Para evaluar si existió una expansión demográfica súbita en las poblaciones se calculó la distribución de diferencias a pares de las secuencias ("*mismatch distribution*") (Rogers & Harpending, 1992), y se utilizó el test F_s de F_u . La significancia estadística del F_s de F_u fue evaluada por una simulación de coalescencia con 10000 permutaciones.

3.3.12 Tiempos de Divergencia

La estimación del tiempos de divergencia se realizó en el programa MEGA a partir de un árbol NJ previamente linearizado (Takezaki *et al.*, 1995) y con el supuesto del reloj molecular. Como aún no se conoce la tasa de mutación para el genoma mitocondrial de *Bostryx*, se estimó una tasa de divergencia intermedia para moluscos terrestres (Chiba, 1999; Pfenninger & Posada, 2002; Pfenninger *et al.* 2003; Ramírez, 2004) de 0.06 sustituciones por sitio por millón de años.

4. RESULTADOS

4.1 Análisis Morfométrico

La evaluación de la variación intra e interpoblacional del diseño de la concha de *Bostryx scalariformis* fue realizada con base en 10 variables: Altura, Diámetro, altura de la espira, altura de la abertura, diámetro de la abertura, diámetro de la primera costilla, espacio entre la primera y segunda costilla, diámetro de la segunda costilla, número de costillas en 3 mm y número de vueltas (Tabla 3). Se realizaron dos análisis: Análisis de componentes principales y discriminantes canónicos.

4.1.1 Descripción de los datos morfométricos

Se obtuvieron medidas de las diez variables para 200 individuos de *B. scalariformis* – 50 por cada población. El análisis de los datos da un primer alcance de las diferencias entre los morfotipos que habitan Ancón-Pasamayo y Lachay-Cerro de Agua (Tabla 3). Los valores medios más resaltantes se describen a continuación:

Las poblaciones de Pasamayo y Ancón poseen un mayor número de costillas (entre 3 y 14 por cada 3 mm.), las costillas son más finas y con un menor espacio entre ellas. Pasamayo presentó mayores valores en promedio de altura, longitud de la espira, número de costillas y número de vueltas.

El morfotipo que habita Lachay y Cerro de Agua posee una menor cantidad de costillas (entre 2 y 5 por cada 3 mm), las costillas son gruesas y con un mayor espacio entre ellas. La población de Lachay presentó los valores promedio más altos de número de vueltas; la población de Cerro de Agua presentó mayores valores promedio en el diámetro de la concha, altura y diámetro de la abertura.

Tabla 3. Valores mínimo, máximo, media y desviación estándar para las variables utilizadas en el análisis morfométrico de *Bostryx scalariformis*. D.E: Desviación Estándar.

ANCON	Min.	Máx.	Media	D.E.
Altura	10.15	22.67	13.57	2.50
Diámetro	7.19	17.78	9.59	1.97
Altura abertura	4.44	11.00	6.00	1.18
Diámetro abertura	3.32	9.17	4.60	1.02
Numero de vueltas	5.00	6.50	5.69	0.39
Longitud de Espira	2.82	6.95	4.37	0.94
1º Costilla	0.14	0.42	0.28	0.07
Espacio 1º-2º costilla	0.06	1.73	0.40	0.29
2º Costilla	0.10	0.51	0.28	0.09
Numero de costillas	3.00	11.00	6.82	1.91
PASAMAYO	Min.	Máx.	Media	D.E.
Altura	11.82	23.18	15.45	2.19
Diámetro	8.00	15.35	10.53	1.63
Altura abertura	4.09	9.94	6.58	1.12
Diámetro abertura	3.34	7.90	5.13	0.86
Numero vueltas	5.30	6.70	6.06	0.32
Longitud de Espira	3.35	8.46	4.88	0.85
1º Costilla	0.08	0.53	0.24	0.10
Espacio 1º-2º costilla	0.13	0.47	0.26	0.09
2º Costilla	0.06	0.47	0.24	0.09
Numero de costillas	4.00	14.00	7.70	2.24
LACHAY	Min.	Máx.	Media	D.E.
Altura	8.18	20.23	12.58	2.30
Diámetro	5.27	12.59	8.30	1.54
Altura abertura	2.57	8.03	5.05	1.16
Diámetro abertura	2.71	6.86	4.03	0.81
Numero de vueltas	5.10	6.60	5.71	0.37
Longitud de Espira	2.56	6.96	4.37	0.89
1º Costilla	0.24	0.89	0.46	0.14
Espacio 1º-2º costilla	0.31	0.99	0.69	0.18
2º Costilla	0.27	1.02	0.48	0.14
Numero de costillas	2.00	4.00	2.90	0.61
CERRO DE AGUA	Min.	Máx.	Media	D.E.
Altura	8.80	23.29	14.99	3.09
Diámetro	6.41	16.08	11.12	2.40
Altura abertura	4.74	10.91	7.28	1.55
Diámetro abertura	3.28	7.99	5.47	1.14
Numero de vueltas	4.60	6.30	5.65	0.38
Longitud de Espira	2.25	7.32	4.22	0.99
1º Costilla	0.22	0.95	0.48	0.15
Espacio 1º-2º costilla	0.33	0.99	0.62	0.14
2º Costilla	0.15	0.78	0.51	0.15
Numero de costillas	2.00	5.00	2.98	0.74

4.1.2 Análisis de Componentes Principales

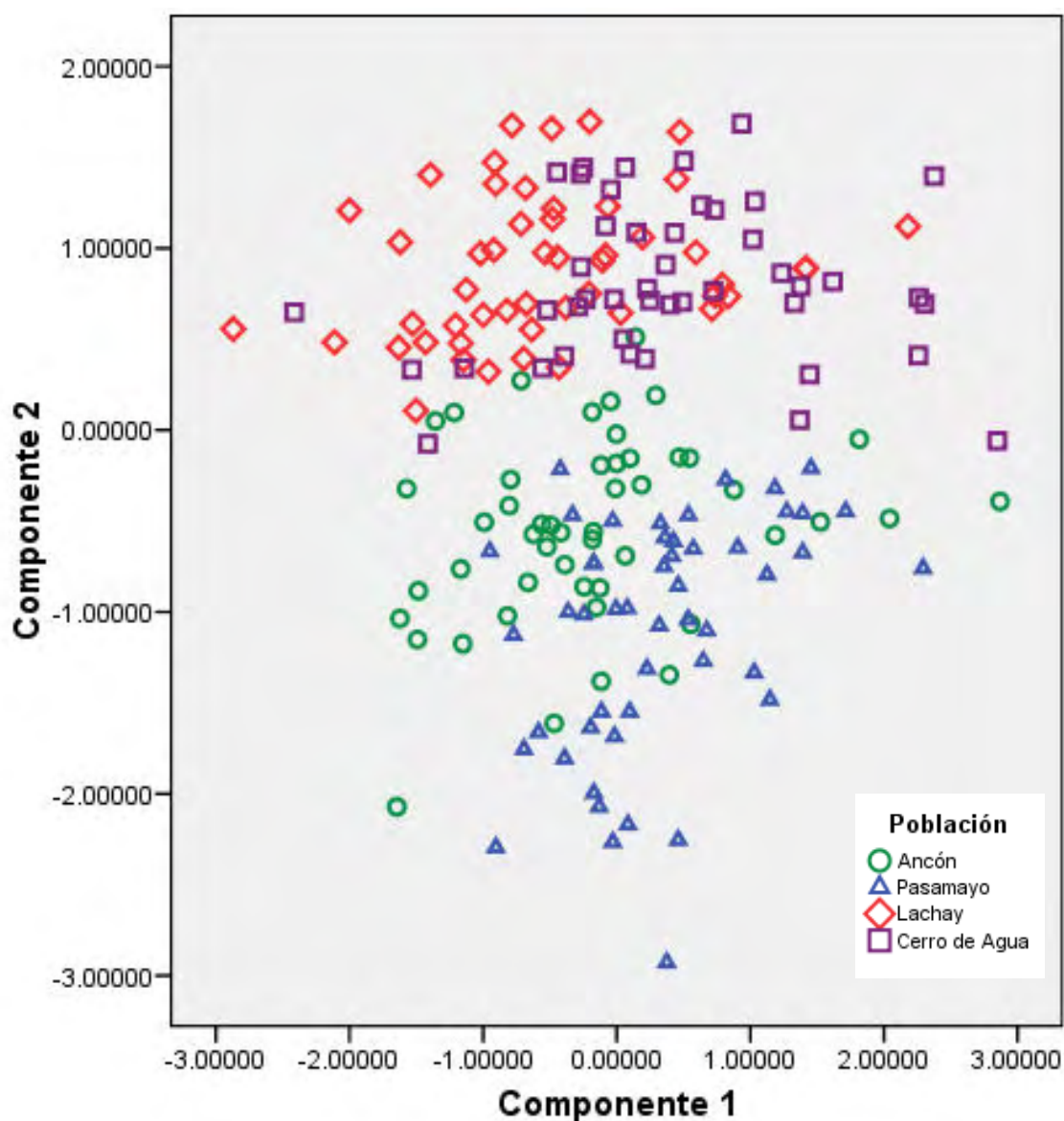
En el Análisis de componentes principales (APC), las dos primeras componentes explican el 77.72% de la variación total (Tabla 4). La primera componente fue la principal responsable de la variación (45.46%) contribuyendo primordialmente las variables de los valores correspondientes al tamaño de la concha como la altura (0.969) o el diámetro (0.960). En la segunda componente (32.33%), el número (-0.902) y ancho de las costillas surgen como principales responsables de la variación encontrada. El análisis de componentes principales explica la variabilidad del conjunto total de datos sin asignar grupos previamente. La componente 1 implica una gran variación en el tamaño de la concha en los individuos de *B. scalariformis* (presencia de individuos grandes y pequeños). La componente 2 demuestra las diferencias entre la ornamentación de la concha encontrada dentro de las poblaciones (diseño de las costillas).

Tabla 4. Análisis de Componentes Principales. Coeficientes de variación para las 10 variables utilizadas para las cuatro poblaciones de *Bostryx scalariformis*. Un mayor valor absoluto indica una mayor responsabilidad en la variación encontrada.

Variables	Componentes Principales			
	1	2	3	4
Altura	0.969	-0.161	0.009	-0.032
Diámetro	0.960	-0.079	-0.204	0.021
Altura de la Abertura	0.904	-0.064	-0.313	0.108
Diámetro de Abertura	0.914	-0.093	-0.275	0.056
Número de Vueltas	0.506	-0.384	0.668	0.032
Altura de la Espira	0.749	-0.237	0.446	-0.092
Ancho de 1º Costilla	0.254	0.868	0.036	-0.271
Espacio 1º y 2º Costillas	0.098	0.813	0.166	0.533
Ancho 2º Costilla	0.336	0.870	-0.005	-0.186
Número de costillas	-0.169	-0.902	-0.155	0.041
Porcentaje explicado de variación	45.46%	32.34%	9.14%	4.19%

Gráficamente, se observa que la componente 2 es capaz de diferenciar a las poblaciones de los morfotipos (Pasamayo – Ancón y Lachay – Cerro de Agua). Los morfotipos se diferenciaron principalmente por la ornamentación de la concha (Fig. 10). Los valores presentes en la componente 2 (valores positivos) indican un mayor diámetro y espacio entre las costillas para el morfotipo Lachay - Cerro de Agua, y el menor valor negativo (-0.902) implica que estas poblaciones poseen un menor número de costillas con respecto a Pasamayo – Ancón.

Figura 10. Análisis de Componentes Principales en las poblaciones de *Bostryx scalariformis*. Los valores representan datos normalizados que fueron comparados contra las componentes con mayor responsabilidad en la variación. Componente 1 (tamaño) y Componente 2 (ornamentación).



4.1.3 Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas

En el Análisis de funciones discriminantes canónicas (AFDC), las dos primeras funciones explican el 96,30% de la variación (Tabla 5). En la función 1 (82.70%) se observa que las mayores responsables de la variación, las relacionadas con la ornamentación de la concha (número y ancho de costillas). En la función 2 (13.60%), la mayor responsable de la variación está relacionada con el tamaño (altura y diámetro de la abertura). En general, los resultados concuerdan con el análisis de componentes principales.

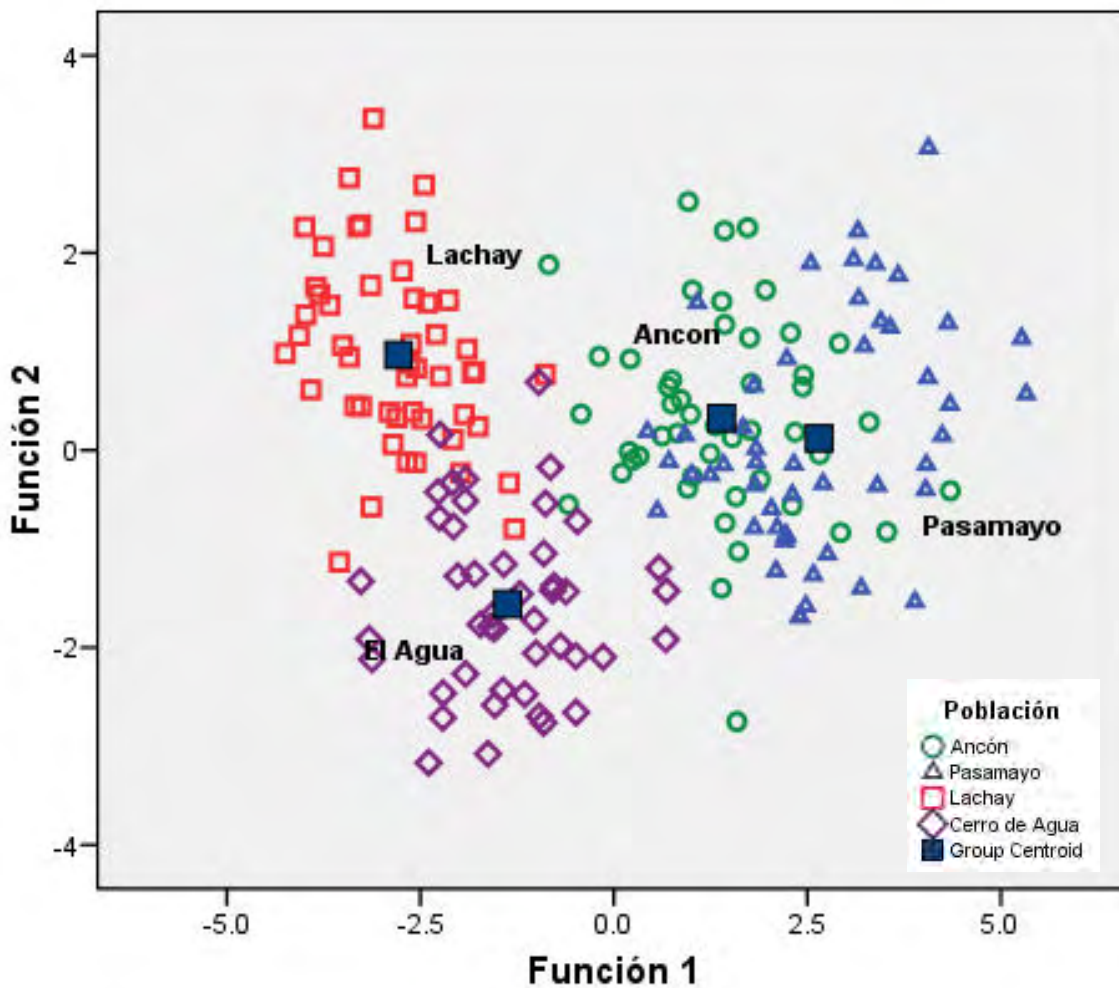
Tabla 5. Análisis de Funciones Discriminantes Canónicas en las poblaciones de *Bostryx scalariformis*. Coeficientes de variación para las 10 variables utilizadas.

Variables	Funciones Discriminantes		
	1	2	3
Altura	0.148	-0.278	-0.448
Diámetro	0.149	-0.491	-0.246
Altura de la Abertura	0.145	-0.610	-0.175
Diámetro de Abertura	0.132	-0.521	-0.308
Número de Vueltas	0.149	0.150	-0.606
Altura de la Espira	0.104	0.169	-0.387
Ancho de 1º Costilla	-0.404	-0.255	-0.034
Espacio 1º y 2º Costillas	-0.480	-0.168	0.073
Ancho 2º Costilla	-0.416	-0.237	0.001
Número de costillas	0.723	0.311	0.423
Porcentaje explicado de variación	82.70%	13.60%	3.70%

En el caso del AFDC, este análisis compara las diferencias entre poblaciones asignadas previamente disminuyendo la variación intrapoblacional y aumentando la variación entre poblaciones. Por ello, observamos más diferencias entre las poblaciones de los morfotipos de *B. scalariformis*. La función 1 (ornamentación) separa a ambos grupos. Valores positivos más altos en la Función 1 para Ancón-Pasamayo muestran la presencia de un mayor número de costillas en sus conchas, los valores negativos más bajos indican un menor tamaño entre sus costillas y un menor espacio entre ellas. En la Función 2 observamos que el grupo de Lachay presenta individuos con la abertura más pequeña (Fig. 11). El análisis es capaz de diferenciar a las poblaciones del morfotipo Lachay-Cerro de Agua por diámetro de la concha (mayor diámetro de la concha y más cantidad de vueltas para los individuos de Cerro de Agua en comparación con Lachay).

En general, las poblaciones de los morfotipos presentan características únicas en el diseño de la concha, que permiten distinguir a ambas en un análisis morfológico.

Figura 11. Análisis de Discriminantes Canónicos en las poblaciones de *Bostryx scalariformis*. Los valores representan datos normalizados que fueron comparados contra las funciones con mayor responsabilidad en la variación. Función 1 (ornamentación), Función 2 (forma de la abertura).

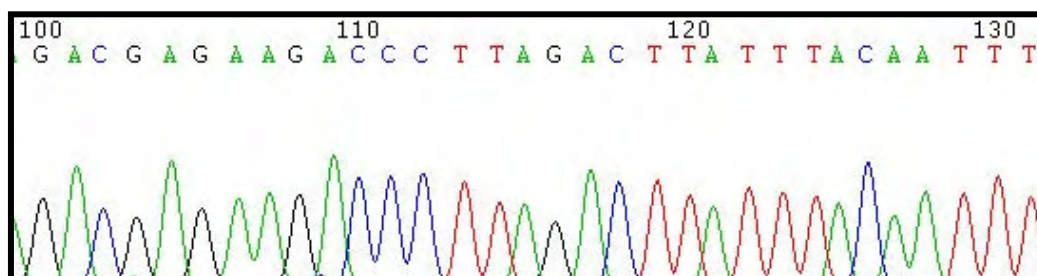


4.2 Análisis Molecular

4.2.1 Descripción de las secuencias obtenidas

En total se consiguió la amplificación de 36 individuos de *B. scalariformis*: 6 de Ancón, 13 de Pasamayo, 7 de Lachay y 10 de Cerro de Agua. A este conjunto de datos preliminares se agregaron secuencias obtenidas por Ramírez (2004) como se describe en Materiales y Métodos. Las secuencias resultaron inmejorables y no presentaron problemas de identificación de bases (Fig. 12).

