

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN MARCADORES MOLECULARES DE HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE *Fasciola hepatica*

Tomassi C.A.^{1*} y Salas L.B.²

1: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Catamarca, Maestro Quiroga 80, San Fernando del Valle de Catamarca.

2: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Catamarca, San Fernando del Valle de Catamarca.

ctomassi@agrarias.unca.edu.ar

CHARACTERIZATION OF GENETIC VARIABILITY IN MOLECULAR MARKERS IN INTERMEDIATE HOSTS OF *Fasciola hepatica*

RESUMEN

Para el control de fasciolosis es crucial la identificación de las especies y la caracterización genética de los huéspedes intermediarios (moluscos de la familia Lymnaeidae); esto permite conocer sus patrones epidemiológicos y diseñar programas de control. El análisis de polimorfismos en secuencia de ADN proporciona información de los cambios evolutivos y sobre los factores selectivos y demográficos que actúan sobre las poblaciones y las especies. Además, son herramientas de gran valor en una amplia gama de disciplinas como la genética epidemiológica. Como objetivo de este trabajo se planteó caracterizar la variabilidad genética en secuencias de ADN de diferentes marcadores moleculares de huéspedes intermediarios de *Fasciola hepatica*. Se lograron amplificar secuencias de gasterópodos de 13 sitios de muestreos con el uso de marcadores mitocondriales (*COI* y *16S*) y nucleares (*ITS1* e *ITS2*), a los cuales se les evaluó la variabilidad genética, utilizando el *software* DnaSP v6.12. Se cuantificó el número de haplotipos y de sitios segregantes y la diversidad haplotípica y nucleotídica. Se evidenciaron valores altos de diversidad haplotípica y nucleotídica, diferenciándose 8 haplotipos nuevos. Esto puede ser explicado con un aumento de la variabilidad y la posibilidad de que coexistan diferentes haplotipos, ocasionado por eventos introductorios de distintos orígenes. Es trabajo constituye un primer análisis de este tipo, para los gasterópodos del género *Galba*, que permite entender la diversidad haplotípica de ellos.

Palabras claves: *Galba*. Haplotipos. Diversidad genética. Fasciolosis.

ABSTRACT

Species identification and genetic characterization of the intermediate hosts (mollusks of the family Lymnaeidae) is crucial for the control of fasciolosis; this allows us to know their epidemiological patterns and design control programs. The analysis of DNA sequence polymorphisms provides information on evolutionary changes and on the selective and demographic factors that act on populations and species. In addition, they are valuable tools in a wide range of disciplines such as epidemiological genetics. The aim of this work was to characterize the genetic variability in DNA sequences of different molecular markers of *Fasciola hepatica* intermediate hosts. We were able to amplify gastropod sequences from 13 sampling sites using mitochondrial (*COI* and *16S*) and nuclear (*ITS1* and *ITS2*) markers, which were evaluated for genetic variability using DnaSP v6.12 software. The number of haplotypes and segregating sites and haplotypic and nucleotide diversity were quantified. High values of haplotypic and nucleotide diversity were evidenced, with 8 new haplotypes being differentiated. This can be explained by an increase in variability and the possibility of the coexistence of different haplotypes, caused by introductory events of different origins. This work constitutes a first analysis of this type, for the gastropods of the genus *Galba*, which allows us to understand their haplotypic diversity.

Key words: *Galba*. Haplotypes. Genetic diversity. Fasciolosis

INTRODUCCIÓN

Los moluscos de la familia Lymnaeidae, gasterópodos de agua dulce, son los hospedadores intermediarios en el ciclo biológico de fasciolosis y revisten gran importancia en la transmisión de esta enfermedad, tanto en el ganado como en humanos, lo que obliga a emplear herramientas que permitan una fácil y rápida identificación de los especímenes involucrados, con una caracterización genética de las poblaciones (Artigas *et al.*, 2011; Barges *et al.*, 2012; Correa *et al.*, 2011; Pointier *et al.*, 2015; Lounnas *et al.*, 2017). Es necesario tener en cuenta que conocer la epidemiología de esta parasitosis, las características biológicas y la distribución geográfica de los hospedadores intermediarios, es crucial para determinar sus patrones epidemiológicos y consecuentemente también, importante a la hora de diseñar programas de control de dicha zoonosis (Mas Coma *et al.*, 2001, 2009 a; Barges *et al.*, 2012 a; Standley *et al.*, 2013). Sin embargo, la eficiencia de estos programas depende críticamente de la correcta identificación de los hospedadores intermediarios involucrados. Esto se debe a que no todas las especies de caracoles son igualmente susceptibles a la infección por trematodos (Mas Coma *et al.*, 2009). En la provincia de Catamarca se ha identificado la presencia de dos especies potenciales huéspedes intermediarios; *Galba viator* y *Galba neotropica* (Barges *et al.*, 2016).

