

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Camilla de Medeiros de Carvalho

HISTÓRIA DE VIDA E VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Leptinaria unilamellata*
(d'Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE)

Juiz de Fora
2009

Camilla de Medeiros de Carvalho

**HISTÓRIA DE VIDA E VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Leptinaria unilamellata*
(d'Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula

Co-orientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Lafetá Gomes Furtado Mendonça
Prof^ª. Dr^ª. Roberta Lima Caldeira

Juiz de Fora

2009

Camilla de Medeiros de Carvalho

**HISTÓRIA DE VIDA E VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE *Leptinaria unilamellata*
(d'Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Aprovada em 17 de fevereiro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cristiane Lafetá Gomes Furtado Mendonça
Instituto de Pesquisas René Rachou - Fiocruz

Prof. Dr. Jairo Pinheiro
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof^a. Dr^a. Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula
Universidade Federal de Juiz de Fora

À Deus

AGRADECIMENTOS

À DEUS primeiramente, por ter me capacitado e me abençoado em muitos momentos da minha vida, que me possibilitaram chegar até aqui.

À minha MÃE LENIR e ao meu PAI CARLOS, pela minha vida, sem vocês não existiria. Agradeço por sempre terem me apoiado e acreditado que eu conseguiria todos os meus objetivos, mesmo nos meus momentos de desânimo. Obrigada mãe, por todo o seu infinito amor e dedicação, por ser minha amiga, por acreditar sempre que sou a melhor e me incentivar com seu jeito agitado, mãe você é meu exemplo de vida! Obrigada pai, que com seu jeito mais tranqüilo me distraía dos problemas com nossas conversas, por fazer minhas vontades, espero que não tenha abusado muito, e também por se preocupar comigo sempre, até quando estou com qualquer gripe boba! Amo muito vocês dois.

À minha orientadora STHEFANE, agradeço mais do que a orientação, mas também sua valiosa amizade! Por sempre ter me incentivado e me ajudado e orientado desde minha graduação, nessa carreira científica que nem sempre é fácil, mas você com certeza a tornou mais leve. Pelas nossas conversas que me deixavam mais segura a enfrentar as dificuldades da dissertação, e que também gerava descontração nos dias mais cansativos, desculpe as bobagens! Se um dia eu conseguir ser pelo menos um pouco da profissional que é, estarei muito feliz, pois sua maneira calma e carinhosa de lidar com as pessoas e sua dedicação à pesquisa são exemplos que tenho para a minha vida. Fico sem palavras para te agradecer tanta ajuda, obrigada por tudo o que fez por mim.

À minha madrinha NILZA, por ser minha mãe também, por ter me incentivado muito, por sempre estar presente na minha vida e torcendo muito para meu sucesso. Ao meu padrinho GONÇALVES, por também sempre estar presente e torcendo pelo meu sucesso. Obrigada por tudo!

Às minhas primas MARISA e CARMINHA, por sempre me ajudarem e terem me incentivado nos estudos, por estarem presentes na minha vida até mesmo antes do meu nascimento! Obrigada pela disponibilidade infinita em me ajudar em todos os momentos, considero vocês as minhas irmãs! Agradeço a DUDINHA (MARIA EDUARDA), minha priminha mais nova e linda integrante da família, pela alegria que tive por ela ter vindo!

A uma pessoa especial na minha vida que esteve presente de perto em todos os momentos durante esse período. BRUNO, obrigado por ter sido a melhor pessoa para estar do meu lado, me apoiando em todos os momentos, principalmente nos dias difíceis. Por ter compreendido que tinha que ir à pósx (pós) muitas vezes, ficar o dia inteiro e nunca terminar o trabalho! Te amo muito! Agradeço aos meus sogros FÁTIMA e JOÃO, que mesmo longe, estavam torcendo para que tudo desse certo, e pelo enorme carinho com que me tratam.

À professora ELISABETH, pela orientação durante a graduação, por todo o incentivo e apoio para ter chegado até aqui, pelo carinho, amizade e respeito.