Figura 12. Porción del cromatograma obtenido luego de la secuenciación del gen mitocondrial 16S rRNA para un individuo de *Bostryx scalariformis* de la población de Ancón.



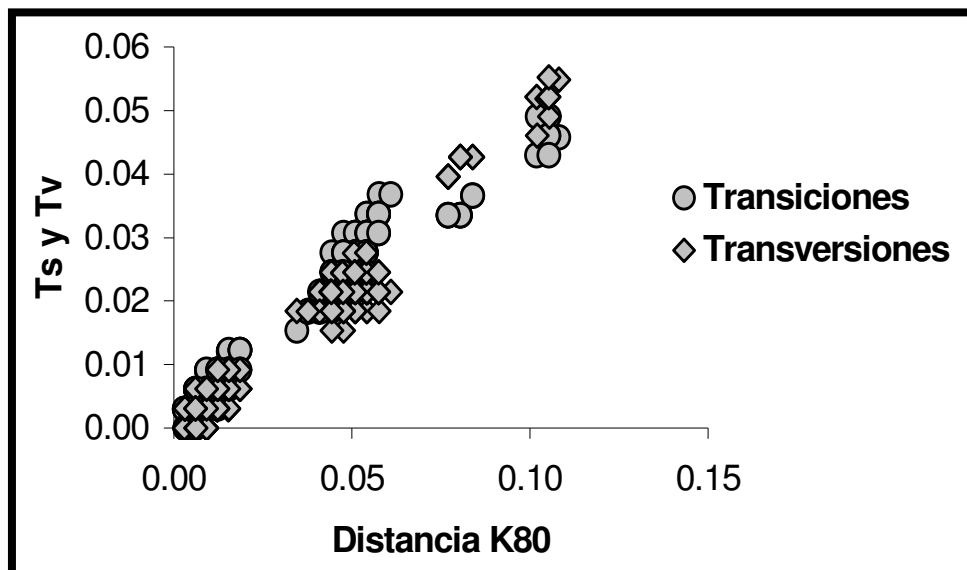
Las poblaciones de Lachay y Cerro de Agua presentaron una similitud en la frecuencia de bases, esta similitud se observa en menor grado en las poblaciones de Ancón y Pasamayo (Tabla 5). En todas las secuencias existe un exceso de AT (70%) con respecto a GC (30%).

Tabla 6. Frecuencia de bases nitrogenadas para cada población de *Bostryx scalariformis*. Longitud = Longitud promedio de secuencias por población, N = Número de secuencias.

	T	C	A	G	Longitud	N
Ancón	34.70	11.60	34.20	19.50	327.70	14
Pasamayo	33.80	11.60	35.40	19.10	327.80	20
Lachay	35.90	11.10	34.50	18.50	330.90	7
Cerro de Agua	35.70	11.40	34.50	18.40	331.00	10
Promedio	35.03	11.43	34.65	18.88	329.35	

En el programa DAMBE se evaluó el grado de saturación de las mutaciones encontradas (Fig. 13). Las transiciones y trasversiones tienen una distribución similar dentro de las secuencias y aun no presentan un grado evidente de saturación.

Figura 13. Transiciones y tranversiones comparadas contra las distancias a pares entre las secuencias de *B. scalariformis*. Ts=Transiciones (círculos), Tv=Tranversiones (rombos). El modelo de distancia utilizado fue el de Kimura 2-Parámetros (K80).



4.2.2 Alineamiento múltiple de secuencias

El alineamiento múltiple de las 61 secuencias utilizadas resultó en 348 sitios alineados, observándose la presencia de "indels" (ocurrencia de un evento de inserción o deleción dentro de la secuencia nucleotídica). El alineamiento presentó 224 sitios conservados, 111 posiciones variables y 55 sitios informativos, estos últimos se muestran en la Tabla 7.

La primera porción del alineamiento muestra un alto grado de conservación (posiciones 1–62) siendo las primeras 20 posiciones correspondientes al sitio de hibridación del primer 16S-F104. El primer "gap" aparece en la posición 63 y se debe a una inserción de guanina (G) en la especie *Bostryx conspersus* (Fig. 14). A lo largo del alineamiento se observó que tanto *B. conspersus* como *B. modestus* fueron los principales causantes de formación de gaps.

La mayoría de individuos de Ancón presenta mutaciones comunes con un grupo de 13 individuos de Pasamayo: Las transiciones T→C en la posición 315; A→G en los sitios 177, 211, y 248; y G→A en 127. La transversión A→T en las posiciones 256 y 278; y T→A en el sitio 92, además de C→G en la posición 250. Además, sólo los individuos de Ancón comparten una timina en la posición 126 y una citosina en el sitio 252. Dos individuos de Ancón comparten una adenina en la posición 48. En total presentan 12 mutaciones compartidas.

Las poblaciones de Lachay y Cerro de Agua poseen mutaciones compartidas que lo diferencian de los demás grupos. Por ejemplo, la presencia exclusiva para este grupo de pirimidinas en la posición 70, 128 y citosina en el sitio 129. Además provocan la formación de un *gap* entre los sitios 179 y 181 al poseer un triplete de timinas de más (Figura 15).

La última sección del alineamiento también es bastante conservada, y el extremo final corresponde al sitio de hibridación del *primer* 16SF-472 (posiciones 325 - 348) (Fig. 16).

Figura 15. Porción central del alineamiento múltiple de secuencias. Los individuos de Lachay y Cerro de Agua provocan la formación de un *gap* debido a la inserción de timinas (TTTT). La flecha indica la inserción.

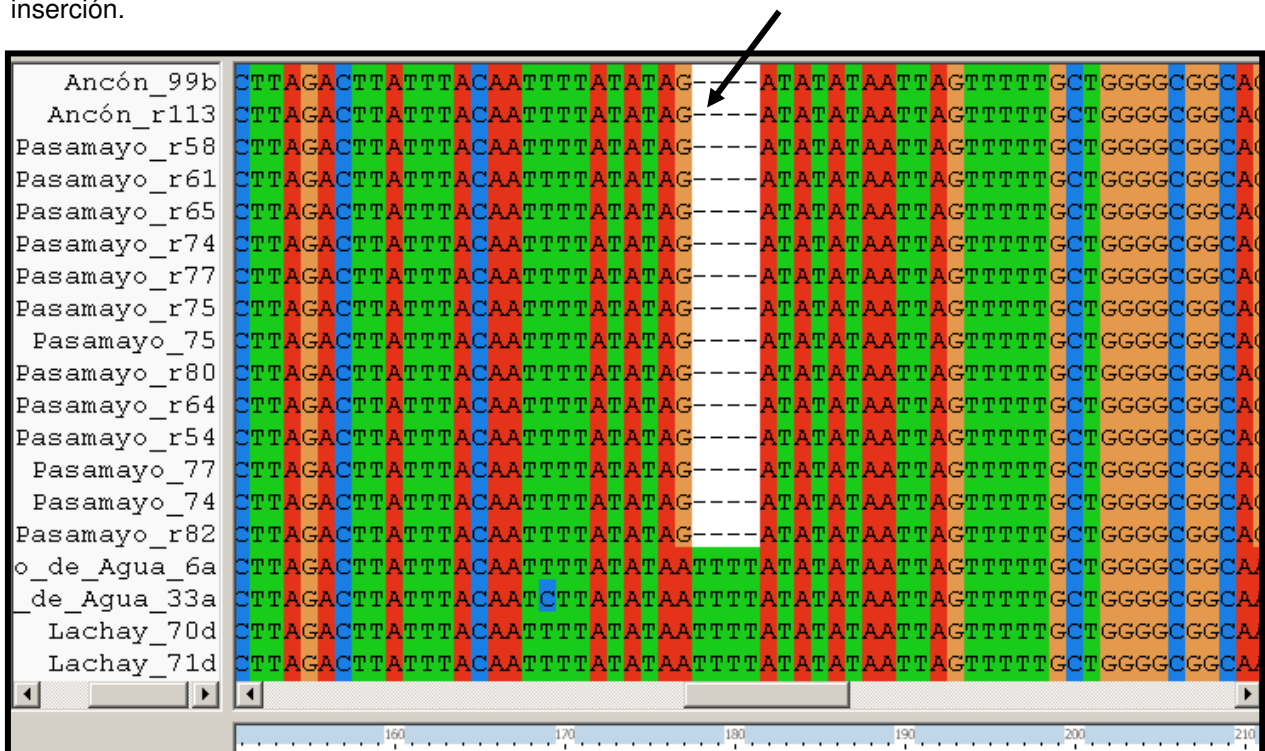
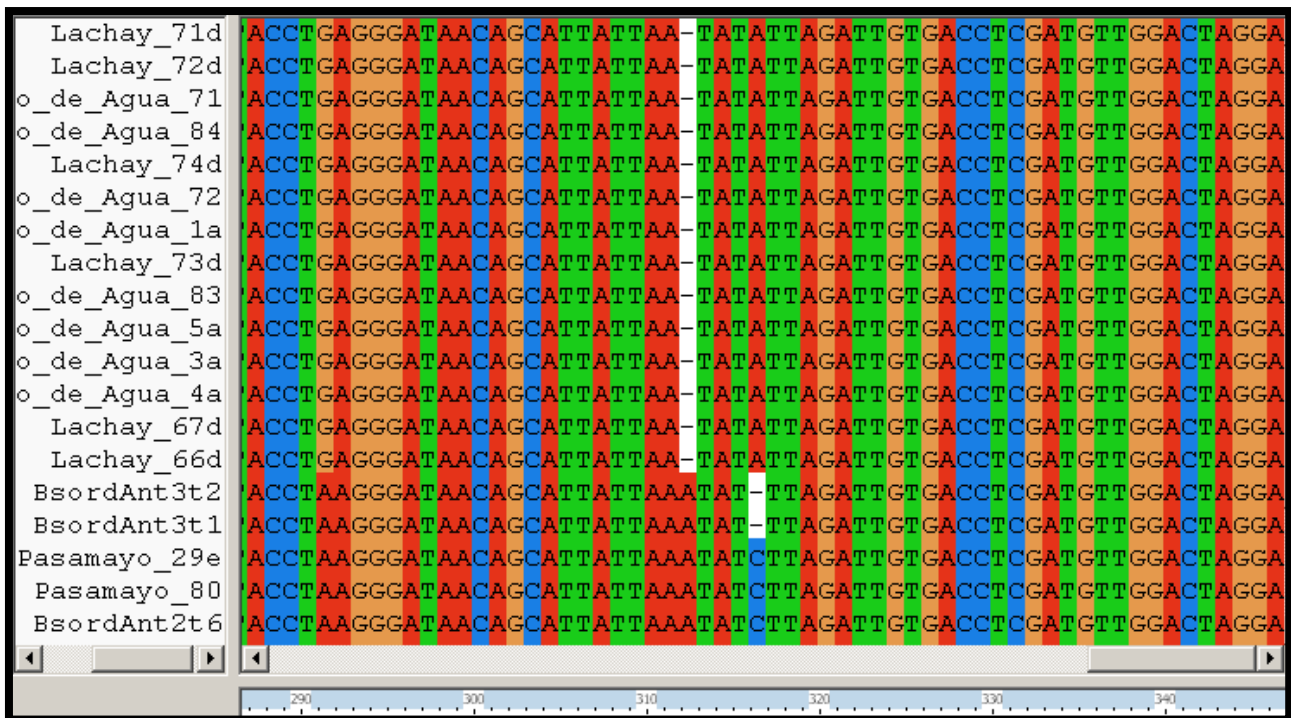


Tabla 7. Sitios polimórficos informativos al analizar el conjunto total de secuencias del gen mitocondrial 16S rRNA, obtenidas de *B. scalariformis*, *B. sordidus*, *B. modestus* y *B. conspersus*.

Individuo	Haplo tipo	1 1																												
		4 8	6 2	6 6	6 9	7 0	7 1	7 2	8 4	8 5	8 7	9 2	9 4	9 5	0 7	0 6	2 7	2 8	2 9	3 0	3 2	3 4	6 8	7 3	7 4	7 5	7 7	7 9	8 4	
1 Ancón_51a	H9	A	T	A	G	A	A	T	T	G	C	A	G	A	G	-	A	A	T	G	A	T	T	T	A	T	G	-	A	
Ancón_96b	H9
Ancón_r105	H10	T	T
Ancón_98b	H11	T	T
Ancón_r106	H10	T	T
Ancón_r104	H10	T	T
Ancón_100b	H10	T	T
Ancón_r107	H10	T	T
Ancón_r110	H10	T	T
10 Ancón_r109	H10	T	T
Ancón_r112	H10	T	T
Ancón_94b	H10	T	T
Ancón_99b	H10	T	T
Ancón_r113	H10	T	T
Pasamayo_r58	H12	T	G	.	C	A
Pasamayo_r61	H12	T	G	.	C	A
Pasamayo_r65	H12	T	G	.	C	A
Pasamayo_r74	H13	T	G	.	C	.	.	.	T	A
Pasamayo_r77	H14	T	G	.	C	A
20 Pasamayo_r75	H14	T	G	.	C	A
Pasamayo_75	H14	T	G	.	C	A
Pasamayo_r80	H14	T	G	.	C	A
Pasamayo_r64	H14	T	G	.	C	A
Pasamayo_r54	H14	T	G	.	C	A
Pasamayo_77	H14	T	G	.	C	A
Pasamayo_74	H15	T	G	A
Pasamayo_r82	H16	T	G	A
Cerro_de_Agua_6a	H1	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Cerro_de_Agua_33a	H2	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
30 Lachay_70d	H3	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Lachay_71d	H3	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Lachay_72d	H3	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Cerro_de_Agua_71	H3	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Cerro_de_Agua_84	H3	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Lachay_74d	H3	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Cerro_de_Agua_72	H3	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Cerro_de_Agua_1a	H3	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Lachay_73d	H4	T	.	.	.	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Cerro_de_Agua_83	H5	T	.	.	.	T	T	A	G	C	C	A	T	.	
40 Cerro_de_Agua_5a	H6	T	.	.	.	C	T	A	G	T	C	A	T	.	
Cerro_de_Agua_3a	H6	T	.	.	.	C	T	A	G	T	C	A	T	.	
Cerro_de_Agua_4a	H6	T	.	.	.	C	T	A	G	T	C	A	T	.	
Lachay_67d	H7	T	T	A	G	T	C	A	T	.	
Lachay_66d	H8	T	T	G	G	T	A	T	.	
BsordAnt3t2	sordt1	T	C	.	T	.	T	A	T	A	A	.	G	.	.	.	A	C	.	.	.	A	.	.	
BsordAnt3t1	sordt1	T	C	.	T	.	T	A	T	A	A	.	G	.	.	.	A	C	.	.	.	A	.	.	
Pasamayo_29e	H17	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
Pasamayo_80	H17	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
BsordAnt2t6	sordt2	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
50 Pasamayo_79	H17	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
Pasamayo_31e	H17	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
Pasamayo_73	H17	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
Pasamayo_82	H17	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
Pasamayo_81	H17	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
BsordAnt2t5	sordt2	T	.	.	A	.	G	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	.	.	T	A	A	.	T	C	A	A	G	.	
Bsordlg	sordlg	T	.	.	A	T	T	A	T	.	A	G	A	.	.	.	A	.	A	.	.	
BsordCarY1	sordY	C	.	.	A	T	T	A	T	.	A	.	G	.	.	.	A	A	.	G	.	.	G	.	.	
BsordAncY1t3	sordY	C	.	.	A	T	T	A	T	.	A	.	G	.	.	.	A	A	.	G	.	.	G	.	.	
BsordAnt1t4	sordt3	T	C	.	A	.	G	.	.	T	T	A	T	.	A	.	G	.	.	.	A	A	.	G	.	.	G	.	.	
60 <i>B. modestus</i>	mod	T	.	G	.	G	G	T	T	A	T	.	A	G	.	.	A	.	.	A	.	A	A	.	.	
<i>B. conspersus</i>	cons	T	C	G	A	T	.	A	.	A	A	.	T	T	T	A	.	.	.	A	.	C	A	.	.	A	T	-	T	

En general se observa un alto grado de conservación de las secuencias nucleotídicas para *B. scalariformis*, una mayor presencia de transiciones que transversiones, y la similitud entre secuencias dentro de las poblaciones de cada morfotipo. Se observó también que algunas secuencias de individuos de Pasamayo resultaron más similares a individuos de *B. sordidus*. Las secciones primera y final del alineamiento resultaron las más conservadas mientras que la porción central presentó mayor cantidad de mutaciones.

Figura 16. Porción final del alineamiento múltiple de secuencias. La última parte corresponde al primer 16S-R472. Las secuencias se encuentran bastante conservadas, los *gaps* son provocados por la especie hermana *B.sordidus*.



4.2.3 Diversidad Genética

Para proceder al análisis mediante redes de haplotipos, necesitamos conocer los datos de diversidad genética intrapoblacional.

Para el análisis poblacional de *B. scalariformis* se excluyeron los individuos de *B. sordidus*, *B. modestus* y *B. conspersus*. El nuevo alineamiento con 51 secuencias resultó en 334 sitios con 289 sitios constantes, 44 sitios variables y 38 sitios informativos. Usando el programa DNAsp se encontraron 17 haplotipos (secuencias diferentes) (Tabla 8). La diversidad genética fue alta (0.8965 – 17 haplotipos para 51 individuos), el valor Pi de diversidad nucleotídica fue de 0.04028.

No se encontraron haplotipos compartidos entre los morfotipos Pasamayo-Ancón y Lachay-Cerro de Agua (Tabla 9). Sólo existe un haplotipo compartido entre 4 individuos de Lachay y 4 individuos de Cerro de Agua. Se observa que existe estructuración geográfica de la diversidad genética.

Ambos morfotipos presentan una cantidad de haplotipos similares (8 en Lachay-Cerro de Agua y 9 en Ancón-Pasamayo), y a pesar del mayor tamaño muestral de Ancón-Pasamayo (33) con respecto a Lachay-Cerro de agua (17) observamos valores cercanos de diversidad genética: Lachay-Cerro de Agua (0.772), Pasamayo – Ancón (0.820) (Tabla 10). La mayor diversidad genética (haplotípica) la presentó la población de Cerro de Agua (0.800) y la menor (0.385) la población de Ancón.

Existe un haplotipo altamente divergente en la población de Pasamayo que corresponde a las 7 secuencias que formaban un grupo en el alineamiento.