La aparente uniformidad morfo-anatómica que presenta esta familia de gasterópodos dificulta su clasificación (Bargues & Mas Coma, 1997). En este sentido, los análisis moleculares son herramientas eficaces en la evaluación de hipótesis taxonómicas y en la determinación a nivel específico (Sáez & Lozano, 2005), ya que los datos obtenidos por estas técnicas, conducen a una reevaluación de las entidades taxonómicas comúnmente aceptadas (Horsáková *et al.*, 2020). El uso de marcadores de ADN ribosómico nuclear (ADNr) y ADN mitocondrial (ADNmt) se presenta como una herramienta eficaz para la caracterización de invertebrados en general y de los Lymnaeidae en particular, a niveles de taxones específicos, genéricos y supragénicos (Mas Coma *et al.*, 2005). El análisis de los polimorfismos de la secuencia de ADN en este grupo de gasterópodos, puede proporcionar información de valor sobre la importancia evolutiva de los polimorfismos y sobre los factores selectivos y demográficos que actúan sobre las poblaciones y especies. Además, los datos sobre polimorfismos de ADN son herramientas valiosas en diversas disciplinas como la biomedicina, la cría de animales y plantas, la genética de la conservación, la genética epidemiológica, entre otras (Rozas, 2009).

Las metodologías de secuenciación de ADN con la detección de polimorfismos están generando enormes conjuntos de datos de alta calidad sobre variaciones de secuencias de ADN. En concreto, el análisis comparativo del polimorfismo del ADN dentro de una misma especie y de la variación entre especies es un método muy eficaz para comprender el proceso evolutivo. El programa informático *DnaSP* permite describir patrones de polimorfismo del ADN dentro de una población de estudio y entre otras. Este software permite calcular datos estadísticos para cuantificar los niveles de polimorfismo del ADN (Nei, 1987), como el número de haplotipos (H) y la diversidad de haplotipos (HD), es decir la cantidad de secuencias aleatorias diferentes, lo que permite analizar el patrón de distribución de la variación del ADN o comparar escenarios evolutivos alternativos. También calcula el número de sitios segregantes (S) que se traduce en el número de posiciones variables (es decir, polimórficas) en una muestra de secuencias de ADN y la diversidad de nucleótidos (π).

Los enfoques actuales en estudios moleculares consisten en analizar la variación genética de ciertos organismos a fin de definirlos y caracterizarlos, lo que es particularmente útil en el caso de estos huéspedes intermediarios (Tautz *et al.*, 2003; López Soriano, 2004; Fontaneto *et al.*, 2015). Poder establecer una caracterización de la variabilidad genética de gasterópodos del género *Galba* se consigue empleando herramientas como las antes mencionadas, que nos permiten conocer en profundidad los organismos involucrados en los ciclos epidemiológicos. La realización de este tipo de estudios implica un análisis que permite una mayor descripción que los que se consigue solamente con la determinación de especies. Por lo anterior se planteó como objetivo del presente trabajo caracterizar la variabilidad genética en secuencias de ADN de diferentes marcadores moleculares de huéspedes intermediarios del ciclo de *Fasciola hepatica* que habitan en la provincia de Catamarca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de ADN genómico total y amplificación de genes mitocondriales y nucleares

Se colectaron manualmente y con coladores de malla fina moluscos del género *Galba* en diferentes puntos de la provincia, incluyendo un punto en la localidad de Escaba, Tucumán, dado que dicho sitio se ubica en una cuenca presente en Catamarca. Para esto se realizaron muestreos en cuerpos de agua con escasa profundidad, agua estancada o sin corriente continua (vegas, arroyos, riachuelos, etc.), en los márgenes de ríos o en las plantas acuáticas donde podían estar adheridos. Los gasterópodos fueron preservados en alcohol 96° hasta posterior tratamiento. Para los estudios genéticos, se extrajeron de cada ejemplar, porciones pequeñas, de aproximadamente 2 mm (N= 40), de tejido muscular del pie.

La obtención de ADN genómico total se realizó en el Departamento de Parasitología del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, según las indicaciones del kit comercial “Genomic DNA Extration kit AccuPrep” de Bioneer (2004).

Para la identificación de los especímenes estudiados, y a fin de evaluar la variabilidad intra e interespecífica, se amplificaron los marcadores del ADN ribosomal nuclear (ADNr), los espaciadores internos transcritos 1 y 2 (ITS-1 e ITS-2). También se amplificaron, secuencias parciales del marcador ribosomal mitocondrial *16S* (*16S* ARNr) y el gen codificante para proteínas mitocondriales “Citocromo Oxidasa subunidad I” (*COI*), mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*PCR*, *Polymerase Chain Reaction*); siguiendo las indicaciones de Correa *et al.* (2010), Folmer *et al.* (1994) y Almeyda-Artigas *et al.* (2000) respectivamente. La amplificación de los productos se verificó con electroforesis en gel de agarosa de concentración 1,5% el cual se realizó mezclando agarosa con buffer TAE (tris-acetato), al que se le añadió como componente revelador GelRed™ (Biotium, cat n° 41003); se lo colocó en una cuba de electroforesis con una solución buffer. Junto con las muestras sembradas, se sembró un marcador de tamaño molecular 100 bp *ladder*, con el fin de comprobar el tamaño de los amplicones.

Secuenciación

La secuenciación de cada marcador obtenido, se realizó en ambas hebras; para esto se usó el par de cebadores correspondientes de cada PCR y el reactivo *Big Dye Terminator v3.1*, (Applied Biosystem) en un volumen final de 10 µl. Para la obtención de las secuencias correspondientes a los distintos marcadores amplificados, se aplicó el método de secuenciación automática que consiste en realizar una PCR con un único cebador, añadiendo a la mezcla de reacción didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con distintos fluoróforos para cada base nitrogenada.