Aos professores do departamento de Zoologia da UFJF, por terem contribuído na minha formação. A professora SUELI pela oportunidade de me iniciar na pesquisa científica, pelo carinho e pelo exemplo como professora e pesquisadora. Ao professor ROBERTO pelo incentivo e pela disponibilidade em ajudar sempre. Ao professor ERICK que com seu bom humor, ajudou muito a diminuir o stress de cada dia.

À amigas LIDIANE e LILIANE pelo convívio desde a graduação em muitos trabalhos da faculdade, pelos primeiros passos na pesquisa juntas, pelo incentivo e ajuda em tudo o que podiam.

À todas as amigas do Núcleo de Malacologia da UFJF. À MARIA ALICE pela simpatia e pela ótima pessoa que aprendi a admirar durante esse tempo. À FLÁVIA, pela grande ajuda em nossas conversas, nas sugestões no trabalho, por sempre estar disposta a ajudar, e por me levar nos seus trabalhos de campo! À TÉRCIA e RAFAELA pela ótima companhia a campo.

Aos amigos do laboratório de biologia de moluscos. À CARLA, pela amizade, por sempre estar disposta a ouvir. À ELOÁ, pela amizade, por ter ensinado sobre comportamento de moluscos. À PAULA pelo seu bom humor, seu exemplo como pesquisadora, que me inspiram a não desistir. Ao FABIANO pela amizade e convívio agradável durante a graduação, por sempre ajuda. Ao VINÍCIUS pela grande ajuda na morfometria das conchas, e pelas conversas sobre o trabalho. À EMILY e PATRÍCIA, pelo carinho e amizade.

Aos amigos da pós graduação. Ao ROBERTO, pelo ótimo bom humor que fez com que os dias fossem mais amenos. À FERNANDA KARINA, pela grande amizade e carinho. Aos amigos, ADALGISA, HAROLDO, JÚNIA, CAIO, OMAR, MATEUS, RENATO, ELAINE, LÍVIA, LEONARDO, ISABELLA, VALQUÍRIA, BEATRIZ e VÍVIAN, pelos momentos de alegria apesar do stress do dia

a dia, pessoal muito gente boa! Ao pessoal da outra turma DANIELE, ELDER, MARIANA e NOELLE, pela amizade e por terem me ajudado a fechar meus difíceis créditos!

Às meninas da república, RHAISA obrigada pela grande amizade e ótima companhia de república, e por ter aceitado morar comigo sem mesmo me conhecer! POLIANA, obrigada pela convivência agradável, e por me contar suas histórias engraçadas!

Às co-orientadoras CRISTIANE, pelas sugestões e ajuda na histologia, e ROBERTA, pelas sugestões e ajuda na biologia molecular. Ao pessoal do René Rachou, CRYSLAINE, GISELE, SÍLVIA, IVANA, FERNANDA, TATIANA e CAROL por terem me recebido muito bem, pela ajuda no laboratório de biologia molecular, e apesar de rápida foi ótima a convivência com vocês, espero que a amizade permaneça!

Às secretárias MARLU e ANDRÉIA por estarem sempre dispostas a ajudar. À ROSÂNGELA, pelo carinho, simpatia e ótima energia, que me recuperavam nos meus momentos de cansaço.

À todos os AMIGOS DE GRADUAÇÃO, que guardo no coração pelos momentos bons inesquecíveis, que deixam saudades.

Aos AMIGOS DE TERESÓPOLIS, que mesmo longe, estavam na torcida para que tudo desse certo.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA pelo espaço, ao INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS e ao NÚCLEO DE MALACOLOGIA PROF. MAURY PINTO DE OLIVEIRA, pelo espaço físico e materiais concedidos para a realização desse trabalho.

À FAPEMIG pelas bolsas concedidas durante os 24 meses do estudo.

"Nada do que fazemos ou pensamos é trivial ou irrelevante, porque tudo o que fazemos tem consequências no domínio das mudanças estruturais a que pertencemos"

Humberto Maturana, biólogo chileno.