Tabla 8. Haplotipos (secuencias diferentes) encontrados en las poblaciones de *B. scalariformis* a partir de 27 sitios variables. Los números indican los 44 sitios variables. N = Número de secuencias. Sólo un haplotipo (H3) está compartido entre las poblaciones de Lachay y Cerro de Agua. Ancón y Pasamayo no presentan haplotipos compartidos. El haplotipo más divergente (H17) pertenece a 7 individuos de la población de Pasamayo. Hap: Haplotipos. Pob.: Poblaciones (A: Ancón, C: Cerro de Agua, L: Lachay, P: Pasamayo)

Hap	4	5	6	6	6	7	8	8	8	8	8	9	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	N	Pob.		
	8	9	0	8	9	0	1	2	4	8	9	1	2	3	4	5	6	8	0	4	5	0	1	3	0	1	7	7	8	1	3	4	8	0	2	5	6	3	4	7	8	9	1	4							
H_1	T	T	A	G	T	A	T	G	C	A	T	G	A	G	T	C	G	A	T	T	T	A	T	A	A	T	A	T	T	T	T	T	A	T	T	G	A	C	A	A	A	G	T	A	1	C					
H_2	1	C
H_3	8	L/C	
H_4	1	L
H_5	1	C
H_6	C	3	C
H_7	.	C	.	.	A	1	L
H_8	A	1	L
H_9	A	.	.	.	A	A	.	A	A	T	G	.	G	G	C	.	T	T	T	C	.	2	A					
H_10	A	A	.	A	A	T	G	.	G	G	G	C	.	T	T	T	C	.	11	A					
H_11	.	.	T	.	A	A	.	A	A	T	G	.	G	G	G	C	.	T	T	T	C	.	1	P						
H_12	A	G	C	.	.	.	A	.	A	A	T	A	G	.	G	G	G	C	.	T	T	T	C	.	3	P						
H_13	A	G	C	.	.	.	A	.	T	A	A	T	A	G	.	G	G	G	C	.	T	T	T	C	.	1	P						
H_14	A	G	C	.	.	.	A	.	A	A	T	A	G	.	G	G	G	G	.	T	T	T	G	C	.	7	P					
H_15	A	G	A	.	A	A	T	A	G	.	G	G	G	G	.	T	T	T	G	C	.	1	P					
H_16	A	G	.	.	.	T	A	.	A	A	T	A	G	.	G	G	G	G	.	T	T	T	C	.	1	P					
H_17	.	.	.	A	A	G	.	A	T	.	A	T	.	A	T	.	T	A	A	.	T	C	.	G	A	.	A	G	A	A	A	.	C	.	A	.	T	.	.	.	A	.	C	7	P						

Tabla 9. Distribución de los haplotipos de *B. scalariformis* con respecto a las localidades de muestreo. La línea punteada indica que no existen haplotipos compartidos entre las localidades de Ancón-Pasamayo y Lachay-Cerro de Agua.

Localidad	Haplotipo																	Total
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	
Ancón									2	11	1							14
Pasamayo												3	1	7	1	1	7	20
Lachay			4	1			1	1										7
Cerro de Agua	1	1	4		1	3												10
Nº Individuos	1	1	8	1	1	3	1	1	2	11	1	3	1	7	1	1	7	51

Tabla 10. Valores de diversidad genética (H), para las poblaciones estudiadas de *B. scalariformis*. N = Tamaño muestral. Nótese los altos valores de diversidad genética encontrados, salvo en el caso de Ancón.

	H	N
Ancón	0.385	14
Pasamayo	0.763	20
Lachay	0.714	7
Cerro de Agua	0.800	10
Ancón + Pasamayo	0.820	34
Lachay + Cerro de Agua	0.772	17
Total	0.896	51

La distancia genética dentro y entre las poblaciones fue hallado con MEGA y se muestra en la Tabla 11. Dentro de cada población, la distancia genética es pequeña (menor a 0.01) reflejando las pequeñas diferencias entre los haplotipos, salvo en el caso de Pasamayo (0.05). Por otro lado, observando la distancia genética entre las poblaciones notamos que sólo dentro del morfotipo Lachay-Cerro de Agua la distancia es pequeña (0.0054), lo contrario sucede en Ancón-Pasamayo (0.0449)

Curiosamente, la distancia dentro del morfotipo Lachay y Cerro de Agua (0.064) resultó menor que la distancia dentro de la propia población de Lachay, lo mismo ocurre si comparamos la distancia genética entre Pasamayo y Ancón (0.0449) y la distancia genética dentro de Pasamayo (0.0519). También observamos cierta relación entre la distancia genética y la distancia geográfica, por ejemplo Cerro de Agua es la localidad que se encuentra más al norte y a su vez es la que muestra mayor distancia genética con las poblaciones del lado sur (Ancón: 0.0449, Pasamayo: 0.0622), se esperaría lo mismo para Ancón que es la localidad más al sur, sin embargo observamos que las diferencias genéticas de las poblaciones del norte con Pasamayo son mayores. La mayor distancia genética encontrada al comparar a los individuos de Pasamayo está influenciada por la presencia de un haplotipo altamente divergente.

Tabla 11. Distancia genética a pares (Kimura 2-parámetros) dentro de cada población (diagonal) y entre cada una de las poblaciones (debajo de la diagonal). Nótese la mayor diferencia al comparar entre las poblaciones que dentro de ellas, salvo para el caso de Pasamayo.

	Ancón	Pasamayo	Lachay	Cerro de Agua
Ancón	0.0021			
Pasamayo	0.0449	0.0519		
Lachay	0.0435	0.0608	0.0064	
Cerro de Agua	0.0449	0.0622	0.0054	0.0038

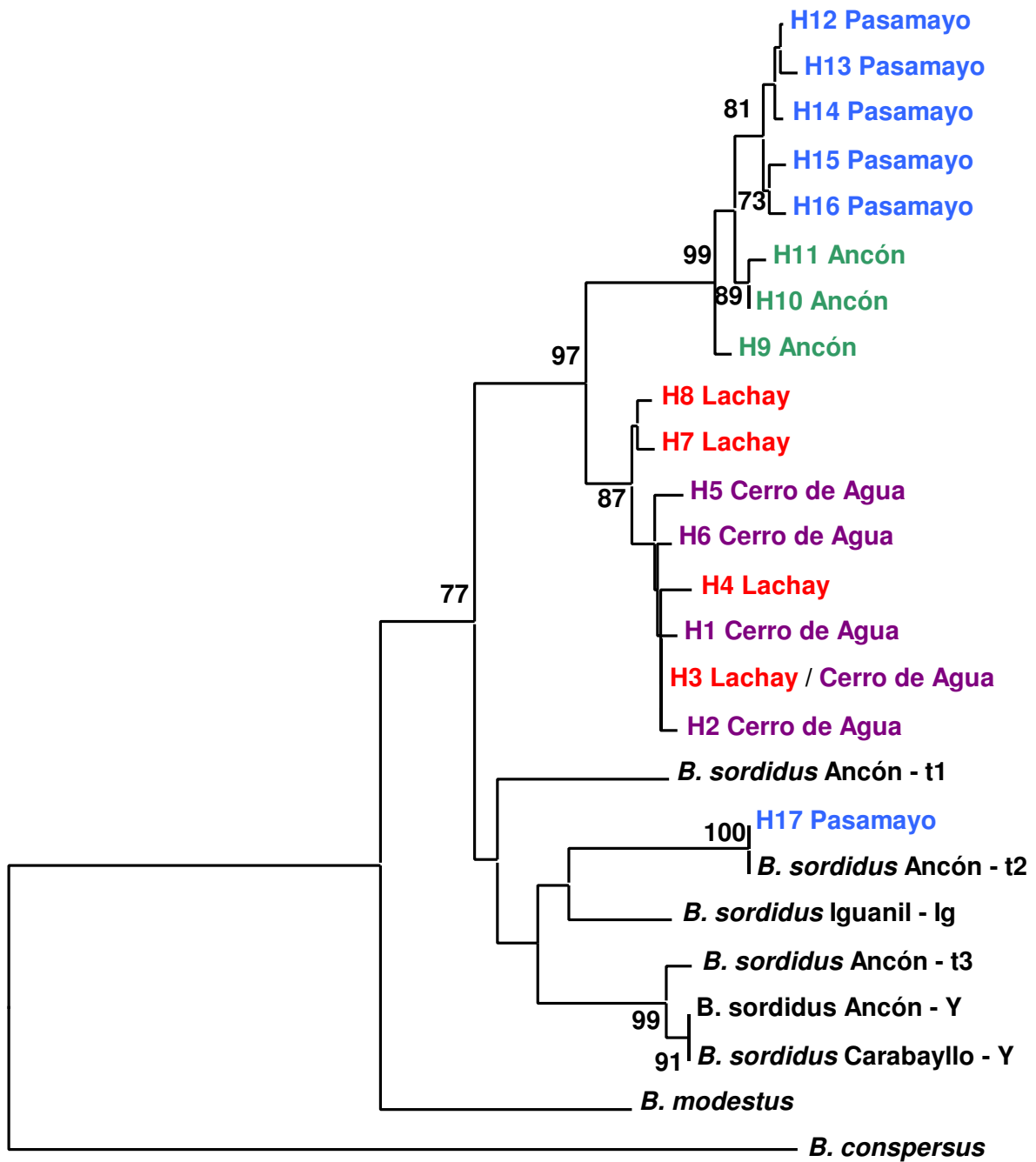
4.2.4 Análisis filogenético

El modelo de sustitución nucleotídica elegido por el Modeltest utilizando el criterio de información de Akaike (AIC) fue el K81uf+G, el cual es una variación del modelo Kimura 2-Parámetros (K80) (Kimura 1980), el modelo K80 asume una frecuencia igual de bases y diferentes tasas de transición y transversión. El modelo K81 hace las mismas asunciones que K80 pero permite dos tasas de transversión diferentes. Finalmente, el modelo K81uf asume además una diferencia en la frecuencia de bases (Kimura 1981), el símbolo G indica que se calculó el parámetro α (alfa) de la distribución gamma para ajustar las diferencias de mutación a lo largo del alineamiento.

El análisis de Neighbour Joining, el cual se basa en la construcción del árbol a partir de distancias genéticas, reveló la existencia de un grupo en posición basal correspondiente a 7 individuos de Pasamayo (Fig. 17), mencionados anteriormente por sus mutaciones compartidas que sorprendentemente queda en el mismo clado de *Bostryx sordidus*, particularmente dentro del grupo de *B. sordidus* de la localidad de "AncónT" que se ubica en la zona oriental del Cerro Ancón cubierta principalmente por tilandsiales (Ramírez, 2004).

Describiendo ahora el clado de *B. scalariformis* se observa una clara división entre los morfotipos Lachay-Cerro de Agua y Ancón-Pasamayo. Los individuos de Lachay y Cerro de Agua aparecen entremezclados en un mismo clado (*bootstrap*=87). El clado de Pasamayo-Ancón también resultó bien sustentado (*bootstrap*=99), sin embargo existe subdivisión entre las poblaciones de Ancón y Pasamayo soportada con altos valores de *bootstrap*. Las relaciones intraespecíficas muestran que las diferencias genéticas concuerdan con las diferencias morfológicas. La topología del árbol encontrado es conocida como "en estrella" (Avice, 200) ya que observamos la divergencia reciente de los haplotipos de *B. scalariformis* a partir de pocos linajes.

Figura 17. Relaciones filogenéticas entre los individuos de *B. scalariformis*. Árbol obtenido en MEGA utilizando las distancias calculadas con el modelo Kimura 2-parámetros y el método de Neighbour Joining. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 70%. La escala representa la distancia genética.



0.02

En el análisis de parsimonia, el cual se basa en la construcción de árboles con el menor número de cambios posibles (Fig. 18), encontramos una topología similar a la encontrada con el análisis de Neighbour Joining, el grupo de *B. scalariformis* está bien sustentado (*bootstrap*=91). Continuamos observando la presencia de dos clados dentro de la especie que corresponden a sus morfotipos. Dentro del clado de Pasamayo-Ancón existe una subdivisión notable de los individuos de Pasamayo (*bootstrap*=88), el haplotipo H17, correspondiente a 7 individuos de *B. scalariformis*, permanece en el clado de *Bostryx sordidus*.

El análisis de máxima verosimilitud (Fig. 19) en el cual se aplicaron los parámetros del modelo de sustitución nucleotídica propuesto por el Modeltest (K81uf+G), también nos muestra resultados similares. Es posible discriminar a *B. scalariformis* de *B. sordidus* (*bootstrap*>70), al clado Ancón-Pasamayo de Lachay-Cerro de Agua (*bootstrap*>90) y a los individuos de Pasamayo dentro del clado Ancón-Pasamayo (*bootstrap*>90). El H17 en este caso, también se ubica dentro del clado de *B. sordidus*.

Finalmente, el análisis de filogenia bayesiana (Fig. 20) también discrimina a *B. scalariformis* de *B. sordidus* ($p=0.79$), y divide a los morfotipos Ancón-Pasamayo ($p=0.97$) de Lachay-Cerro de Agua. Sin embargo, el haplotipo H17 continúa ubicándose dentro del clado de *B. sordidus*.

En general, el gen mitocondrial 16S RNA demuestra su capacidad de distinguir entre las poblaciones del molusco, y reitera ser un buen marcador para el estudio de filogenias intraespecíficas de moluscos terrestres. Sin embargo en todas las topologías se encontró un gran número de politomías debido a la cercanía genética entre las secuencias. Para resolver las politomias intrapoblacionales se necesita de un análisis más potente para este tipo de casos: el análisis de redes de haplotipos.

Figura 18. Relaciones filogenéticas árbol obtenido en PAUP utilizando el método de Máxima Parsimonia. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 70%.

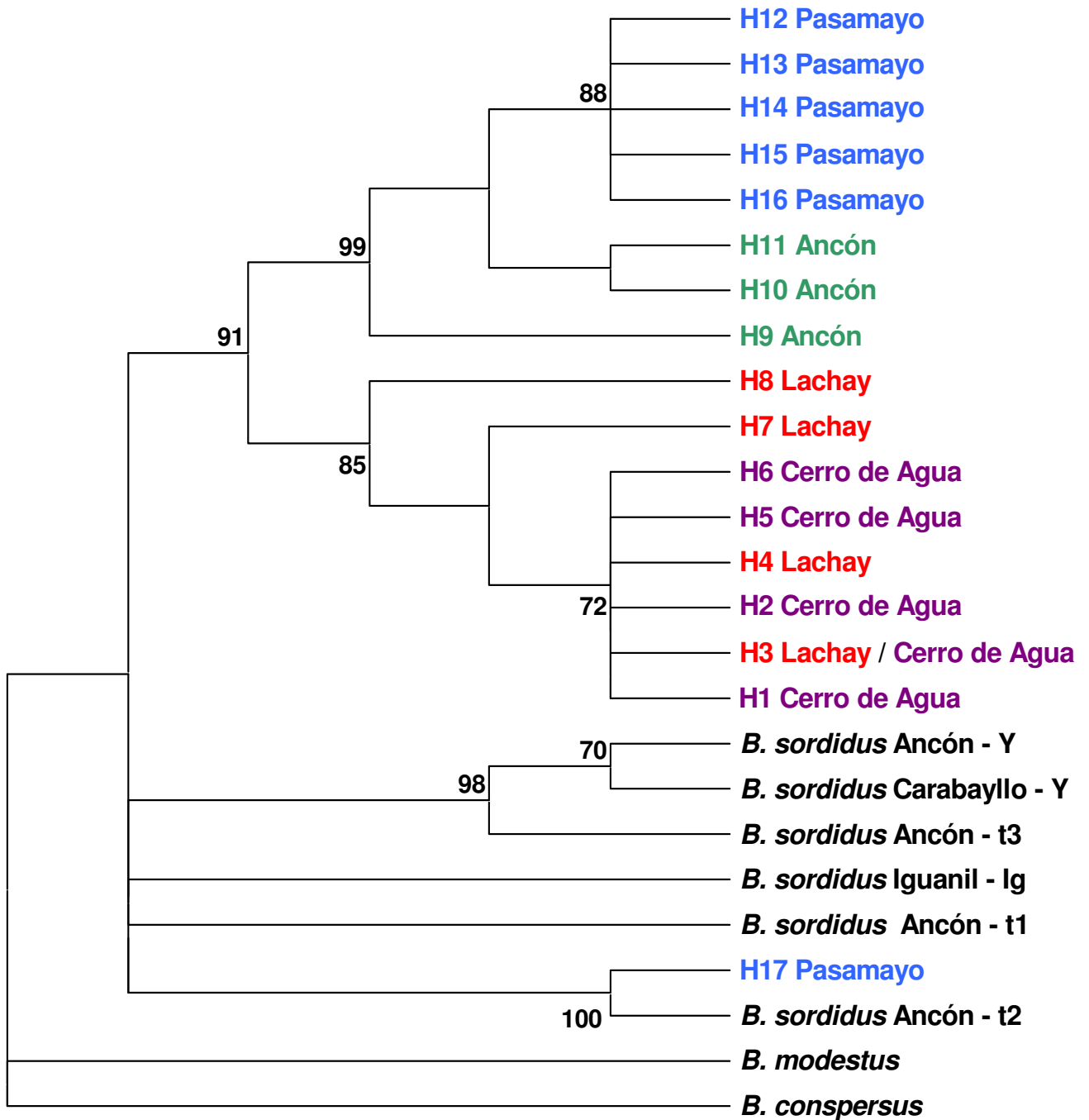


Figura 19. Relaciones filogenéticas árbol obtenido en PAUP utilizando el método de Máxima Verosimilitud. Se muestran los valores de *bootstrap* mayores a 70%.