Para el marcaje de los productos se utilizó el siguiente perfil de ciclado: 1) 96°C durante 1 min; 2) 96°C durante 10 s, 50°C durante 5 s, 60°C durante 4 min en 30 ciclos. Seguidamente, se trataron en un secuenciador 3500 Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Análisis bioinformático y caracterización de la variabilidad genética

Los análisis bioinformáticos de las regiones parciales de los genes fueron realizados de forma individual en la totalidad de los individuos estudiados. Los electroferogramas obtenidos fueron analizados y editados mediante los programas Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd.) y BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999). De este modo, y eliminando los cebadores correspondientes, se lograron obtener las secuencias consenso por individuo para cada marcador. La valoración de calidad de las secuencias obtenidas se realizó manualmente mediante comparación visual de los cromatogramas *forward* y *reverse* para cada marcador e individuo y por comparación con secuencias depositadas en GenBank mediante el algoritmo BLASTn (Altschul *et al.*, 1990).

La caracterización de la variabilidad genética del material se llevó a cabo realizando un alineamiento múltiple con las secuencias de los diferentes sitios de muestreo para cada marcador, mediante el programa Clustal X 2.1 (Larkin *et al.*, 2007). Con los alineamientos obtenidos se evaluó la variabilidad genética de cada marcador estudiado, utilizando el *software* DnaSP v6.12 (Rozas *et al.*, 2017). Este programa permitió cuantificar los polimorfismos de secuencias de ADN a partir de cada matriz de datos y la estimación de diferentes índices tales como: el número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (HD), diversidad nucleotídica (π) y número de sitios segregantes (S). El primer índice (H) hace referencia a la cantidad de secuencias que difieren en al menos una base dentro de una muestra de secuencias de ADN (Rozas, 2009). La diversidad haplotípica (HD) indica la probabilidad que tienen dos secuencias aleatorias de ser distintas entre sí; este valor está basado en la frecuencia relativa de haplotipos (Rozas, 2009). La diversidad nucleotídica (π) es el promedio de diferencias nucleotídicas por sitio, es decir la posibilidad de que dos secuencias al azar sean diferentes en un sitio determinado (Nei & Li, 1979). El número de sitios segregantes (S) representa el número de posiciones nucleotídicas que difieren de una secuencia a otra, es decir las posiciones polimórficas en una matriz de secuencias (Watterson, 1975). Una vez diferenciado cada haplotipo, se utilizó el programa BioEdit 7.0.9 (Hall, 1999) para identificar los aspectos composicionales, como la cantidad de cada una de las bases nucleotídicas, la frecuencia absoluta y relativa y el contenido de G+C y A+T.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se colectar gasterópodos del género *Galba* en 14 sitios, de un total de 67 sitios muestreados (Figura 1). Se obtuvieron secuencias amplificadas de ejemplares, de 13 de los 14 sitios: Aconquiya, El Alto, El Peñón, Escaba, Icaño, Infiernillo, Ipizca, La Ciénaga, Laguna Blanca, Medanitos, Ruta 40, Ruta 43 y San Antonio, que permitieron reconfirmar la presencia de dos especies de gasterópodos *Galba viator* y *Galba neotropica*.

El análisis de diversidad genética realizado, con base en los cuatro marcadores secuenciados, demostró

la presencia de 4 haplotipos diferenciados para el gen *COI*, 2 haplotipos para el marcador *ITS1*, 3 para el marcador *ITS2* y 2 para el gen *16S*. La localización de sitios de procedencia de los diferentes haplotipos se presenta en la Tabla 1.

En cuanto a la variabilidad haplotípica se registraron 3 haplotipos nuevos, para *COI*, cada uno correspondiente a una única localidad. Dos haplotipos son de la especie *Galba neotropica*, uno de los cuales (Hap1) es de la localidad de Escaba, Tucumán. El haplotipo cuatro corresponde al sitio de Ruta 40 en Catamarca. En el caso de *Galba viator* se añade un haplotipo nuevo (Hap3) presente en el sitio de Ruta 43. Situaciones similares se dan con los marcadores restantes, donde se registró un haplotipo nuevo de *Galba viator* con el marcador *ITS1* para tres localidades de altura, por encima de los 2.300 msnm que son: El Peñón, Ruta 43, Laguna Blanca. Tres nuevos haplotipos fueron hallados con *ITS2* correspondiendo uno de ellos (Hap1) a *Galba neotropica*, presente en 8 localidades por debajo de los 2.300 msnm. Los otros dos nuevos haplotipos (Hap 2 y Hap3) de *Galba viator* corresponden a cuatro localidades de Catamarca ubicadas entre alturas que abarcan desde los 1.600 y los 3.400 msnm. Por último, se describe un haplotipo nuevo para el gen *16S*, correspondiente a la especie *Galba viator* presente en las localidades de Laguna Blanca y Ruta 43.

El análisis del polimorfismo de los marcadores mitocondriales y nucleares con su caracterización de variabilidad genética muestra valores superiores al 0,4 (Tabla 2). El marcador *ITS1* es el que presenta mayor variabilidad con 64 sitios segregantes entre sus haplotipos. Este análisis permitió caracterizar las variables haplotípicas presentes, lo que se ve en las Tablas 3 a 6. Los sitios polimórficos (*S*) de cada haplotipo de *Galba viator* y *Galba neotropica* mencionados anteriormente permitieron mostrar las variaciones nucleotídicas que se dan en las secuencias.

Por su parte los aspectos composicionales para cada marcador se encuentran analizados en la Tabla 7.

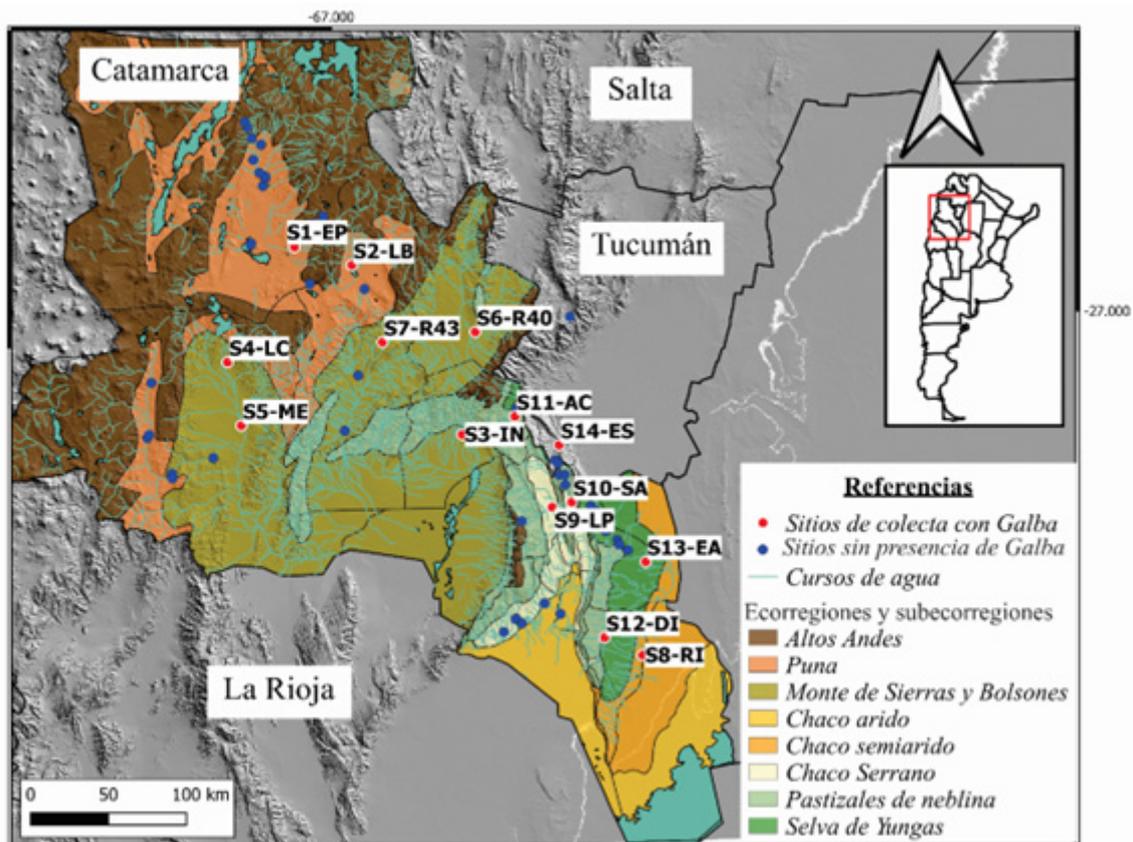


Figura 1. Ubicación geográfica en la provincia de Catamarca de los sitios de muestreo, mapa temático construido a partir de capas combinadas con QGIS3.8. Sitios: S1-EP: El Peñón, Antofagasta de la Sierra; S2-L: Laguna Blanca, Belén; S3-R43: Ruta 43, Belén; S4-LC: La Ciénaga, Tinogasta; S5-ME: Medanitos, Tinogasta; S6-R40: Ruta 40, Santa María; S7-IN: Infiernillo, Andalgalá; S8-AC: Aconquija, Andalgalá; S9-LP: Los Puestos, Ambato; S10-EA: San Antonio, Paclín; S11-EA: El Alto, El Alto; S12-DI: Ipizca, Ancasti; S13-RI: Icaño, La Paz; S14-ES: Escaba, Juan Bautista Alberdi, Tucumán.

Tabla 1. Procedencia de los diferentes haplotipos. Los asteriscos indican la diferenciación de un nuevo haplotipo.