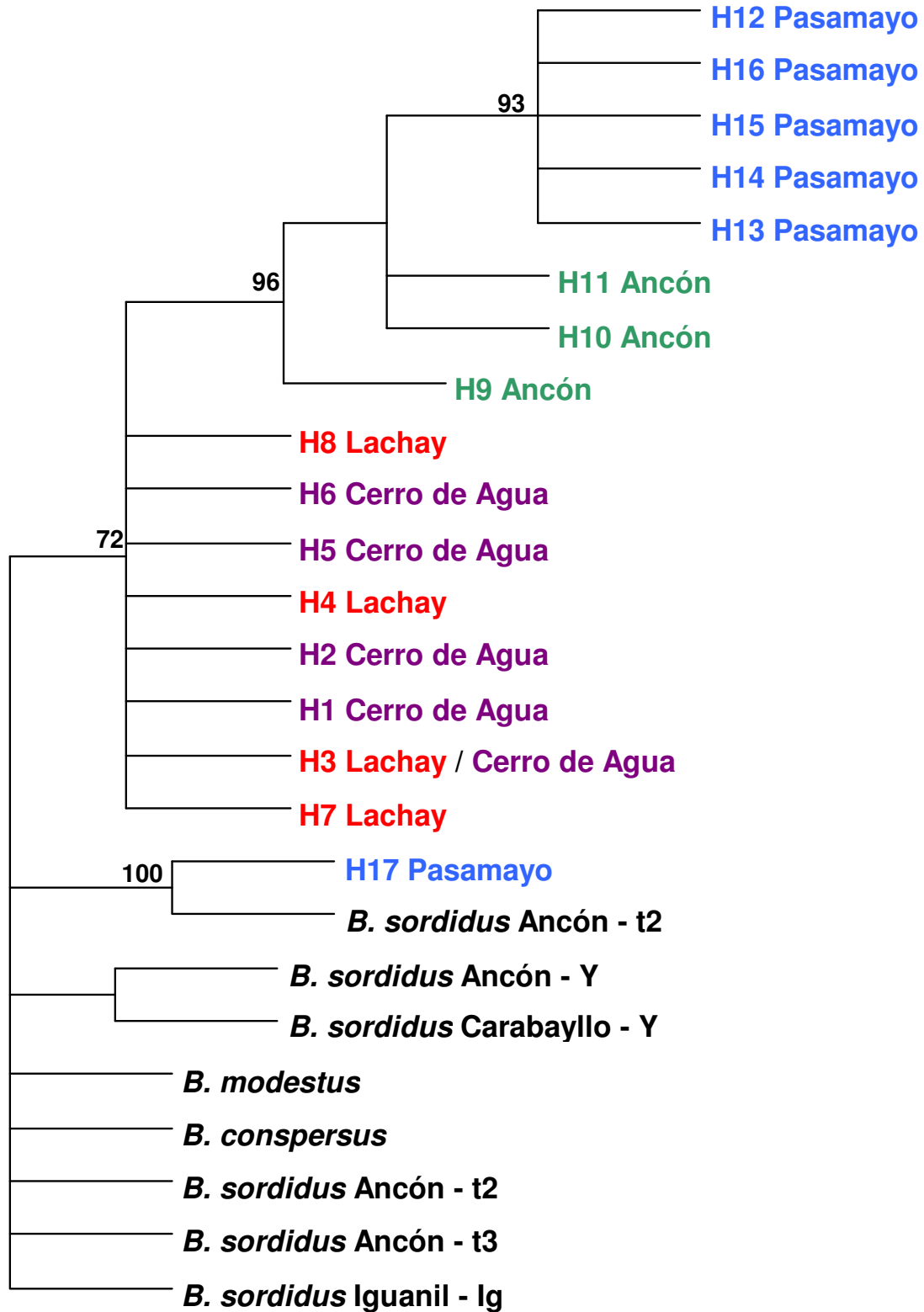
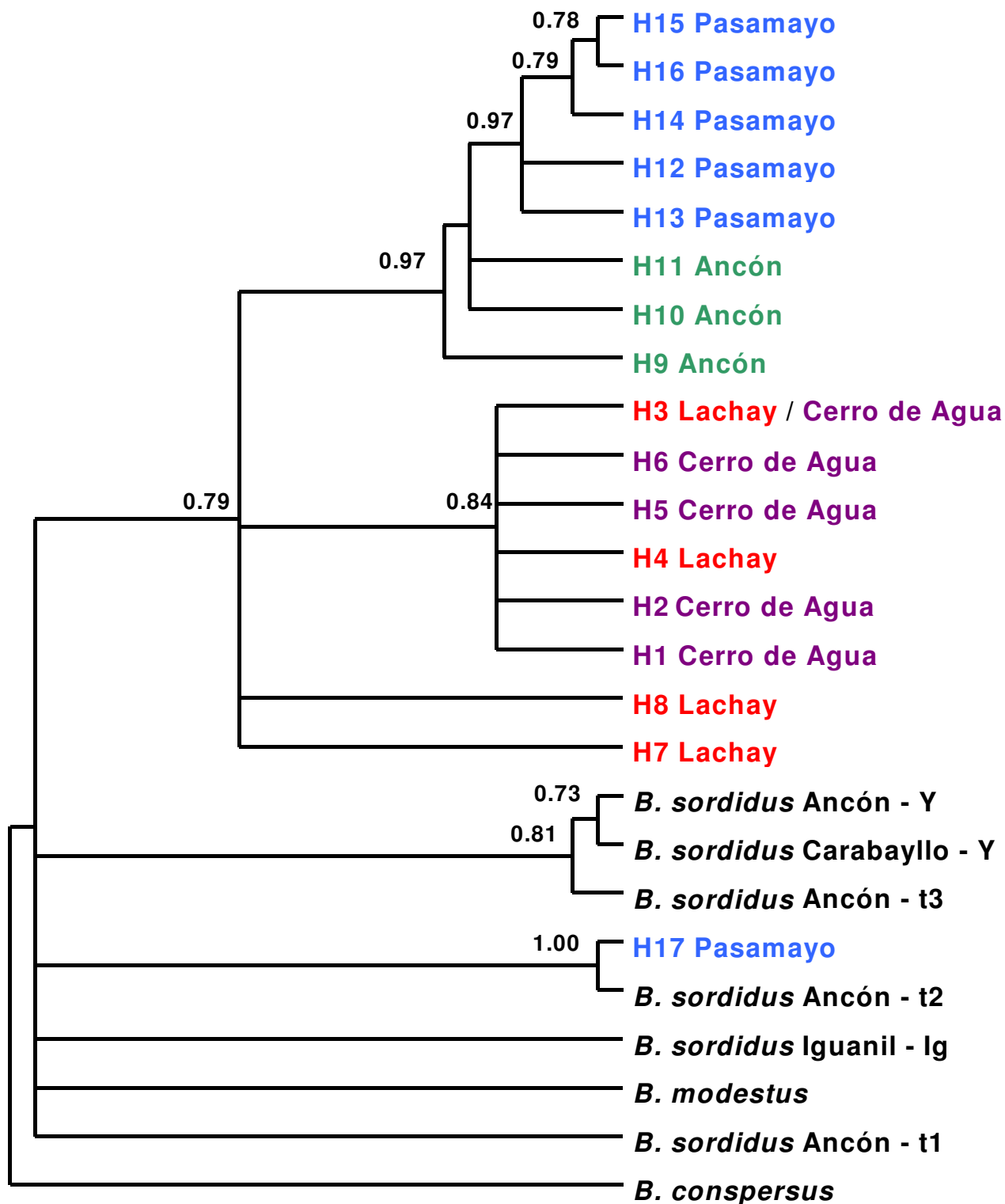


Figura 20. Relaciones filogenéticas árbol obtenido en Mr. Bayes utilizando el análisis bayesiano. Los valores indican la probabilidad de los clados. Se muestran los valores de probabilidad mayores a 0.70.



4.2.5 Networks

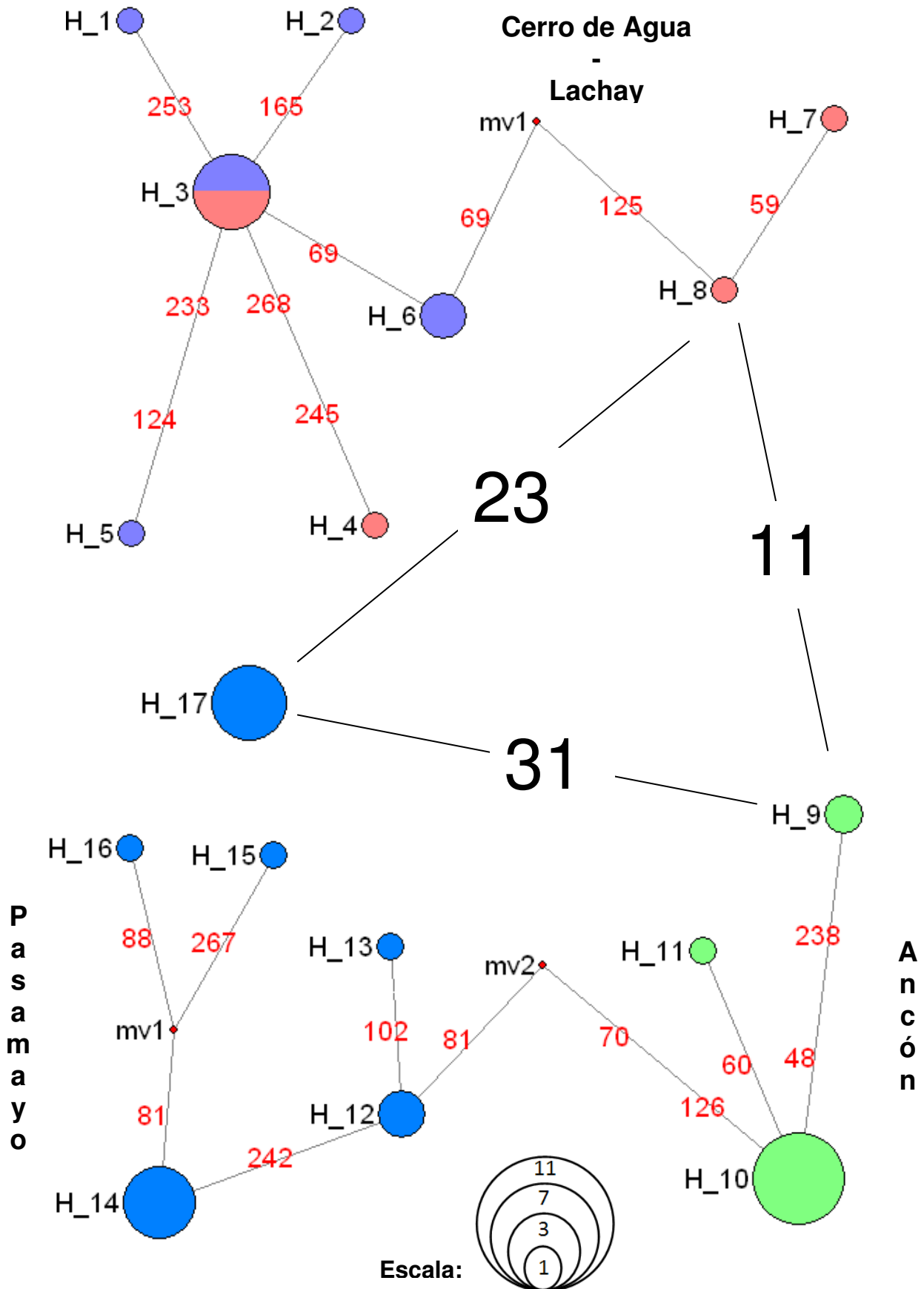
Existe otra manera de encontrar las relaciones filogenéticas entre todos los individuos en estudio, utilizando el método de redes de haplotipos (Bandelt *et al.*, 1999) donde se generan árboles no enraizados para observar las relaciones entre los haplotipos (secuencias diferentes) y sus frecuencias. Este análisis permite observar visualmente patrones demográficos y de flujo génico. Al no necesitar árboles enraizados se prescindió de los individuos usados como grupos externos.

El análisis de networks mostró la presencia de 2 grupos (Fig. 21): Lachay-Cerro de Agua (8 haplotipos) y Pasamayo – Ancón (9 haplotipos). El haplotipo con mayor frecuencia en Lachay-Cerro de Agua (H3-8 individuos) está compartido entre ambas poblaciones. Las diferencias entre los haplotipos se deben a pocas mutaciones (entre 1 y 2). Lachay posee 3 haplotipos propios (H4, H7, H8) y Cerro de Agua posee 4 (H1, H2, H5, H6). La topología que presenta esta zona de la red de haplotipos se conoce como "*star – like topology*" o árbol en estrella en la cual un haplotipo con alta frecuencia (H3) está conectado a haplotipos de baja frecuencia por medio de pocas mutaciones, esta topología es una firma de expansión poblacional después de un cuello de botella genético (Avice, 2000).

Distante a 11 mutaciones del haplotipo 8 de Lachay se encuentra el otro grupo (Ancón - Pasamayo), la conexión se da con el haplotipo 9 perteneciente a Ancón, un haplotipo de baja frecuencia (1 individuo). La población de Ancón compuesta de los haplotipos 9, 10 y 11 también presenta una topología en estrella, al tener la menor cantidad de haplotipos se convierte en la población con diversidad genética más baja. A tres cambios mutacionales del haplotipo 10 de Ancón se encuentra el haplotipo 12 de Pasamayo, esta población posee los siguientes haplotipos: 12, 13, 14, 15, 16 y 17, y no presenta topología en estrella. Los individuos de este grupo de Pasamayo presentan entre 1 y 4 diferencias en sus secuencias. Dentro de Pasamayo existe además el haplotipo divergente (H17) distante a 31 mutaciones del haplotipo 9 (Ancón) y 23 mutaciones del haplotipo 8 (Lachay).

Entre las poblaciones existen varios pasos mutacionales, esta cantidad de mutaciones acumuladas entre estos grupos indica una restricción en el flujo génico.

Figura 21. Red de haplotipos de *B. scalariformis*. Los colores representan a las poblaciones: Ancón (verde), Pasamayo (azul), Lachay (rosa), Cerro de Agua (lila). Los cambios mutacionales dentro de los grupos se muestran en rojo y entre los grupos en negro. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo correspondiente (ver escala).



4.2.6 Estructura y Diferenciación Poblacional

El estadístico *Fst* se utilizó para encontrar diferenciación entre las poblaciones (Tabla 12), la diferenciación indica la restricción de flujo génico entre las poblaciones. La mayor diferenciación se encuentra entre las poblaciones del morfotipo Lahay- Cerro de Agua y la población de Ancón (*Fst*=0.91 y 0.94, respectivamente), la menor diferenciación con Pasamayo puede deberse a la presencia del haplotipo divergente H17. Observamos que no existe diferenciación significativa entre las poblaciones de Lachay y Cerro de Agua, esto debido a la presencia del haplotipo compartido H3 que a su vez es frecuente en ambas poblaciones y al menor número de mutaciones entre ellas.

Tabla 12. Valores de *Fst* entre las poblaciones de *B. scalariformis*. Valores cercanos a 1 indican diferenciación genética entre las poblaciones. Todos los valores fueron altamente significativos ($p < 0.001$), excepto para el caso de Lachay y Cerro de Agua.

	Ancón	Pasamayo	Lachay	Cerro de Agua
Ancón	0.0000			
Pasamayo	0.3564	0.0000		
Lachay	0.9149	0.4779	0.0000	
Cerro de Agua	0.9362	0.5343	0.0560	0.0000

Al no considerar el haplotipo H17 los valores de *Fst* aumentan (Tabla 13). Entre Lachay y Cerro de Agua encontramos un valor bajo de *Fst* (0.05) y la diferenciación no fue significativa. Entre Ancón y Pasamayo encontramos un *Fst* alto (0.79) lo que indica que no existen haplotipos compartidos entre estas dos poblaciones. La diferenciación entre el morfotipo Ancón-Pasamayo de Lachay-Cerro de Agua es evidente (valores de *Fst* mayores a 0.9).

Tabla 13. Valores de *Fst* entre las poblaciones de *B. scalariformis* sin considerar al haplotipo H17. Valores cercanos a 1 indican diferenciación genética entre las poblaciones. Todos los valores fueron altamente significativos ($p < 0.001$), excepto para el caso de Lachay y Cerro de Agua.

	Ancón	Pasamayo	Lachay	Cerro de Agua
Ancón	0.0000			
Pasamayo	0.7943	0.0000		
Lachay	0.9149	0.9226	0.0000	
Cerro de Agua	0.9362	0.9424	0.0560	0.0000

Los valores de *Fst* demuestran la existencia de cuatros grupos dentro de la poblaciones de *B. scalariformis* (Tabla 14): Ancón, Pasamayo, Pasamayo H17 y Lachay-Cerro de Agua. La significancia de todos los valores indica la estructuración de la población y la capacidad de diferenciar genéticamente a los grupos dentro y entre las poblaciones. En otras palabras, Lachay y Cerro de Agua conforman un solo grupo poblacional y con poca diferenciación genética (tal como se observaba en los árboles filogenéticos), Ancón y Pasamayo no comparten haplotipos por eso quedan como grupos separados, mientras que el haplotipo divergente H17 debe ser tomado en cuenta como un linaje diferente.

Tabla 14. Valores de *Fst* entre los cuatro grupos propuestos para *B. scalariformis*. Los valores cercanos a 1 indican diferenciación genética entre las poblaciones. Todos los valores fueron significativos ($p < 0.001$).

	Ancón	Pasamayo	Pasamayo H17	Lachay + Cerro de Agua
Ancón	0.0000			
Pasamayo	0.7943	0.0000		
Pasmayo H17	0.9768	0.9783	0.0000	
Lachay + Cerro de Agua	0.9206	0.9280	0.9589	0.0000

Para analizar la varianza molecular dentro y entre los grupos de secuencias correspondientes a los morfotipos se realizó el test de AMOVA (Tabla 15). El AMOVA revela que existe mayor variabilidad entre morfotipos (49.38%, pero no es estadísticamente significativa), sin embargo también existe variabilidad entre las poblaciones dentro de los grupos propuestos (16.72%, $p < 0.0001$). El análisis AMOVA es utilizado para revelar la estructura genética de una población, por lo que deberíamos obtener gran diferencia entre los grupos propuestos y menor diferencia dentro de ellos. Por lo tanto, se optó realizar nuevamente el análisis sólo que ahora basándose en los resultados anteriores que demostraron la presencia de cuatro grupos dentro de *B. scalariformis* (Tabla 16), este nuevo abordaje maximizó la variación entre de los grupos (>90%) y minimizó la variación entre las poblaciones dentro de los grupos. Aunque no se presentó significancia estadística, esta propuesta permite determinar las diferencias entre los grupos dentro de las poblaciones de *B. scalariformis*.

Tabla 15. Análisis de Varianza Molecular entre los morfotipos (Cerro de Agua-Lachay y Pasamayo Ancón) de *Bostryx scalariformis*. Los estadísticos resultaron significativos ($p < 0.0001$), salvo en (*).

Fuente de Variación	Porcentaje de Variación	Índices de Fijación
Entre grupos	49.38%	Fct = 0.49385*
Entre poblaciones dentro de los grupos	16.72%	Fsc = 0.3303
Dentro de las poblaciones	33.90%	Fst = 0.66103

Tabla 16. Análisis de Varianza Molecular para los cuatro grupos genéticamente diferentes (Cerro de Agua-Lachay, Pasamayo, Ancón, y Pasamayo H17) propuestos dentro de *Bostryx scalariformis*. Los estadísticos resultaron significativos ($p < 0.0001$) sólo en (*).

Fuente de Variación	Porcentaje de Variación	Índices de Fijación
Entre grupos	93.72%	Fct = 0.9373
Entre poblaciones dentro de los grupos	0.74%	Fsc = 0.1183
Dentro de las poblaciones	5.53%	Fst = 0.9447*

4.2.7 Patrones demográficos

El análisis de la filogenia intraespecífica y la red de haplotipos indican la posibilidad de eventos de expansión súbita en las poblaciones de *B. scalariformis*, la presencia de la topología en estrella demuestra un episodio de cuello de botella genético seguido de expansión poblacional súbita. Para testar esta hipótesis se calcularon los valores de diferencias a pares (k), número de sitios segregantes o polimórficos (s) y la diversidad nucleotídica (π) que se muestran en la Tabla 17. Estos valores pueden indicar la "firma" que deja en la estructura genética de las poblaciones los episodios de cuello de botella genético seguido de expansión poblacional. Además se realizó el análisis de *mismatch distribution* (distribución de diferencias a pares entre las secuencias) para observar gráficamente la ocurrencia de este evento.

En la Tabla 17 observamos la relación directa que tienen los valores de número promedio de diferencias a pares (k), sitios polimórficos (s) y diversidad nucleotídica (π). Por ejemplo, Ancón posee la menor cantidad de S , K y π , esto también se refleja en su diversidad genética.

Tabla 17. Valores del promedio de diferencias a pares, sitios polimórficos y diversidad nucleotídica para cada una de las poblaciones de *B. scalariformis*. k = Promedio de diferencias a pares, s = Número de sitios polimórficos, π = Diversidad nucleotídica. Se añadieron los datos de número de haplotipos y diversidad genética (H) a modo de comparación.

	Número de Haplotipos	H	k	s	π
Ancón	3	0.385	0.670	3	0.00206
Pasamayo	6	0.763	15.784	34	0.04842
Pasamayo sin H17	5	0.692	1.205	5	0.0037
Lachay	4	0.714	2.095	6	0.00635
Cerro de Agua	5	0.800	1.267	5	0.00383
Pasamayo + Ancón	9	0.820	12.221	37	0.03749
Pasamayo sin H17 + Ancón	8	0.772	2.581	10	0.00792
Lachay + Cerro de Agua	8	0.772	1.647	10	0.00499

El bajo número de sitios polimórficos junto con los altos valores de diversidad genética implica la presencia de varios haplotipos que divergen por pocas mutaciones, en otra palabras estamos frente al reflejo numérico de la topología en estrella en las poblaciones de *B. scalariformis*, la cual indica un episodio de expansión poblacional súbita que siguió a un cuello de botella genético.

Finalmente, observamos también la influencia del haplotipo divergente H17 en los valores presentes para Pasamayo, al tomarlo en cuenta aumentan los valores calculados para S , K y π . Sin embargo no afecta la diversidad genética (H) porque este índice sólo considera la frecuencia de aparición de haplotipos.

El número de diferencias a pares fue comparado con su frecuencia para cada población (Fig. 22). Pasamayo -sin el haplotipo 17- y Cerro de Agua presentaron una distribución unimodal, mientras que Ancón y Lachay presentan una distribución multimodal. Se ha observado que los eventos de expansión súbita quedan marcados en las poblaciones (Rogers & Harpending,1992) mostrando una curva unimodal, que implica una gran frecuencia de haplotipos con pocas diferencias entre sus secuencias. Al tomar en cuenta al haplotipo 17 la curva se convierte en multimodal debido a la gran diferencia de este haplotipo en relación a los demás. Dejando de lado al H17, se observó pocas diferencias entre las grupos lo que aunado a la alta diversidad genética presente en las poblaciones demuestra gráficamente la expansión súbita de las poblaciones de *B. scalariformis*.

Se utilizó el estadístico F_s de F_u para obtener soporte para la hipótesis de expansión poblacional (Tabla 18). Los valores de F_s de F_u son negativos en la mayoría de los casos implicando expansión poblacional (F_u , 1995). Sin embargo, sólo en el caso de Cerro de Agua y en el grupo Lachay-Cerro de Agua obtuvieron significancia estadística.

Tabla 18. Valores del estadístico F_s de F_u para cada población de *B. scalariformis* (A) o para los grupos de morfotipos (B). (*) resultado significativo ($p < 0.05$).

A	Fs de Fu	B	Fs de Fu
Ancón	0.055	Ancón + Pasamayo	7.116
Pasamayo	9.700	Ancón + Pasamayo sin H17	-0.642
Pasamayo sin H17	-1.291	Lachay + Cerro de Agua	-3.396*
Lachay	-0.042		
Cerro de Agua	-1.671*		

Figura 22. Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para las poblaciones de *B. scalariformis*. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. Un mejor ajuste de la distribución observada (azul) a la distribución esperada (rojo) implica un episodio de expansión poblacional súbita que siguió a un cuello de botella genético. (a) Ancón, (b) Pasamayo, (c) Lachay y (d) Cerro de Agua.

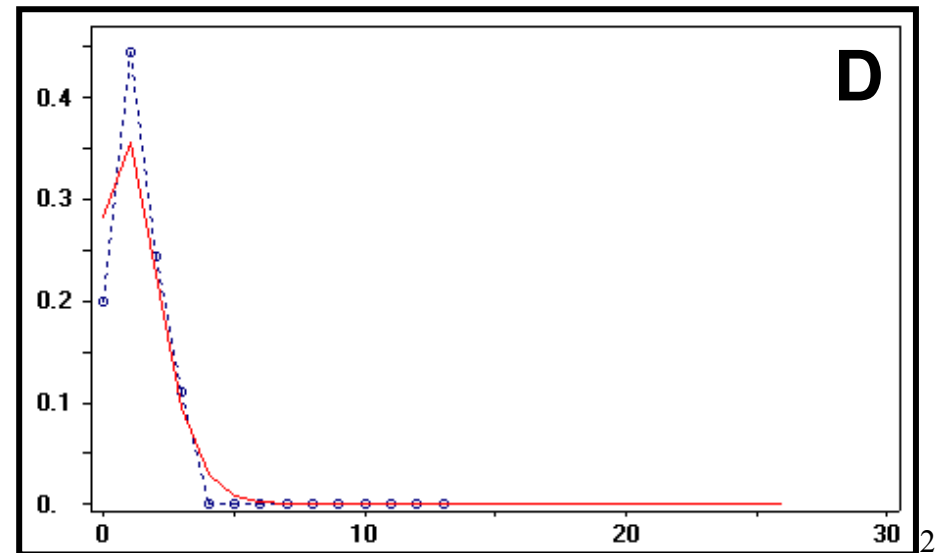
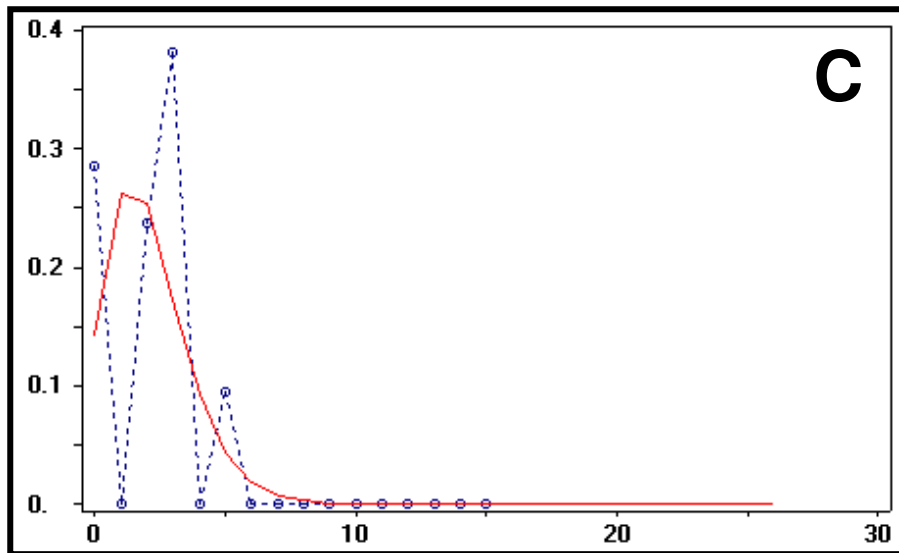
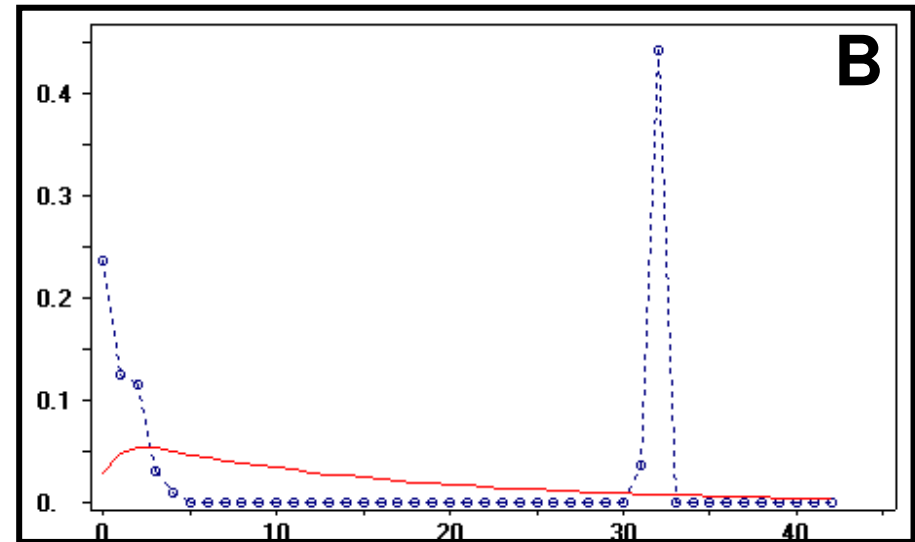
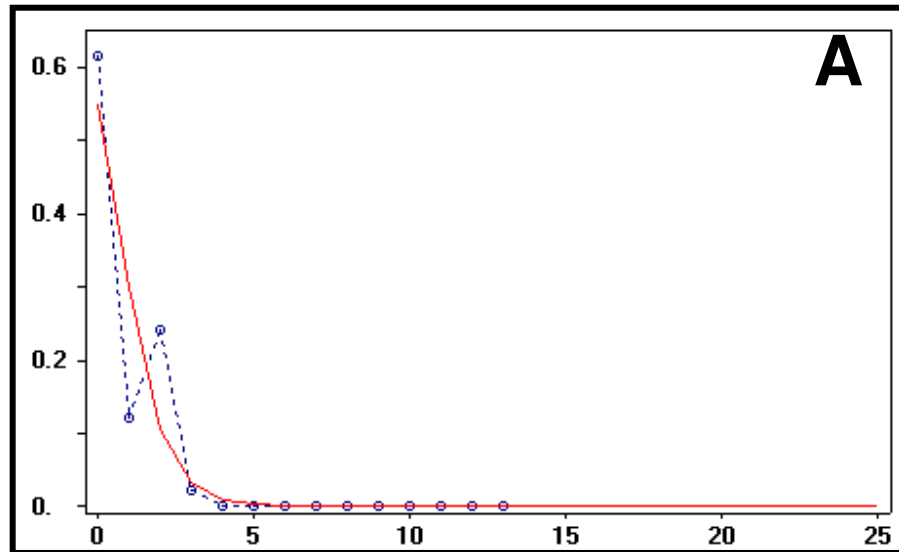
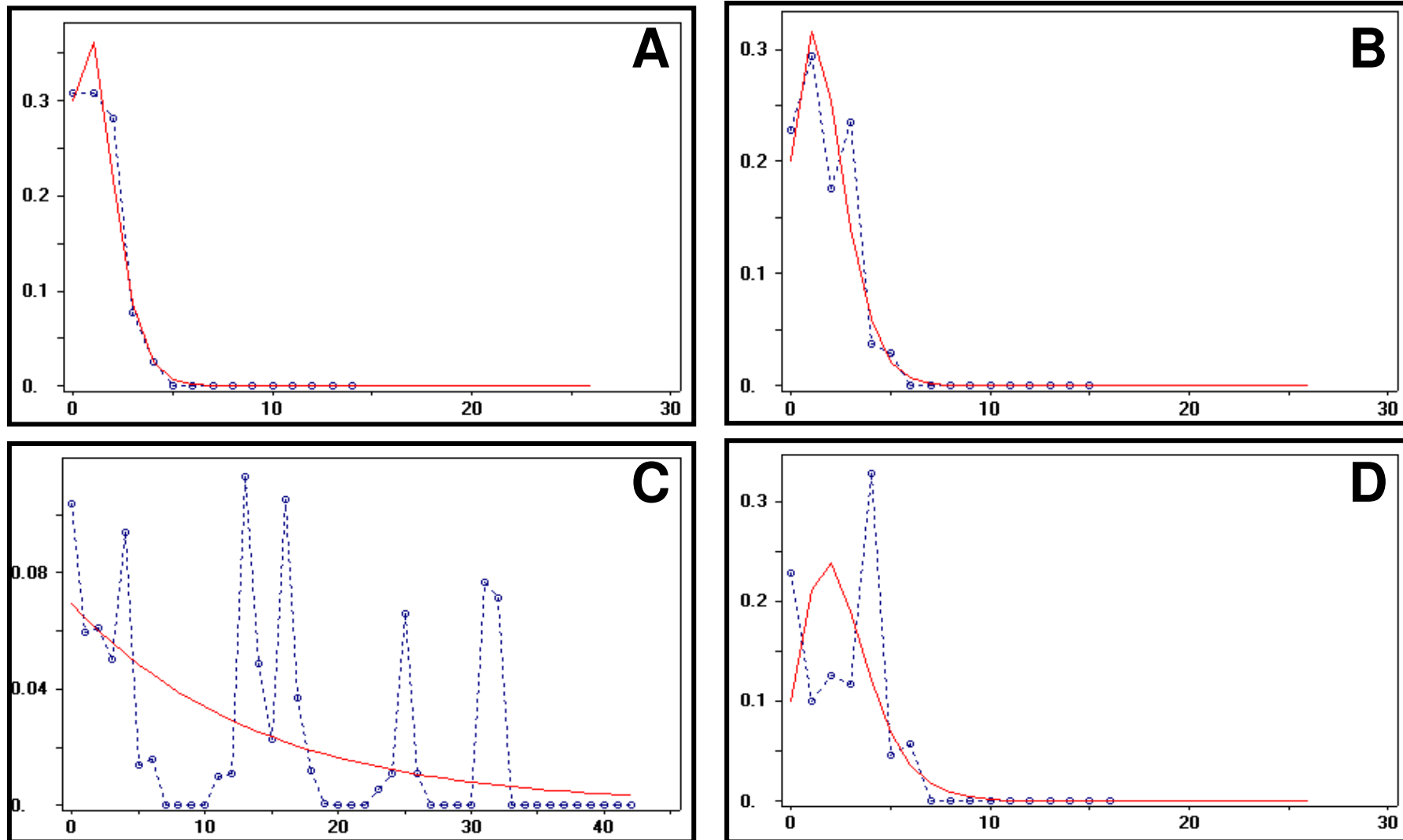


Figura 23. Distribución de diferencias a pares (*mismatch distribution*) para las poblaciones de *B. scalariformis*. En la horizontal se muestran las diferencias a pares y en la vertical la frecuencia de aparición de estas diferencias. Un mejor ajuste de la distribución observada (azul) a la distribución esperada (rojo) implica un episodio de expansión poblacional súbita que siguió a un cuello de botella genético. (a) Pasamayo sin el haplotipo H17, (b) Cerro de Agua + Lachay, (c) Ancón + Pasamayo, (d) Ancón + Pasamayo sin H17.



4.2.8 Tiempos de Divergencia

El árbol de distancias obtenido por Neighbour Joining fue linearizado y comparado con la tasa de sustitución estándar del gen 16S rRNA (0.06/millón de años, Chiba, 1999; Pfenninger & Posada 2002; Pfenninger *et al.* 2003). De esta manera podemos observar los tiempos de divergencia entre los clados (Fig. 24). La divergencia del clado de *B. scalariformis* de las demás especies del género *Bostryx* ocurrió hace 700 mil años (Fig. 24-A).

La divergencia entre los clados de los morfotipos ocurrió hace unos 413 mil años (Fig 25-A). En el caso de Lachay y El Agua, la mayor parte de haplotipos no muestra divergencia significativa, mientras que los haplotipos de Pasamayo y Ancón divergieron hace unos 110 mil años (Fig. 25-B). El tiempo de divergencia entre las poblaciones es relativamente reciente, sin embargo en la siguiente sección observaremos que coincide con fenómenos climáticos globales importantes que afectaron también a la costa peruana.

Figura 24. Tiempos de divergencia en la especie *Bostryx scalariformis*. (A) Tiempo de divergencia de *B. scalariformis* con respecto a *B. sordidus* (700 mil años). La escala inferior representa la distancia genética y la superior el tiempo en millones de años.