Marcador	Procedencia
<i>COI</i>	
Haplotipo 1*	Escaba
Haplotipo 2	El Alto, San Antonio, Infiernillo
Haplotipo 3*	Ruta 43
Haplotipo 4*	Ruta 40
<i>ITS 1</i>	
Haplotipo 1	Aconquija, San Antonio, El Alto, Escaba, Icaño, Infiernillo, Ipizca, Ruta 40
Haplotipo 2*	El Peñón, Ruta 43, Laguna Blanca
<i>ITS2</i>	
Haplotipo 1*	La Ciénaga, Aconquija, San Antonio, El Alto, Escaba, Icaño, Infiernillo, Ipizca
Haplotipo 2*	El Peñón
Haplotipo 3*	Medanitos, Ruta 43, Laguna Blanca
<i>16S</i>	
Haplotipo 1	Aconquija, El Alto, Infiernillo, Ipizca, Ruta 40, Icaño
Haplotipo 2*	Ruta 43, Laguna Blanca

Tabla 2. Análisis de diversidad genética para los marcadores analizados.

N: cantidad de secuencias; H: número de haplotipos; HD: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica; SD: desvío estándar; S: sitios segregantes.

Localidad	N	h	H _D	π	S
COI					
Escaba	2	1	0	0	0
El Alto	1	1	0	0	0
San Antonio	1	1	0	0	0
Infiernillo	2	1	0	0	0
Ruta 40	1	1	0	0	0
Ruta 43	1	1	0	0	0
Total	8	4	0,821 ± 0,1015	0,01930 ± 0,00688	29
ITS1					
Aconquija	1	1	0	0	0
San Antonio	1	1	0	0	0
Infiernillo	1	1	0	0	0
El Alto	1	1	0	0	0
Escaba	1	1	0	0	0
Icaño	1	1	0	0	0
Ipizca	1	1	0	0	0
Ruta 40	1	1	0	0	0
Ruta 43	1	1	0	0	0
Laguna Blanca	2	1	0	0	0
El Peñón	1	1	0	0	0
Total	13	2	0,462 ± 0,01202	0,04108 ± 0,00976	64
ITS2					
Aconquija	1	1	0	0	0
San Antonio	1	1	0	0	0
Infiernillo	1	1	0	0	0
El Alto	1	1	0	0	0
Escaba	1	1	0	0	0
Icaño	1	1	0	0	0
Ipizca	1	1	0	0	0
El Peñón	1	1	0	0	0
La Ciénaga	1	1			
Ruta 43	1	1	0	0	0
Laguna Blanca	1	1	0	0	0
Medanitos	1	1	0	0	0
Total	12	3	0,485 ± 0,01122	0,01334 ± 0,01334	15
16S					
Aconquija	1	1	0	0	0
Infiernillo	1	1	0	0	0
El Alto	1	1	0	0	0
Icaño	1	1	0	0	0
Ipizca	2	1	0	0	0
Ruta 40	1	1	0	0	0
Ruta 43	1	1	0	0	0
Laguna Blanca	1	1	0	0	0
Total	10	2	0,436 ± 0,01776	0,00615 ± 0,00188	6

Tabla 3. Sitios polimórficos entre haplotipos de *Galba neotropica* y *Galba viator* basados en un fragmento de 655 pb del gen *COI*. Los nucleótidos de cada posición están denotados con la inicial correspondiente (A: Adenina; C: Citosina; T: Timina; G: Guanina). Los puntos indican igualdad de bases con el haplotipo de referencia (Hap1).

	1	16	23	25	31	68	73	79	124	142	187	190	206	220	298	328	344	355	418	460	463	472	484	493	508	544	565	631	652		
<i>Galba neotropica</i>																															
Hap1	C	C	A	C	C	C	A	A	T	T	A	C	T	A	A	A	T	A	G	T	A	T	G	G	G	A	G	T	G		
Hap2	
Hap4	T	T	G	.	.		
<i>Galba viator</i>																															
Hap3	T	.	G	T	T	T	G	G	C	A	G	T	C	T	T	G	C	T	A	C	G	C	A	A	A	T	A	C	A		

Tabla 4. Sitios polimórficos entre haplotipos de *Galba neotropica* y *Galba viator* basados en un fragmento de 722-758 pb del gen *ITS1*. Los nucleótidos de cada posición están denotados con la inicial correspondiente (A: Adenina; C: Citosina; T: Timina; G: Guanina). Los guiones indican sitios con gaps.

	6	11	167	169	170	171	172	173	174	175	176	178	181	182	184	186	187	193	194	195	196	197
<i>Galba neotropica</i>																						
Hap1	C	T	A	G	A	A	T	G	A	G	T	G	A	C	A	A	C	-	-	-	-	-
<i>Galba viator</i>																						
Hap2	A	C	G	A	G	C	A	A	C	A	C	A	T	A	C	T	T	C	A	C	A	C
	198	199	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	226	236	238	239	241	244	247	249
<i>Galba neotropica</i>																						
Hap1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	T	-	-	T	A	C	-
<i>Galba viator</i>																						
Hap2	A	A	T	T	T	T	G	T	T	T	A	T	T	T	A	A	T	C	G	G	G	A
	251	252	253	254	270	294	310	329	341	373	410	428	429	430	438	454	456	457	458	459	463	465
<i>Galba neotropica</i>																						
Hap1	T	C	G	G	A	C	T	T	G	C	A	-	-	-	C	C	A	-	-	A	T	C
<i>Galba viator</i>																						
Hap2	C	T	T	A	G	T	A	C	A	T	T	T	G	A	T	A	T	C	C	G	A	A
	466	468	469	471	498	516	572	573	574	576	577	579	580	581	583	586	588	589	590	591	592	596
<i>Galba neotropica</i>																						
Hap1	A	G	A	G	A	T	A	C	C	C	C	-	-	-	G	G	-	-	-	-	-	A
<i>Galba viator</i>																						
Hap2	G	A	G	T	T	A	G	T	G	T	T	C	A	T	A	C	T	G	C	A	G	G
	598	599	600	624	641	645	648	653	657	658	659	704	705	706	709	715	747	753				
<i>Galba neotropica</i>																						
Hap1	G	G	T	C	A	C	-	A	-	-	-	A	G	A	A	A	T	T				
<i>Galba viator</i>																						
Hap2	A	A	C	A	C	A	T	T	A	T	T	-	-	-	G	C	A	C				