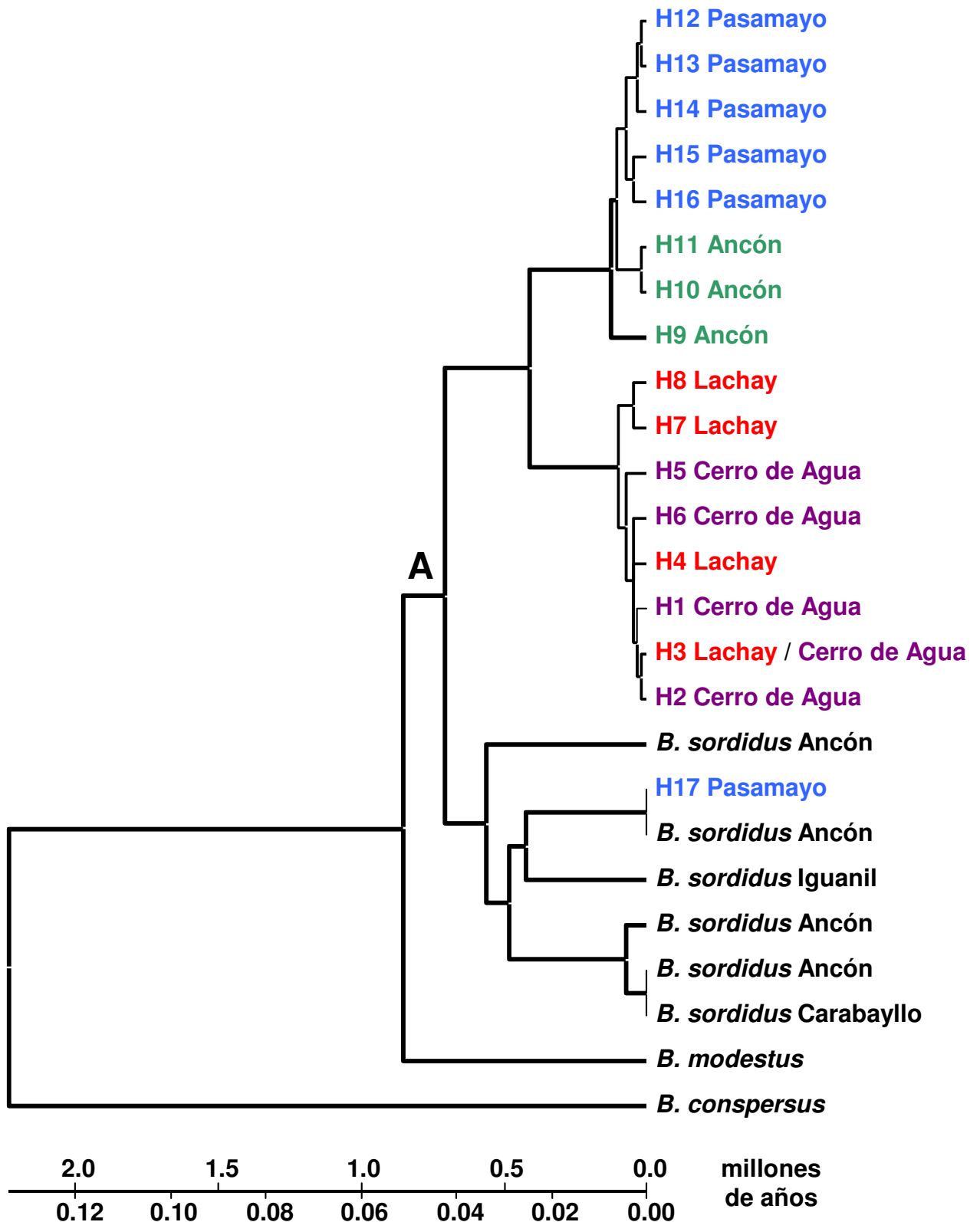
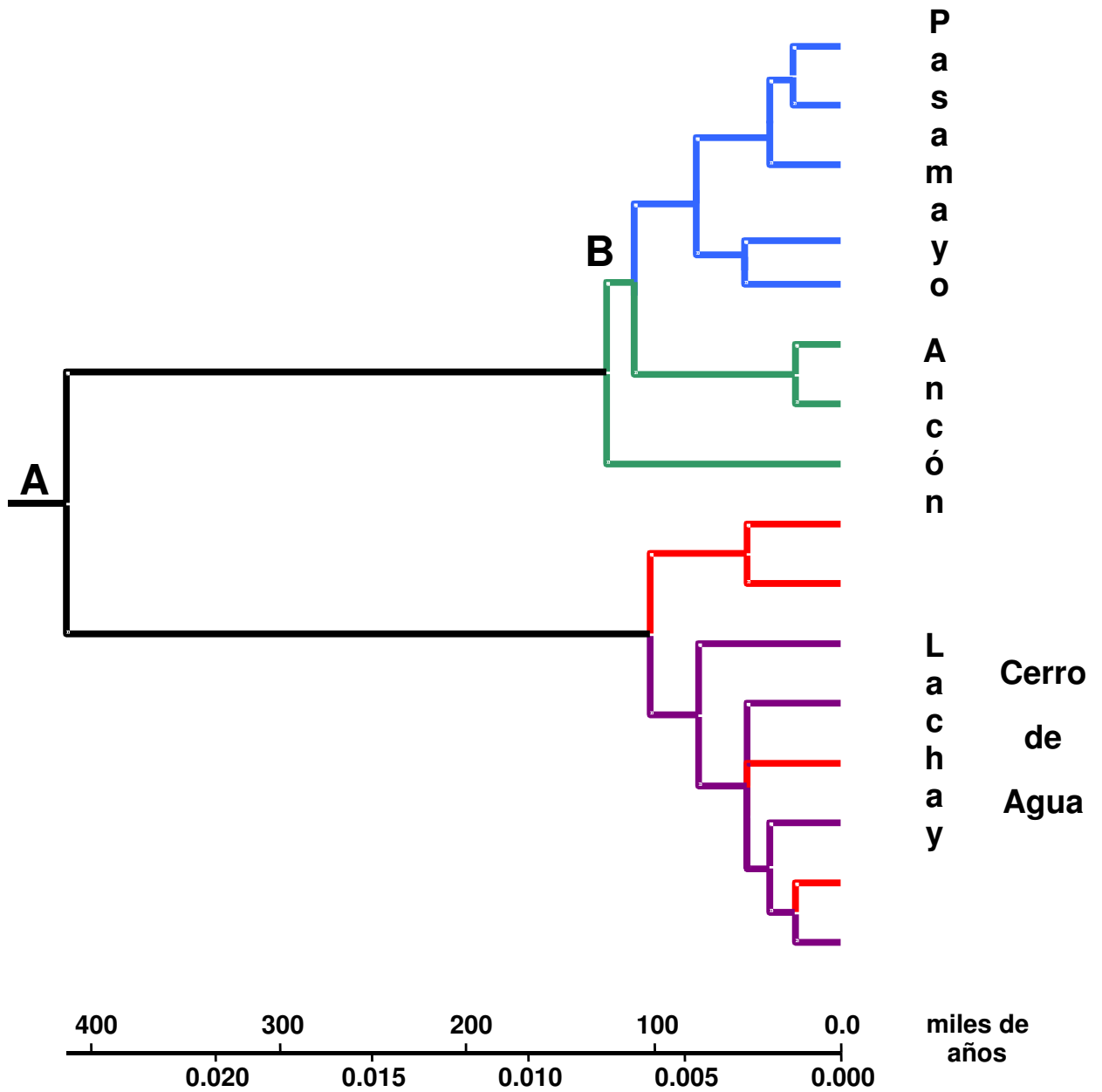


Figura 25. Tiempos de divergencia en las poblaciones de *B. scalariformis*. Cada población está indicada con un color: Ancón (verde), Pasamayo (azul), Lachay (rojo), y Cerro de Agua (morado). La escala inferior representa la distancia genética y la superior el tiempo en miles de años. (A) Divergencia entre los clados de *B. scalariformis* (410 mil años). (B) Divergencia de los haplotipos de Pasamayo de la población de Ancón (110 mil años).



5. DISCUSIÓN

La especie *Bostryx scalariformis* (Broderip *in* Broderip & Sowerby, 1832) presenta poblaciones en las lomas de Ancón, Pasamayo, Lachay y Cerro de Agua, abarcando un rango de aproximadamente 50 kilómetros lineales. La ausencia de este molusco en otras localidades así como su distribución particular, lo hacen un modelo interesante en el estudio de la estructura poblacional de moluscos de lomas. Sin embargo su endemismo y mermada distribución la colocan en estado de peligro latente.

5.1 Análisis Morfométrico

Los moluscos en general y los gastrópodos en particular muestran una diversidad fascinante de estructuras elaboradas. Especies relacionadas usualmente difieren en los parámetros del desarrollo de la concha produciendo una variedad de formas que están relacionadas principalmente a factores ambientales. Las conchas además proveen información relevante usada para la taxonomía y la inferencia filogenética, así como para el estudio poblacional. La morfología de la concha que preserva el registro ontogenético es el principal campo de la morfometría (Madec *et al.* 2003), por lo que se decidió estudiar las diferencias morfométricas entre los morfotipos.

El análisis morfométrico reveló la presencia de dos morfotipos, uno habitando Ancón y Pasamayo, y el otro localizado en Lachay y Cerro de Agua. Las diferencias entre los morfotipos se centran principalmente en el tamaño de la concha (altura y diámetro) y en la ornamentación (número y diámetro de las costillas). El análisis de componentes principales se realizó para encontrar las diferencias entre los individuos de todas las poblaciones encontrando diferencias principalmente en la ornamentación. El análisis de discriminantes canónicos evalúa las diferencias de los individuos asignados a las poblaciones previamente por lo que los grupos de morfotipos quedaron aún más diferenciados.

Se ha observado que condiciones más húmedas favorecen un mayor crecimiento de la concha del molusco. La variación en la apertura se ha interpretado como una adaptación contra la pérdida de agua o contra los depredadores. Se ha encontrado que especies de moluscos xerófilos tienden a tener un área de abertura menor (Goodfriend, 1986). La población de Pasamayo ubicada en una zona de mayor altitud (400-700 msnm), y humedad presentó un tamaño mayor (altura y diámetro), lo que coincide con lo observado por Goodfriend (1986) quien indica que poblaciones sometidas a mayor humedad poseen un mayor crecimiento de la concha.

En el caso de la ornamentación, ésta puede ser respuesta a demandas estructurales del ambiente incluyendo camuflaje y defensa contra los depredadores y parásitos (Schilthuizen, 2003), selección sexual o adaptación (Pfenninger *et al.*, 2005). En otros casos, la divergencia ecológica aparece como insuficiente para explicar la gran diversidad de formas. Para *B. scalariformis*, se encontró que la ornamentación es la característica más sobresaliente permitiendo diferenciar visualmente a ambos morfotipos: Ancón-Pasamayo y Lachay-Cerro de Agua.

Parece posible entonces que el aislamiento geográfico y las diferentes condiciones presentes en Ancón-Pasamayo (mayor altitud y humedad) y en Lachay-Cerro de Agua (menor altitud y humedad) hayan contribuido enormemente en la diferenciación de los morfotipos. Debido a la distribución característica de los moluscos terrestres y su baja capacidad de dispersión es posible también que existan diferencias genéticas en sus poblaciones, debido al aislamiento geográfico, el cual es el principal factor para el desarrollo de eventos de vicarianza (Van Riel *et al.* 2003).

5.2 Análisis Molecular

Para evaluar las diferencias genéticas entre los morfotipos se trabajó con el gen 16S rRNA, el cual ha sido utilizado exitosamente en el estudio genético de poblaciones de moluscos terrestres. El contenido de adenina y timina encontrado (70%) es alto, sin embargo concuerda con lo indicado por Hatzoglou *et al.* (2005) para el caso del caracol *Albinaria*. Este exceso de A-T también fue reportado por Lydeard *et al.* (2000), quienes indican que a pesar de ser un valor elevado, es menor que el valor encontrado en la clase Insecta.

Al revisar el alineamiento de las secuencias, se observó que la mayoría de *gaps* formados eran producidos por los grupos externos: *B. sordidus*, *B. conspersus* y *B. modestus*. Se observó también que existían secuencias de individuos morfológicamente parecidos a *B. scalariformis* pero cuyas secuencias de 16S rRNA eran idénticas a *B. sordidus*. Las secciones primera y final del alineamiento corresponden a segmentos bien conservados y verifican la efectividad de los *primers* específicos diseñados por Ramírez (2004). Los morfotipos presentaron similitud en sus secuencias, y no se observó una sola secuencia compartida entre ambos morfotipos.

Para la elección del modelo de sustitución nucleotídica se procedió según lo propuesto por Posada & Buckley (2004) quienes comentan que la aproximación actual en la elección del modelo ("*Hierarchical Likelihood ratio test*") no es la estrategia óptima y que los métodos que usan el criterio de información de Akaike o los análisis bayesianos ofrecen ventajas importantes frente al método actual. Por ello, se prefirió usar el criterio de información de Akaike implementado en el software Modeltest 3.7.

5.2.1 Filogenia intraespecífica

Todos los análisis filogenéticos (Neighbourhg Joining, Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud, y el análisis Bayesiano) demostraron la presencia de dos clados separados dentro de *B. scalariformis*, los cuales corresponden a los morfotipos Ancón-Pasamayo y Lachay-Cerro de Agua. La concordancia en los resultados así como el fuerte sustento de los clados nos indica que existen dos linajes evolutivos diferentes dentro de *B. scalariformis* que corresponden a los morfotipos descritos.

Un resultado similar lo encontramos en Pfenninger & Magnin (2001) quienes encontraron la presencia de dos clados de haplotipos altamente divergentes dentro de la especie *Candidula unifasciata*, siendo esta división concordante con las diferencias morfológicas, y proponiendo la existencia de dos linajes evolutivos diferentes.

El análisis filogenético también diferenció en todos los casos a 7 individuos de *B. scalariformis* que quedaron en el clado de *B. sordidus*. El grupo de *B. sordidus* presenta varios orígenes, y no parece ser un grupo natural, su estudio se revela como interesante pero va más allá de los límites de esta investigación. Ramírez (2004) postuló que los límites de especie entre *B. sordidus*, *B. scalariformis* y *B. modestus* aún no se encuentran bien resueltos (agrupando a estas tres especies en el "Complejo *Bostryx modestus*"). Los resultados indican la posibilidad de hibridación interespecífica (introgresión) entre *B. sordidus* y *B. scalariformis*. Otra posibilidad es que los individuos H17 pertenezcan a *B. sordidus*, y la causa del parecido de sus conchas a las de *B. scalariformis* se deba a la plasticidad ecológica que posee esta especie, según lo indicado por Ramírez (2004). Es necesario del uso de otro marcador molecular para resolver este problema.

Con esta investigación se actualizan los datos presentados por Ramírez (2004), quien indicó que sólo existían especies de *B. sordidus* en Ancón y ocupando la parte oriental de la loma, ahora se conoce que individuos de *B. scalariformis* pero con secuencias muy relacionadas a *B. sordidus* se encuentran también en la localidad de Pasamayo y en la cara occidental (que recibe mayor humedad) de la loma.

Los resultados concuerdan con lo obtenido por Ramírez (2004), quien evaluó la filogeografía de las especies de *Bostryx* de la costa peruana. En ese trabajo, la autora afirma que la especie *B. scalariformis* es ya una especie diferenciada, sin embargo sólo pudo utilizar individuos de un morfotipo, por lo que no observó las diferencias entre todas las poblaciones del molusco.

Es posible observar que la topología en los árboles no se resuelve bien hacia los extremos de las ramas, esto debido a que estamos frente a una filogenia intraespecífica donde se espera poca divergencia entre los taxa. La topología de los árboles encontrados nos revela la forma "en estrella" (Avice, 2000), de la cual se puede inferir la existencia de un evento de cuello de botella genético seguido de una expansión súbita, en otras palabras pocas ramas han originado la diversidad genética actual (Avice, 2000).

5.2.2 Análisis poblacional

Dentro de las poblaciones de *B. scalariformis* se encontraron 17 haplotipos para las 51 secuencias estudiadas, la diversidad genética resultó alta 0.896 (89.6%) y no se encontraron haplotipos compartidos entre los morfotipos. La alta diversidad genética puede ser explicada por la estructura particular de las poblaciones de los pulmonados que puede ayudar a mantener las diferencias moleculares entre los haplotipos del DNA mitocondrial (Thomaz *et al.* 1996).

La ausencia de haplotipos compartidos entre Ancón-Pasamayo y Lachay-Cerro de Agua, junto con la información resultante del análisis filogenético nos indica que no existe flujo génico actual entre ambos morfotipos. La principal causa parece ser la gran barrera que representa el desierto costero.

El análisis de "networks" resulta más fino en el caso del estudio poblacional y muestra en detalle las diferencias entre los individuos de *B. scalariformis*. Entre ambos morfotipos la diferencia resultó de 11 pasos mutacionales. La presencia de un haplotipo compartido entre Lachay y Cerro de Agua implicaría flujo génico reciente o una divergencia aún incipiente entre estas poblaciones. Por otro lado entre Ancón y

Pasamayo no existen haplotipos compartidos por lo que es posible que su divergencia haya sido más antigua.

La diferenciación entre las poblaciones quedó demostrada con el estadístico *Fst*, este estadístico además representa la cantidad de flujo génico que existe entre las poblaciones (Wright, 1965). Se observó que el flujo génico entre los morfotipos estaba restringido, pero no dentro del morfotipo Lachay-Cerro de Agua, posiblemente porque la separación geográfica entre sus poblaciones es de data reciente. Lo contrario sucede en Ancón-Pasamayo, donde el valor de *Fst* es más alto, para explicar este caso recuérdese que la geografía de los hábitats de ambos morfotipos es algo diferente, Lachay y Cerro de Agua se encuentran casi al mismo nivel de altitud y el terreno no presenta depresiones drásticas. Si la extensión de las lomas fue mayor en el pasado, resultaría en una continuidad vegetal que podría haber permitido el flujo génico entre los individuos de ambas poblaciones. Al contrario, en las poblaciones de Ancón y Pasamayo los individuos se ubican en una mayor altitud y la separación entre ambas lomas es una depresión drástica (conocida como Pampa de Tomaycaya, un paisaje absolutamente desértico); debido a la poca habilidad de dispersión de los moluscos, el desplazamiento entre estas dos poblaciones resulta menos probable, permitiendo la divergencia entre ambos grupos de individuos.

Del AMOVA rescatamos que principalmente la variación encontrada está entre los grupos propuestos: Cerro de Agua-Lachay, Pasamayo, Ancón y Pasamayo H17, lo que concuerda con los datos encontrados anteriormente tanto en el análisis intraespecífico como en el caso de los *Fst*. Cerro de Agua-Lachay pueden ser considerados como un grupo único, mas no así Pasamayo y Ancón debido a la clara separación de sus haplotipos.

5.2.3 Patrones demográficos

La mayor diversidad nucleotídica, la mayor cantidad de sitios polimórficos, y la mayor cantidad de diferencias a pares se encuentran en la localidad de Lachay, indicando una población más estable. Los menores valores son para Pasamayo y Ancón, lo que implica poblaciones más aisladas y con mayores presiones ecológicas.

Avise (2000), analizando la diversidad genética (H) y la diversidad nucleotídica (π), describe los posibles escenarios demográficos que resultan al comparar ambos valores: Poblaciones con una alta diversidad genética y nucleotídica son poblaciones estables de tamaño constante con un número efectivo alto. Poblaciones con baja diversidad nucleotídica y genética son poblaciones que han experimentado un cuello de botella genético prolongado o severo. Una alta diversidad genética y una baja diversidad nucleotídica sugiere un rápido crecimiento poblacional de una población ancestral de pocos individuos, el bajo número efectivo en la población ancestral puede haber sido causado por un cuello de botella, sin embargo la población es capaz de recuperarse recuperando diversidad genética vía acumulación de pocas mutaciones. Un bajo valor de diversidad genética junto con una alta diversidad nucleotídica es el resultado de un cuello de botella que elimina a varios haplotipos, lo que no repercute directamente en la diversidad nucleotídica.

Utilizando la información presentada se puede inferir con nuestros datos la historia demográfica en las poblaciones de *B. scalariformis*: Ancón presenta una baja diversidad genética y nucleotídica evidenciando un cuello de botella genético. Pasamayo presenta un valor alto de diversidad genética y nucleotídica, pero si no consideramos al haplotipo 17, éstas disminuyen sugiriendo también la ocurrencia de un cuello de botella. Cerro de Agua presenta una alta diversidad genética y una baja diversidad nucleotídica concordando con la hipótesis de expansión poblacional a partir de población de tamaño efectivo pequeño, el mismo caso ocurre con la población de Lachay.

Rogers & Harpending (1992) demostraron que los eventos de expansión poblacional quedan grabados en la estructura genética de las poblaciones. Si la población ha sido estable a lo largo del tiempo entonces presentará una curva de tipo multimodal al comparar las diferencias a pares, con diferentes haplotipos con similar frecuencia. Al contrario, si la población sufrió una expansión poblacional, ésta presentará una curva unimodal debido a la gran frecuencia de haplotipos con pocas diferencias entre si al derivar de un solo haplotipo ancestral.

Las diferencias a pares dentro de las poblaciones evidencian cierto rasgo de expansión poblacional luego de un evento de "cuello de botella" (*bottleneck*) en las poblaciones de Cerro de Agua y Pasamayo. Una mayor frecuencia de haplotipos con pocas diferencias es consistente con la topología en estrella encontrada en los *networks* para Cerro de Agua pero no concuerda con lo observado en Pasamayo.

El estadístico F_s de F_u presentó valores negativos lo que puede significar un rastro de expansión poblacional (Fu, 1995), y resultó significativo en la población de Cerro de Agua y en el grupo Lachay-Cerro de Agua. Este resultado, junto a las *mismatch distribution* de ambos grupos, soporta la hipótesis de expansión súbita luego de sufrir un cuello de botella genético.

5.2.4 Filogeografía

La arquitectura de las especies está modelada por los procesos geológicos, climáticos históricos y puede ser evidenciada mediante análisis filogenéticos de las secuencias de DNA (Avice, 2000). Las grandes oscilaciones climáticas en los últimos dos millones de años causaron cambios en los rangos de supervivencia de varios taxa. Como resultado de esta dinámica pasada la diversidad genética dentro de las especies está altamente estructurada (Hewitt, 2004). La glaciación pleistocénica ha sido identificada como un factor importante para la formación de los patrones filogeográficos en diversos taxa (Neiman & Lively, 2004).

El comienzo de la aridez en la costa occidental de América del Sur data del Plioceno inferior (Hartley & Chong, 2002), pero ha sido sugerido que la región pasó por periodos alternantes de condiciones secas y húmedas durante el pleistoceno (Simpson, 1975).

La geografía de la región ha estado a merced de un componente climático importante como el evento El Niño/Oscilación Sur. Campbell (1982) encontró que los eventos El Niño podrían haber sido anuales durante los periodos glaciales del Pleistoceno, lo cual puede haber mantenido extensiones mayores de lomas. Se ha sugerido que El Niño ha jugado un papel importante en la composición y estructura de las Lomas (Dillon *et al.*, 2003).

Si comparamos el árbol de la Figura 25 con los datos obtenidos por Lea *et al.* (2000) y Tudhope *et al.* (2001) (Fig. 26), encontramos que El Niño habría sido la causa posible de la expansión demográfica súbita de *B. scalariformis*. Tudhope *et al.* (2001) con información obtenida a partir de corales de Nueva Guinea propuso la relación de un evento El Niño excepcional en el último periodo interglacial (118-128 mil años atrás), que coinciden con mayores temperaturas superficiales en el mar con respecto al presente. Ramírez (2004) relacionó estos datos con los tiempos de divergencia en varias especies de *Bostryx* comparando las relaciones evolutivas de miembros del género con los datos de temperatura del mar Pacífico ecuatorial occidental, en el penúltimo periodo interglacial y encontrando la influencia del evento El Niño en la filogenia del género. La región habría pasado 50 mil años de condiciones hiperáridas (Lea *et al.* 2000) que habrían reducido las poblaciones del molusco. El periodo interglacial que prosiguió tuvo eventos El Niño extraordinarios produciendo la expansión de las lomas costeras.

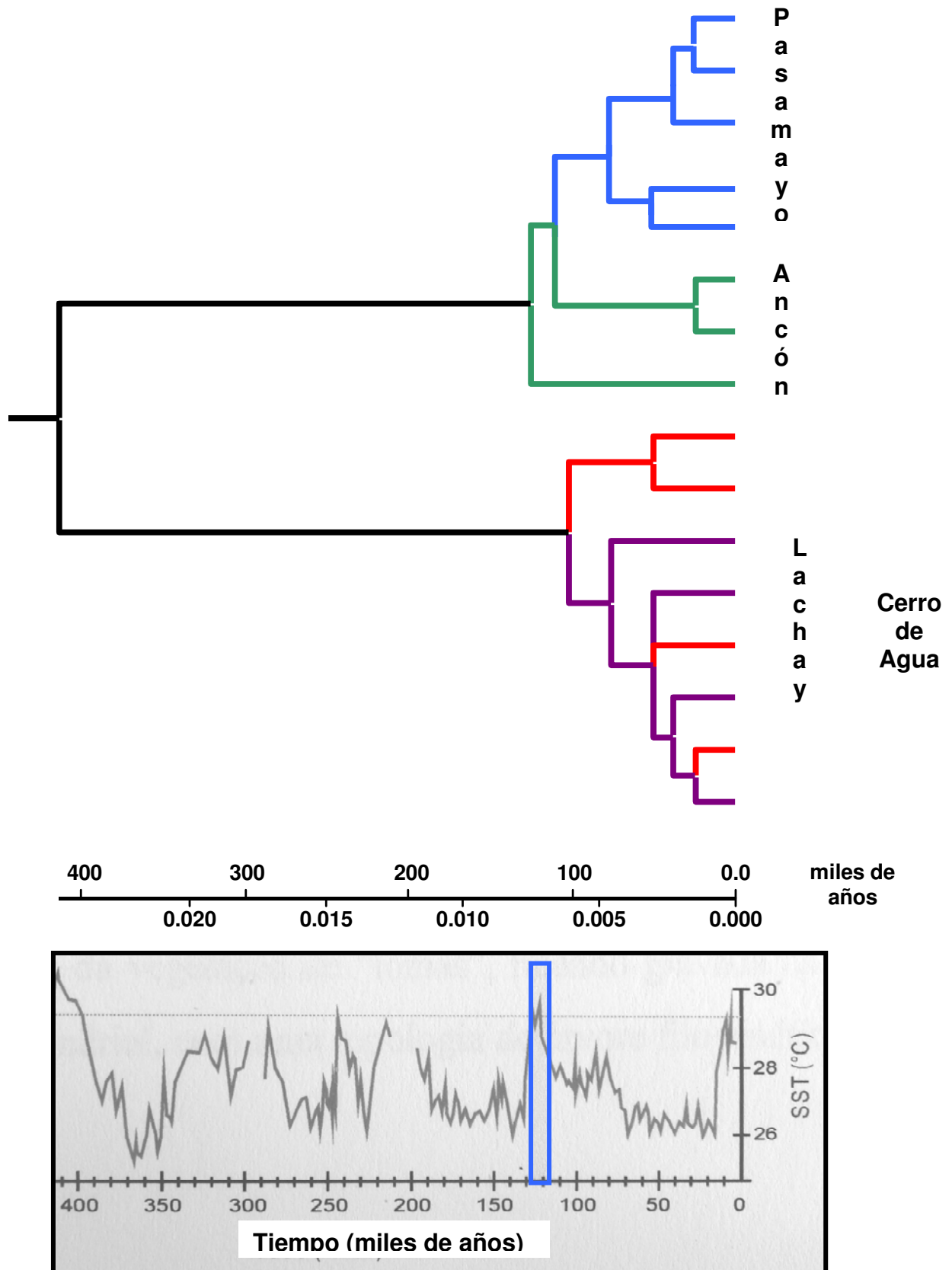
La Torre *et al.* (2002), utilizando muestras fósiles, encontraron que la precipitación incrementó en el desierto de Atacama hace 11.8 a 10.5 miles de años permitiendo un aumento en la riqueza de especies y el crecimiento de la vegetación, para luego dar lugar a un periodo seco de forma abrupta, evidenciado en el decremento de la abundancia de herbáceas y riqueza de especies, el cual ocurrió hace 10.5 miles de años. Además, los autores señalaron la presencia de ambientes húmedos para el desierto de Atacama hace 40 mil años basándose en muestras fósiles vegetales, esta fecha coincide con lo presentado por Tudhope *et al.* (2001) (38 – 42 mil años) donde ocurrió otro evento El Niño extraordinario.

Cano *et al.* (1998) confirmaron el incremento en abundancia relativa de la vegetación herbácea en la zona de Lachay durante el fenómeno El Niño del año 1997 , sobre todo en las solanáceas *Nicotiana paniculata*, *Nolana humifusus* y *Solanum lycopersicon*. La mayoría de individuos de *B. scalariformis* se encontró asociado a herbáceas (especialmente solanáceas), por lo que se presume que la mejora de las condiciones permitió la expansión de las lomas y la expansión demográfica súbita.

Toda esa historia de eventos climáticos está conservada en la arquitectura genética de las poblaciones de *B. scalariformis*. La presión de las condiciones hiperáridas afectaron el tamaño poblacional de *B. scalariformis*, además de separar a las poblaciones de sus morfotipos. Los eventos El Niño extraordinarios descritos permitieron el crecimiento poblacional y la aparición de nuevos haplotipos. Los clados de haplotipos en los árboles presentaron patrones de expansión súbita implicando también la expansión del área que habitan. Es impresionante observar cómo los cambios climáticos pueden verse reflejados en la arquitectura genética de las poblaciones de moluscos. Este ciclo de cambios climáticos permite el aislamiento y expansión de las poblaciones del molusco, y concuerda con la hipótesis de poblaciones con alta diversidad genética generadas a partir de un número efectivo pequeño.

Así como los cambios descritos anteriormente han influenciado el paisaje desértico costero y permitido la expansión de las poblaciones de *Bostryx scalariformis*, la diferenciación entre las poblaciones ha sido posible debido al desierto costero que ha provocado aislamiento geográfico e impedido el flujo génico. Las dunas de las lomas presentan un origen pleistocénico (Noller, 1993). Las lomas de Pasamayo y Ancón no tienen vegetación leñosa nativa, sino introducida, y poseen gran cantidad de conchas, entre estas existen especies que sólo viven en lomas con vegetación perenne como *B. conspersus* por lo que se piensa que estas lomas ya fueron exuberantes en el pasado (Ramírez, 2004), además se ha encontrado conchas de *B. turritus* y *Naesiotus haasi* que sólo son encontradas en lomas más al norte y en ambientes andinos (Breure, 1978) indicando que estas lomas habrían sido extensas debido a los eventos El Niño (Ramírez, 2004).

Figura 26. El árbol de la figura anterior mostrando la divergencia entre las poblaciones de *B. scalariformis*, ahora comparado con los datos encontrados por Lea *et al.* (2000) de temperaturas superficiales del mar (SST), la barra gris representa el aumento de la temperatura hace 130 mil años que coincidió con eventos el Niño extraordinarios (Modificado de Ramírez, 2004).



El ambiente juega un rol importante en los procesos evolutivos, las poblaciones son unidades dinámicas adaptadas fisiológica y genéticamente a sus ambientes y son sensibles a las condiciones ambientales. Paisajes montañosos, aumento de aridez y poca vagilidad conllevaron a altos niveles de endemismo en una escala geográfica fina en caracoles del género *Pyrgulopsis* a lo largo del río Colorado en Norte América (Hurt, 2004). Esa investigación mostró altos niveles de divergencia genética entre poblaciones co-específicas cercanas, indicando que el aislamiento debe haber sido por un largo periodo. Además del aislamiento, la especificidad del hábitat puede haber mantenido la variación haplotípica, la cual es un signo positivo de la futura persistencia de los moluscos.

La barrera desértica también puede afectar a otras especies, por ejemplo Chapplea *et al.* (2004) encontraron estructura filogeográfica considerable dentro del lacértido *Egernia inornata* que habita el desierto australiano, o Gengler-Nowak (2002) quien encontró que las especies de *Malesherbia* de la costa sur del Perú y Norte de Chile evolucionaron en el Pleistoceno superior debido a las condiciones climáticas de aridez.

La historia evolutiva encontrada es muy interesante, sobre todo porque todos estos procesos han ocurrido en una región de menos de 100 kilómetros lineales. Esto también implica que los mismos patrones pueden ser encontrados para otras especies de poca vagilidad como invertebrados o reptiles pequeños.

5.2.5 Especiación

La definición del concepto de especie es uno de los problemas más trascendentales y antiguos en las ciencias biológicas (Mayr, 1992). Si observamos los datos de distancias genéticas encontradas en el presente trabajo para las poblaciones de *B. scalariformis*, observamos que éstas son bajas (menores de 0.1), aunque distancias genéticas pequeñas se han observado entre especies diferentes (Bessega *et al.*, 2000). Es posible que el tamaño de muestreo afecte el hallazgo de haplotipos diferentes de baja frecuencia (Turan, 2006). Sin embargo, también puede significar el resultado de los cuellos de botella genéticos que pasó la población y que han mermado su diversidad nucleotídica entre los haplotipos (García *et al.*, 2003).

Por lo pronto, conocemos que a pesar que tienen zonas de contacto con otras especies, los haplotipos de *B. scalariformis* forman un clado monofilético. Evidencia adicional para el proceso de especiación puede ser inferida mediante diferencias morfométricas en el tracto genital que permitirían el aislamiento reproductivo, aunque grandes diferencias morfométricas no implican aislamiento reproductivo (Van Riel *et al.* 2003).

Conocemos también que no existe flujo génico actual entre los morfotipos según lo reflejado en los análisis de filogenia intraespecífica, *networks* y *Fst*, esto debido a la alopatría que produce la división entre ambos clados (morfotipos). Los moluscos terrestres, como otros invertebrados con baja capacidad de dispersión, tienen mucha probabilidad de sufrir especiación en contextos insulares debido al aislamiento poblacional (Huanga *et al.* 2005).

El concepto biológico de especie propone el aislamiento reproductivo como factor principal en el origen de las especies (Mayr, 1963). Sin embargo, el aislamiento geográfico de las poblaciones no permite una real evaluación del aislamiento reproductivo (conocer si en condiciones naturales estas poblaciones se cruzan entre si, si tuvieran oportunidad de hacerlo). Por otro lado, tenemos el concepto evolutivo de especie (Simpson, 1961; Wiley, 1981), por el cual se propone que una especie es un linaje que evoluciona separadamente de otros linajes, manteniendo su identidad, tendencias evolutivas y destino propio a través del tiempo. Si aplicamos este concepto a ambos morfotipos de *B. scalariformis* no sería descabellado llamarlos especies.

Las diferencias genéticas y morfológicas demuestran la presencia de dos clados, dos linajes que se separaron hace 400 mil años aproximadamente y que no poseen flujo génico actual debido a sus poblaciones alopátricas. Además, en el árbol se observa que ambos clados han pasado por eventos de cuello de botella seguidos de expansión poblacional súbita pero que no resultaron en una mezcla de individuos entre sus poblaciones, es muy probable que nos encontremos antes dos especies distintas.

5.2.6 Conservación

A pesar de que se considera que la definición de especie no puede ser propuesta sólo en base a la proporción de diferencias genéticas, el conocimiento de la estructuración genética contribuye enormemente en el entendimiento del origen y los límites de las especies. Con todo, el enfoque de la conservación de las especies está siendo modificado para conservar poblaciones geográficamente divergentes y genéticamente diferenciadas con una historia evolutiva en común (Mata, 2005).

Particularmente en situaciones donde es necesaria la decisión del esfuerzo de conservación entre varias poblaciones, la información concerniente a la variación genética puede ser un buen criterio para guiar esta elección (Holland & Hadfield, 2002), por lo que el conocimiento de la estructura filogeográfica de las poblaciones fragmentadas es vital para la formulación de estrategias de conservación. El manejo efectivo de especies amenazadas requiere de información confiable del hábitat, estructura poblacional y las relaciones taxonómicas. Los esfuerzos de manejo deben mantener la máxima diversidad genética preservando todas las poblaciones posibles, particularmente las que poseen haplotipos altamente divergentes.

Las Unidades Evolutivamente Significantes (ESU) son poblaciones de organismos que son consideradas distintas para propósitos de conservación (Moritz, 1994). El término puede ser aplicado a especies, subespecies, razas geográficas o poblaciones. La definición de ESUs sigue los siguientes criterios: Separación geográfica, diferenciación genética usando marcadores neutros (como el gen mitocondrial 16S rRNA) causada por las restricción de flujo génico y adaptaciones fenotípicas locales.

Si no es posible llegar a determinar si estamos frente a especies diferentes, por lo menos es factible proponer dos unidades evolutivamente significantes, con destinos evolutivos diferentes y que necesitan ambas de esfuerzos para su conservación.

La destrucción de los ecosistemas de lomas no es actual, Lanning (1965) observó que los primeros pobladores de la costa central de Perú se asentaron en zonas cubiertas por vegetación y que las lomas fueron ocupadas entre 7000 y 3000 A. C. Su subsistencia se debió a lo que las lomas proveían, y en la dieta de origen animal

podrían estar incluidos los moluscos terrestres. El cambio climático puede haber tenido un gran efecto en Pasamayo-Ancón exterminando la mayor parte de la biodiversidad (Ramírez, 2004).

Por otro lado, mientras que el nivel de conectividad entre las poblaciones humanas se incrementa, las poblaciones naturales de plantas y animales se continúan aislando drásticamente, la superficie de la tierra está dividida por aproximadamente 28 millones de kilómetros en carreteras que restringen el movimiento de varias especies (Epps *et al.* 2005). Esta pérdida de conectividad puede impedir el intercambio de individuos entre las poblaciones acelerando la pérdida de diversidad genética por deriva. Los autores concluyen que las barreras provocadas por humanos reducen la estabilidad de los ecosistemas. La modificación y destrucción de los ecosistemas vegetales costeros causada principalmente por humanos y la introducción de ungulados (caballos, cabras, vacas), ya produjo la extinción local del bulimúlido *Leptaxis azorica* en las islas Azores (Brook & McArdle, 1999). En el transcurso del trabajo de tesis, y a pesar del esfuerzo de búsqueda sólo fue posible encontrar individuos de *B. scalariformis* hacia el lado derecho de la carretera Panamericana Norte.

Pasamayo y Ancón son lomas de vegetación herbácea donde fueron encontrados vivos las especies *B. sordidus* y *B. scalariformis*. Estas lomas son cortadas por la carretera Panamericana Norte (km 56 al km 65) aunque no sufren de influencia directa humana actual por su lejanía de la ciudad y su topografía particular, como otras ecosistemas de lomas cercanos a la ciudad de Lima y que ahora son de asentamientos humanos (Amancaes, Atocongo, Cerro San Cristóbal).

Lachay es el único ecosistema de lomas elevado a la altura de Reserva Nacional, y Cerro de Agua es una loma pequeña que es usada por los pobladores para el pastoreo de ganado. Aunque se encontró haplotipos propios para esta localidad, la mayoría de individuos comparte haplotipos con Lachay por lo que por lo menos una de las fuentes de diversidad genética está asegurada.