Tabla 5. Sitios polimórficos entre haplotipos de *Galba neotropica* y *Galba viator* basados en un fragmento de 547-571 pb del gen *ITS2*. Los nucleótidos de cada posición están denotados con la inicial correspondiente (A: adenina; C: Citosina; T: Timina; G: Guanina). Los guiones indican sitios con gaps con el haplotipo de referencia (Hap1).

	133	150	338	446	447	448	449	451	479	481	488	493	495	496	498	499	500	501	502	503	504	505
<i>Galba neotropica</i>																						
Hap1	T	A	C	-	-	-	-	G	G	-	C	G	T	G	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Galba viator</i>																						
Hap2	-	-	T	T	T	C	A	A	T	T	A	T	A	A	G	A	A	T	G	A	A	G
Hap3	-	-	T	T	T	C	A	A	T	T	A	T	A	A	-	-	-	-	G	A	A	G
	506	507	508	509	514	517	518	519	525	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	541	543	
<i>Galba neotropica</i>																						
Hap1	-	-	-	A	C	A	T	A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C	C	
<i>Galba viator</i>																						
Hap2	G	T	A	T	T	G	A	T	T	T	A	T	C	T	T	C	T	T	T	T	T	T
Hap3	G	T	A	T	T	G	A	T	T	T	A	T	C	T	T	C	T	T	T	T	T	T

Tabla 6. Sitios polimórficos entre haplotipos de *Galba neotropica* y *Galba viator* basados en un fragmento de 426-427 pb del gen *16S*. Los nucleótidos de cada posición están denotados con la inicial correspondiente (A: Adenina; C: Citosina; T: Timina; G: Guanina). Los guiones indican sitios con gaps con el haplotipo de referencia (Hap1).

	119	126	129	186	206	232	291
<i>Galba neotropica</i>							
Hap1	A	A	G	-	A	C	T
<i>Galba viator</i>							
Hap2	G	G	A	C	C	T	C

Tabla 7. Caracterización composicional de cada secuencia para los haplotipos de los marcadores *COI*, *ITS1*, *ITS2* y *16S* para las especies *Galba neotropica* y *Galba viator*. Cada nucleótido está denotado con la inicial correspondiente (A: Adenina; C: Citosina; T: Timina; G: Guanina), PB: pares de bases.

	A	C	G	T	G+C	A+T	PB
<i>COI</i>							
<i>Galba neotropica</i>							
Hap1	175 (26,72%)	88 (13,44%)	110 (16,79%)	282 (43,05%)	30,23%	69,77%	655
Hap2	174 (26,56%)	88 (13,44%)	111 (16,95%)	282 (43,05%)	30,38%	69,62%	655
Hap4	174 (26,56%)	86 (13,13%)	111 (16,95%)	284 (43,36%)	30,08%	69,92%	655
<i>Galba viator</i>							
Hap3	172 (26,26%)	89 (13,59%)	110 (16,79%)	284 (43,36%)	30,38%	69,62%	655
<i>ITS1</i>							
<i>Galba neotropica</i>							
Hap1	153 (21,18%)	193 (26,73%)	217 (30,06%)	159 (22,02%)	56,79%	43,21%	722
<i>Galba viator</i>							
Hap2	163 (21,50%)	197 (25,99%)	220 (29,02%)	178 (23,48%)	55,01%	44,99%	758
<i>ITS2</i>							
<i>Galba neotropica</i>							
Hap1	100 (18,72%)	160 (29,25%)	148 (27,06%)	139 (25,41%)	56,31%	43,69%	547
<i>Galba viator</i>							
Hap2	107 (18,74%)	158 (27,67%)	149 (26,09%)	157 (27,50%)	53,77%	46,23%	571
Hap3	105 (18,52%)	158 (27,87%)	148 (26,10%)	156 (27,51%)	53,97%	46,03%	567
<i>16S</i>							
<i>Galba neotropica</i>							
Hap1	147 (34,51%)	55 (12,91%)	75 (-17,61%)	149 (34,89%)	30,52%	69,48%	426
<i>Galba viator</i>							
Hap2	145 (33,96%)	57 (-13,35%)	76 (-17,80%)	149 (34,89%)	31,15%	68,85%	427

El estudio de los moluscos de la familia Lymnaeidae en Argentina reviste gran importancia sanitaria dada sus características epidemiológicas. Estos estudios se centraron en la caracterización de las especies involucradas en pos de establecer políticas de control para la zoonosis (Prepelitchi & Wisnivesky-Colli, 2013). En la provincia de Catamarca la enfermedad está presente tanto en animales como en humanos (Malandrini *et al.*, 2012), lo que hace necesario un exhaustivo trabajo de base para la identificación y caracterización de las especies presentes en la provincia.

Los cuatro marcadores empleados permitieron reconfirmar la presencia de dos especies de gasterópodos del género *Galba* en distintos ambientes de la provincia de Catamarca *G. viator* y *G. neotropica*. Esto coincide con lo estipulado con autores previos en el empleo de estos marcadores para la identificación de huéspedes intermediarios.

En este trabajo se identificaron 8 haplotipos nuevos para las especies *Galba viator* y *Galba neotropica*, lo que aporta nueva información sobre este complejo de especies. Los haplotipos restantes corresponden a identificaciones con secuencias ya registradas en la base de datos de GenBank. De este modo, uno de los haplotipos de *COI* de *Galba neotropica*, presente en las localidades de El Alto, San Antonio e Infiernillo, se presenta como el mismo encontrado previamente para las localidades de Tatón e Ipizca. Este hecho podría ser explicado por un mismo evento introductorio de esta especie que logró dispersarse a los diferentes sitios. Por su parte, uno de los haplotipos identificados para *ITS1* presente en las localidades de Aconquija, San Antonio, El Alto, Escaba, Icaño, Infiernillo, Ipizca, y Ruta 40, corresponde en un 100% a un haplotipo ya identificado en la provincia de Santa Fe por Pujadas *et al.* (2015). Finalmente, uno de los haplotipos del marcador *16S* concuerda con el ya descrito por Bargues *et al.* (2016) para las zonas de Tatón e Ipizca. Con estos nuevos datos su distribución se amplía a las localidades de Aconquija, El Alto, Infiernillo, Ruta 40 e Icaño. La concordancia de estos haplotipos con los registrados por Bargues *et al.*, (2016) marcan la presencia de especímenes de *Galba* con la misma variabilidad molecular para diferentes sitios de la provincia, lo que sugiere una situación epidemiológica similar para los diferentes ambientes en Catamarca, que podrían ser tratados de igual manera para el control del vector.

De los cuatro marcadores analizados, *ITS1* fue el que presentó mayor variabilidad en lo referente a sus 64 sitios segregantes entre sus haplotipos, lo que lo convierte en un marcador robusto para diferenciación y caracterización de especímenes.

Los aspectos composicionales de cada haplotipo (cantidad de cada una de las bases, frecuencia relativa, contenido de G+C y A+T) se detalla en la Tabla 17. En la misma se muestra como existe una mayor composición de A+T para los marcadores *COI* y *16S* y de G+C para *ITS1* e *ITS2*.

Si bien los niveles de diversidad genética fueron levemente distintos entre los cuatro marcadores estudiados (*COI*: $HD = 0,821$, $\pi = 0,01930$; *ITS1*: $HD = 0,462$, $\pi = 0,04108$; *ITS2*: $HD = 0,485$, $\pi = 0,01334$; *16S*: $HD = 0,436$, $\pi = 0,00615$), se evidenciaron valores altos de diversidad haplotípica

y nucleotídica en todos ellos. Lo que puede ser explicado debido a un aumento de la variabilidad y la posibilidad de que coexistan diferentes haplotipos, esto ocasionado por eventos introductorios de distintos orígenes (Grant & Bowen, 1998; Kolbe *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

El incremento en la diversidad de nuevas secuencias de ADN para el género estudiado permite establecer nuevas herramientas en la descripción de estos vectores, facilitando la generación de estrategias de control que evalúen su dispersión. El enfoque taxonómico permite un estudio más completo de su distribución y características biológicas en conjunto con la nueva información genética de la diversidad de *Galba*.

Estos resultados constituyen un primer registro de este tipo de análisis, para este género de gasterópodos, que pueden ser empleados para entender la diversidad haplotípica de esta familia y para establecer nuevas hipótesis sobre su divergencia.

REFERENCIAS

- Almeyda Artigas, R. J., Bargues, M. D. & Mas-Coma, S. 2000. ITS-2 rDNA Sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *Journal of Parasitology*, 86(3):537–544.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403–410.
- Artigas, P., Bargues, M. D., Mera y Sierra, R. L., Agramunt, V. H., & Mas Coma, S. 2011. Characterisation of fascioliasis lymnaeid intermediate hosts from Chile by DNA sequencing, with emphasis on *Lymnaea viator* and *Galba truncatula*. *Acta Tropica*, 120(3):245–257. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.09.002>.
- Bargues, M. D., & Mas Coma, S. 1997. Phylogenetic analysis of lymnaeid snails based on 18S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14(5):569–577. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025794>.
- Bargues, M. D., Malandrini, J. B., Artigas, P., Soria, C. C., Velásquez, J. N., Carnevale, S., Mateo, L., Khoubbane, M., & Mas Coma, S. 2016. Human fascioliasis endemic areas in Argentina: Multigene characterisation of the lymnaeid vectors and climatic-environmental assessment of the transmission pattern. *Parasites and Vectors*, 9(1):1–20. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1589-z>.