La biota continental reducida a hábitats fragmentados debe tener prioridad para su protección debido a que es poco probable que persistan por un largo tiempo como poblaciones aisladas geográficamente. Las poblaciones de *B. scalariformis* que han

visto reducida su distribución por la influencia humana (ganadería, carreteras), además de su ya pequeña distribución, deben ser conservadas debido a su capacidad de mostrarnos la historia de la región costera.

La conservación de la especie permite además la conservación del hábitat. Hemos observado cómo las lomas se convierten en focos de diversidad específica, lo cual puede estar reflejado en otras especies animales y vegetales. La destrucción del hábitat no permitirá la conservación de las especies que se originan y contribuirá con la desaparición de estos oasis de diversidad que son capaces de contarnos una historia fascinante de eventos extraordinarios, cambios climáticos y poblacionales: la historia de nuestro hogar.

6. CONCLUSIONES

Existen dos morfotipos dentro de la especie *Bostryx scalariformis* (Broderip in Broderip & Sowerby, 1832), diferenciados principalmente por la ornamentación de sus conchas. Un morfotipo habita las localidades más al norte (Lachay y Cerro de Agua) y otro morfotipo habita las localidades más al sur (Ancón - Pasamayo).

La diversidad genética es alta debido a los episodios de expansión poblacional que ocurrieron por los cambios climáticos históricos. El Pleistoceno fue una época de diversificación para *Bostryx scalariformis*, cuya estructura genética guarda relación con los procesos geológicos y climáticos en la región.

La filogenia de haplotipos basada en polimorfismos del marcador mitocondrial 16S rRNA genera dos grupos diferentes y que no comparten haplotipos, estos grupos coinciden con los morfotipos descritos. También se observó la presencia de un haplotipo altamente divergente perteneciente a la población de Pasamayo.

La especie presenta estructuración geográfica de la diversidad genética, las poblaciones al norte quedan diferenciadas de las del sur, tanto morfológica como genéticamente.

Existe aislamiento geográfico entre las poblaciones, además de restricciones en el flujo génico, debido a la barrera del desierto costero que separa a las lomas.

Existen dos unidades significativas para la conservación de la especie *Bostryx scalariformis*, cada una corresponde a los morfotipos encontrados.

Las lomas costeras son focos de diversidad y necesitan de esfuerzos para su conservación.

Bostryx scalariformis probó ser muy útil para el estudio filogeográfico en la región costera de Perú.

7. RECOMENDACIONES

La construcción de las filogenias utilizando otros marcadores neutros (mitocondriales o nucleares) es recomendable para verificar las diferencias entre los individuos de *B. scalariformis*.

Un mayor número de individuos para el estudio sería conveniente, sin embargo se debe medir el esfuerzo de colecta para no terminar con estas poblaciones ya afectadas por la influencia humana.

Son necesarias mayores investigaciones para demostrar la importancia de los ecosistemas de lomas como generadores de diversidad y como fuente de información sobre patrones histórico-geográficos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, P. & J. Arrarte. 1974. Moluscos de las Lomas Costeras del Perú. *Anales Científicos*. UNALM 12(34): 93-98.
- Aguilar, P. 1976. Fauna desértica costera peruana I. Invertebrados más frecuentes en las Lomas. *Rev. Per. Ent.* 19(1): 67-70.
- Arntz, W. & E. Fahrbach. 1996. El Niño. Experimento climático de la naturaleza. Causas físicas y efectos biológicos. Fondo de Cultura Económica, México. 312 pp.
- Avise, J., J. Arnold, R. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. Neigel, C. Reeb, N. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489-522.
- Avise, J. 1996. Toward a regional conservation genetics perspective: Phylogeography of faunas in the Southern United States. pp. 431-470. *In: Avise, J. & L. Hamrick (eds.): Conservation genetics. Case history from nature.* Chapman & Hall. New York.
- Avise, J. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species.* Harvard University Press.
- Avise, J. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution.* 2 ed. Chapman & Hall, New York.
- Bandelt, H., P. Forster, A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

- Bessega, C., L. Ferreyra, J. Vilardi, B. Saidman. 2000. Unexpected low genetic differentiation among Allopatric species of section Algarobia of *Prosopis* (Leguminosae) *Genetica* 109(3): 255-266.
- Bouchet, P. & J. Rocroi. 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia* 47(1-2):1-397.
- Breure, A. 1979. Systematics, phylogeny and zoogeography of Bulimulinae (Mollusca). *Zoologische Verhandelingen* 168: 1-215.
- Broderip, W. & G. Sowerby. 1832. New species of Mollusca and Conchifera collected by Mr. Cuming. *Proceedings of the Committee of Science and Correspondence of the Zoological Society of London* 2: 31.
- Brook, F & B. McArdle. 1999. Morphological variation, biogeography and local extinction of the northern New Zealand landsnail *Placostylus hongii* (Gastropoda: Bulimulidae). *Journal of The Royal Society of New Zealand* 29 (4): 407-434.
- Campbell, K. 1982. Late Pleistocene events along the Coastal Plain of Northern South America. *In: Biological Diversification in the Tropics* (ed. Prance, G.), pp. 423-440. Columbia University Press, New York. USA.
- Cano, A., J. Roque, M. Arakaki, C. Arana, M. La Torre, M. Llerena, N. Refulio. 1999. Diversidad florística de las Lomas de Lachay (Lima) durante el evento "El Niño 1997 – 1998". *Rev. Peru. Biol.* Vol. Ext.: 125-132.
- Chapplea, D. J. Keogha, M. Hutchinson. 2004. Molecular phylogeography and systematics of the arid-zone members of the *Egernia whitii* (Lacertilia: Scincidae) species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 549–561.
- Chiba, S. 1999. Accelerated evolution of land snails *Mandarina* in the oceanic Bonin Islands. *Evolution* 53: 460-471.

- Clapperton, C. 1993. Quaternary geology and geomorphology of South America. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Congreso de la República del Perú. 1993. Constitución Política del Perú.
- Convention of Biological Diversity. 1992. Convenio sobre Diversidad biológica. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- Davey, M., L. O'Brien, N. Ling, D. Gleeson. 2003. Population genetic structure of the Canterbury mudfish (*Neochanna burrowsius*): Biogeography and conservation implications. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37: 13-21.
- Dillon, M. 1997. Lomas Formations-Peru. In: *Centres of Plant Diversity, A Guide and Strategy for their Conservation* (eds. Davis, S., Heywood, V., Herrera-McBryde, O., Villa-Lobos, J., Hamilton, A.), pp. 519-527. WWF, Information Press, Oxford, U.K.
- Dillon, M., M. Nakazawa, S. Leiva. 2003. The Lomas formations of coastal Peru: Composition and biogeographic history. *Fieldiana Botany* 43:1-9.
- Epps, E., P. Palsbøll, J. Wehausen, G. Roderick, R. Ramey, D. McCullough. 2005. Highways block gene flow and cause a rapid decline in genetic diversity of desert bighorn sheep. *Ecology Letters* 8: 1029–1038.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the *bootstrap*. *Evolution* 39:783-791.
- Ferreyra, R. 1953. Comunidades vegetales de algunas lomas costaneras del Perú. *Bol. Est. Exp. Agr. La Molina* 53.
- Fu, Y. 1997. Statistical neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

- Garcia, J., K. Maekawa, T. Miura, R. Constantino, T. Matsumoto. 2003. Genetic distance between nests and population genetic diversity of *Nasutitermes nigriceps* and *N. corniger* (Isoptera: Termitidae) in Guatemala using AFLP markers. *Sociobiology* 41(3): 663-672.
- Gengler-Nowak, K. 2002. Reconstruction of the biogeographical history of Malesherbiaceae. *The Botanical Review* 68: 171-188.
- Goodfriend, G. 1986. Variation in land snail shell form and size and its causes: A review. *Syst. Zool.* 35(2): 204-223.
- Gray, M. G. Burger, B. Lang. 1999. Mitochondrial Evolution. *Science* 283:1476-1481.
- Hall, P., S. Walker, K. Bawa. 1996. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree *Pithecellobium elegans*. *Conservation Biology* 10(3): 757-768.
- Hartley, A., & G. Chong. 2002. Late Pliocene age for the Atacama Desert: Implications for the desertification of western South America. *Geological Society of America*, 30, 43-46.
- Hatzoglou, E., G. Rodakis, R. Lecanidou. 1995. Complete Sequence and Gene Organization of the Mitochondrial Genome of the Land Snail *Albinuria coerulea*. *Genetics* 140: 1353-1366.
- Hewitt, G. 2004. The structure of biodiversity – insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology*, 1:4.
- Hidalgo, J. 1893 – 1900. Obras Malacológicas III. Descripción de los moluscos recogidos por la Comisión Científica enviada por el Gobierno Español a la América Meridional. *Mem. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. Madrid* 19(1): 1-608.

- Holland, B. & M. Hadfield. 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology* 11: 365-375.
- Huang, X. & A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-877.
- Huanga, Z., N. Liua, T. Zhou, B. Ju. 2005. Effects of environmental factors on the population genetic structure in chukar partridge (*Alectoris chukar*). *Journal of Arid Environments* 62: 427–434.
- Huelsenbeck J. & Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17(8):754-5.
- Hugall, A., J. Stanistic, C. Moritz. 2003. Phylogeography of terrestrial gastropods: The case of the *Sphaerospira* lineage and history of Queensland rainforests. pp 270-297. *In*: Lydeard, C. and D. Lindberg (eds.). 2003. *Molecular Systematics and Phylogeography of Mollusks*. Smithsonian series in comparative evolutionary biology. Smithsonian Institution.
- Hurt, C. 2004. Genetic divergence, population structure and historical demography of rare springsnails (*Pyrgulopsis*) in the lower Colorado River basin. *Molecular Ecology* 13: 1173–1187.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16 111–120.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 454–458.
- La Torre, C., J. Betancourt, K. Rylander, J. Quade. 2002. Vegetation invasions into absolute desert: A 45 000 yr rodent midden record from the Calama–Salar de Atacama basins, northern Chile (lat 228–248S). *GSA Bulletin* 114(3): 349–366.

- Lanning E. 1965. Early man in Peru. *Scientific American*, 213(4), 68-76.
- Lea, D., D. Pak, H. Spero. 2000. Climate impact of Late Quaternary equatorial Pacific sea surface temperature variations. *Science* 289 1719-1724.
- Lydeard, C. W. Holznagel, M. Schnare, & R. Gutell. 2000. Phylogenetic Analysis of Molluscan Mitochondrial LSU rDNA Sequences and Secondary Structures. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15(1): 83–102.
- Lydeard, C. & D. Lindberg (eds.). 2003. Molecular Systematics and Phylogeography of Mollusks. Smithsonian series in comparative evolutionary biology. Smithsonian Institution.
- 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.
- Margulis, L. & D. Sagan. 2001. Marvellous microbes. *Resurgence* 206: 10–12.
- Mata, H. 2005. História evolutiva das espécies não-andinas de *Scytalopus* inferida através da variabilidade no DNA mitocondrial. Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Biociências.
- Mayr, E. 1963. Animal Species and Evolution. Harvard University Press. Cambridge.
- Mayr, E. 1992. A local flora and the biological species concept. *American Journal of Botany* 79: 222-238.
- McCarthy, C. 1996. Chromas: version 2.0. Technelysium PTY, Australia.
- McCracken, K., P. W. Johnson, F. Sheldon. 2001. Molecular population genetics, phylogeography, and conservation biology of the mottled duck (*Anas fulvigula*). *Conservation Genetics* 2: 87-102.

- Mena, J., M. Williams, C. Gazzolo, F. Montero. 2007. Estado de conservación de *Melanomys zunigae* (Sanborn 1949) y de los mamíferos pequeños en las Lomas de Lima. *Rev. peru. biol.* 14(2): 201- 207.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 9 (10): 373-375.
- Muñoz-Schick, M., R. Pinto, A. Mesa, A. Moreira-Muñoz. 2001. "Oasis de neblina" en los cerros costeros del sur de Iquique, región de Tarapacá, Chile, durante el evento El Niño 1997-1998. *Rev. chil. hist. nat.* 74(2): 389 – 405.
- Nei, M., T. Maruyama, R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.
- Neiman, M. & C. Lively. 2004. Pleistocene glaciation is implicated in the phylogeographical structure of *Potamopyrgus antipodarum* a New Zealand snail. *Molecular Ecology* 13: 3085–3098.
- Noller, J.S. 1993. Late Cenozoic stratigraphy and soil geomorphology of the Peruvian desert, 3 degrees-18 degrees: a long-term record of hyperaridity and El Niño. PhD Thesis, University of Colorado at Boulder.
- Ono M. 1986. Definition, classification and taxonomic significance of the Lomas vegetation. *In: Taxonomic and Ecological Studies on the Lomas Vegetation in the Pacific Coast of Peru* (ed. Ono, M.), pp. 5_14. Reports for Overseas Scientific Survey. Makino Herbarium, Tokyo Metropolitan University.
- Page, R. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Pfenninger, M. & F. Magnin. 2001. Phenotypic evolution and hidden speciation in *Candidula unifasciata* ssp. (Helicellinae, Gastropoda) inferred by 16S variation and quantitative shell traits. *Mol. Ecol.* 10:2541–2554.

- Pfenninger, M. & D. Posada. 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56(9): 1776–1788.
- Pfenninger, M., D. Posada, F. Magnin. 2003. Evidence for survival of Pleistocene climatic changes in Northern refugia by the land snail *Trochoidea geyeri* (Soós 1926) (Helicellinae, Stylommatophora). *BMC Evolutionary Biology* 3:8.
- Pfenninger, M., M. Hrabáková, D. Steinke, A. Dèpraz. 2005. Why do snails have hairs? A Bayesian inference of character. *BMC Evolutionary Biology* 5:59
- Pilsbry, H. 1895 – 1896. Manual of Conchology, Philadelphia. 10 (2): 1-213.
- Pinceel, J., K. Jordaens, T. Backeljau. 2005. Extreme mtDNA divergences in a terrestrial slug (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae): accelerated evolution, allopatric divergence and secondary contact. *J. Evol. Biol.* 18: 1264–1280.
- Posada, D. & K. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*: 14 (9): 817-818.
- Posada, D. & T. Buckley. 2004. Model Selection and Model Averaging in Phylogenetics: Advantages of Akaike Information Criterion and Bayesian Approaches over Likelihood Ratio Tests. *Syst. Biol.* 53(5):793–808.
- Primack, R. & E. Rodrigues. 2001. Biologia da Conservação. Londrina-Paraná, Brasil.
- Ramírez, R., J. Thome, D. Susanibar, N. Medina, S. Córdova. 2001. O crescimento da cidade e o desaparecimento das populações de moluscos terrestres dos ecossistemas de neblina na costa de Lima (Peru). *In: V Congreso de Ecología do Brasil, UFRGS, Porto Alegre, RS. 04 ao 09 novembro. Resumos, p. 251.*

- Ramírez, R., S. Córdova, K. Caro, J. Duárez. 2003. Response of a land snail species (*Bostryx conspersus*) in the Peruvian central coast Lomas ecosystem to the 1982-1983 and 1997-1998 El Niño events. *Fieldiana* 43: 10-23.
- Ramírez, R. 2004. Sistemática e Filogeografía dos Moluscos do Ecosistema de “Lomas” do Deserto da Costa Central do Peru. Tese do Doutorado em Zoología. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências.
- Reis, R. 1996. LMDis software, disponible al comunicarse con el autor.
- Rohlf, F. 2006. tpsDig 2.1, disponible en: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rogers, A & H. Harpending. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol. Bio. Evol.* 9(3):552-569.
- Ross, T. 1999. Phylogeography and conservation genetics of the Iowa Pleistocene snail. *Molecular Ecology* 8(9):1363-1373.
- Rozas, J., J. Sanchez-Del Barrio, X. Messeguer, R. Rozas. 2003. DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Rundel, P., M. Dillon, B. Palma, H. Mooney, S. Gulmon, J. Ehleringer. 1991. The Phytogeography and Ecology of the Coastal Atacama and Peruvian Deserts. *Aliso* 13(1): 1-50.
- Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharfj, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis, H. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–91.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4):406-425.

- Sandweiss, D. 2003. Terminal pleistocene through mid-holocene archaeological sites as paleoclimatic archives for the Peruvian coast. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 194:23-40.
- Schneider S, D. Roessili, L. Excoffier. 2000 ARLEQUIN: Version 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Schilthuizen, M. 2003. Sexual selection on land snail shell ornamentation: a hypothesis that may explain shell diversity. *BMC Evolutionary Biology* 3:13.
- Simpson, B. 1975. Pleistocene changes in the flora of the high tropical Andes. *Paleobiology* 1:273-294.
- Simpson, G. 1961. Principles of animal taxonomy. Columbia University Press, New York
- Swofford, D. 1998. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.10b. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Takezaki, N., A. Rzhetsky, M. Nei. 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molecular Biology and Evolution* 12: 823-833.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thomaz, D., A. Guiller, B. Clarke. 1996. Extreme Divergence of Mitochondrial DNA within Species of Pulmonate Land Snails. *Proceedings: Biological Sciences* 263 (1368): 363-368.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., D. Higgins. 1998. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24:4876-4882.

- Turan, C. 2006. Phylogenetic relationships of Mediterranean Mullidae species (Perciformes) inferred from genetic and morphologic data. *Scientia Marina* 70(2): 311-318.
- Tudhope, A., C. Chilcott, M. McCulloch, E. Cook, J. Chappell, R. Ellam, D. Lea, J. Lough, G. Shimmield. 2001. Variability in the El Niño-Southern Oscillation through a glacial-interglacial cycle. *Science* 291: 1511-1517.
- Van den Bussche, R., S. Hooper, D. Wiedenfeld, D. Wolfe, S. Sherrod. 2003. Genetic variation within and among fragmented populations of lesser prairie-chickens (*Tympanuchus pallidicinctus*). *Molecular Ecology* 12 (3): 675-683.
- Van Riel, P., K. Jordaens, R. Verhagen, A. Frias Martins, T. Backeljau. 2003. Genetic differentiation reflects geological history in the Azorean land snail, *Leptaxis azorica*. *Heredity* 91: 239–247.
- Wade, C. & P. Mordan. 2000. Evolution within the gastropod molluscs; using the ribosomal RNA gene-cluster as an indicator of phylogenetic relationships. *J. Moll. Stud.* 66:565-570.
- Walter, H. 2004. The mismeasure of islands: implications for biogeographical theory and the conservation of nature. *Journal of Biogeography* 31: 177–197
- Wiley, E. 1981. Phylogenetics. The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics. Wiley-Interscience, New York.
- Wilson, P. & J. Provan. 2003. Effect of habitat fragmentation on levels and patterns of genetic diversity in natural populations of the peat moss *Polytrichum commune*. *Proc. R. Soc. Lond., Biol. Sci.* 270 (1517): 881-886.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- Xia, X., & Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.