- Bargues, M. D., Mera, R. L., Sierra, Artigas, P., & Mas Coma, S. 2012. DNA multigene sequencing of topotypic specimens of the fascioliasis vector *Lymnaea diaphana* and phylogenetic analysis of the genus *Pectinidens* (Gastropoda). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(1):111–124. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000100016>.
- Bioneer. 2004. *AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit Cat No.: K-3032*.
- Correa, A. C., Escobar, J. S., Durand, P., Renaud, F., David, P., Jarne, P., Pointier, J. P., & Hurtrez-Boussès, S. 2010. Bridging gaps in the molecular phylogeny of the Lymnaeidae (Gastropoda: Pulmonata), vectors of Fascioliasis. *BMC Evolutionary Biology*, 10:381. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-381>.
- Correa, A. C., Escobar, J. S., Noya, O., Velásquez, L. E., González-Ramírez, C., Hurtrez-Boussès, S., & Pointier, J. P. 2011. Morphological and molecular characterization of Neotropical Lymnaeidae (Gastropoda: Lymnaeoidea), vectors of fasciolosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(8):1978–1988. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.09.003>.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5):294–299.
- Fontaneto D., Flot, J.F. & Tang C.Q. 2015. Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. *Marine Biodiversity* 45(3):433–451.
- Grant W. S. & Bowen B. W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association*, 89:415–426.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.
- Horsáková, V., Nekola, J. C., & Horsák, M. 2020. Integrative taxonomic consideration of the Holarctic *Euconulus fulvus* group of land snails (Gastropoda, Stylommatophora). *Systematics and Biodiversity*, 18 (2): 142–160.
- <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1725172>.
- Kolbe J. J., Glor R. E., Rodríguez Schettino L., Lara A. C., Larson A. & Losos J. B. 2007. Multiple sources, admixture, and genetic variation in introduced Anolis lizard populations. *Conservation Biology*, 21:1612–1625.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., Mcwilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm119>.

org/10.1093/bioinformatics/btm404.

- López Soriano J. 2004. Técnicas de biología molecular aplicadas a la taxonomía y filogenia de moluscos. *Spira* 1(4):23–33.
- Lounnas, M., Vázquez, A. A., Alda, P., Sartori, K., Pointier, J. P., David, P., & Hurtrez-Boussès, S. 2017. Isolation, characterization and population-genetic analysis of microsatellite loci in the freshwater snail *Galba cubensis* (Lymnaeidae). *Journal of Molluscan Studies*, 83(1): 63–68.
- Malandrini, J. B., Carnevale, S., Soria, C. C., Vélasquez, J. N., & Paladino, C. M. 2012. Seroprevalencia de Fasciolosis en Niños del Valle de Fiambalá, Tinogasta, Argentina. *Ciencia*, 7(25):127–135.
- Mas Coma, S., Artigas, P., & Bargues, M. D. 2009. Filogenia de los Lymnaeidae vectores de *Fasciola hepatica*. En C. C. Corredor Pereira, F. Guhl Nannetti, & C. Duque Beltrán (Eds.). *Tendencias y Futuro de la Investigación en Parasitología y en Productos naturales*. Guadalupe S.A. (pp. 141–158).
- Mas Coma, S., Bargues, M. D., & Valero, M. A. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35:1255–1278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.010>.
- Mas Coma, S., Funatsu, I. R., & Bargues, M. D. 2001. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology*, 123(7):115–127. <https://doi.org/10.1017/s0031182001008034>.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., & Li, W.-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy Sciences*, 76(10):5269–5273.
- Pointier, J. P., González, C., Noya, O., & Alarcón de Noya, B. 2015. Family Lymnaeidae. In J. P. Pointier (Ed.), *Freshwater Molluscs of Venezuela and their Medical and Veterinary Importance* (pp. 101–124). Université de Perpignan.
- Prepelitchi, L. & Wisnivesky-Colli, C. 2013. *Fasciola hepatica*: epidemiología y control en la región noreste de Argentina. In Salomón O. D. & Rumi A. (Eds.) *Moluscos de interés sanitario en la Argentina* (pp. 54-83).
- Rozas, J. 2009. Chapter 17 DNA Sequence Polymorphism Analysis Using DnaSP. In D. Posada (Ed.), *Bioinformatics for DNA sequence Analysis, Methods in Molecular Biology* 537 (pp. 337–350). Humana Press.
- <https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9>.

- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-Del Barrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S., & Sánchez-García, A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12):3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
- Sáez, A. G. & Lozano, E., 2005. Body doubles. *Nature*, 433:111.
- Standley, C. J., Prepelitchi, L., Pietrokovsky, S. M., Issia, L., Stothard, J. R., & Wisnivesky-Colli, C. 2013. Molecular characterization of cryptic and sympatric lymnaeid species from the *Galba/Fossaria* group in Mendoza Province, Northern Patagonia, Argentina. *Parasites and Vectors*, 6(1):1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-304>.
- Tautz D., Arctander, P., Minelli, A. Thomas, R.H. & Vogler, A. P. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, 18:70–74.
- Watterson, G. A. 1975. On the Number of Segregating Sites in Genetical Models without Recombination. *Theoretical Population Biology*, 7:256–276.