RESUMO

No presente estudo, foram elucidados aspectos da história de vida e morfologia do gastrópode terrestre *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835), além disso, foi verificada a ocorrência de variabilidade nos padrões conquiliomorfológicos e conquiliomorfolométricos, assim como na morfologia do sistema reprodutor de moluscos provenientes de diferentes populações. A estratégia de história de vida da espécie foi caracterizada. Foram determinados os padrões de crescimento, reprodução e longevidade e elucidada a estratégia relacionada ao desenvolvimento dos embriões. Com base nos resultados obtidos, *L. unilamellata* foi classificada como espécie *K*-estrategista, ovovivípara, cujo padrão de história de vida é determinado pela alocação diferencial de energia para diferentes funções biológicas, nas diferentes fases do ciclo de vida. O sistema reprodutor foi caracterizado anatomicamente e histologicamente. Os resultados forneceram informações até então inexistentes, a cerca da morfologia microscópica do sistema reprodutor dessa espécie, corroborando aspectos comportamentais, como o hermafroditismo simultâneo e a ovoviviparidade. Foram observados o padrão geral da morfologia da concha de *L. unilamellata* e sua variação entre os espécimes das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ, e Floriano, distrito do município de Barra Mansa, RJ. O padrão de crescimento da concha foi descrito através do estudo da alometria do crescimento de moluscos de diferentes idades. As relações entre os padrões morfométricos dos diferentes morfotipos demonstraram a presença de dois grupos similares, um composto pelos morfotipos de Barra Mansa e Floriano, e outro pelos morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília. O estudo permitiu o conhecimento sobre o padrão de formação da concha ao longo do desenvolvimento, bem como as relações entre as diferentes medidas lineares aferidas. Foi investigada a variabilidade morfológica do sistema reprodutor de espécimes de *L. unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Belo Horizonte, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, distrito do município de Barra Mansa, RJ. Os moluscos provenientes das diferentes populações estudadas apresentam diferenças na morfologia do sistema reprodutor, podendo assim ser reconhecidos como morfotipos distintos. Entretanto, tais morfotipos não puderam ser distinguidos pelo perfil molecular gerado através da técnica de PCR-RFLP. Os resultados do estudo da morfologia e análises morfométricas confirmaram a maior semelhança entre os morfotipos de Barra Mansa e Floriano, e entre os morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília. A morfologia e morfometria dos moluscos de Belo Horizonte mostraram-se mais relacionadas àquelas dos dois últimos

morfotipos. As variações foram verificadas principalmente nos órgãos da região proximal do sistema reprodutor, os quais, provavelmente por estarem envolvidos no sucesso do acasalamento, sofrem maiores pressões seletivas. O presente estudo representa uma contribuição para o melhor entendimento da biologia reprodutiva de *L. unilamellata*. O estudo da conchiliomorfometria foi uma ferramenta útil para o conhecimento do padrão de crescimento dos moluscos e para a detecção de variabilidade morfológica interpopulacional. O conhecimento da morfologia do sistema reprodutor permitiu compreender aspectos da história de vida e distinguir morfotipos provenientes de diferentes populações. A combinação das diferentes abordagens utilizadas constitui um modelo que pode ser empregado para o melhor conhecimento da biologia de diferentes espécies de invertebrados.

Palavras-chave: Conchiliomorfometria. História de vida. *K*-estrategista. Sistema reprodutor. Variabilidade interpopulacional.

ABSTRACT

In this study, were elucidated aspects of life history traits and morphology of the terrestrial gastropod *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835). In addition, was verified the occurrence of variability in patterns of shell morphology and shell morphometrics, as well as morphology of the reproductive system of snails from different populations. The life history strategy of *L. unilamellata* was characterized. We determined growth, reproduction, and longevity patterns of this species and the strategy related to development of embryos were determined. We might conclude from the results that *L. unilamellata* is a *K*-strategist species, ovoviviparous, whose life history patterns are determined by the differential allocation of energy for different biological functions, in different stages of life cycle. The reproductive system was characterized in terms of anatomical and histological aspects. The results provided new information about histological morphology of reproductive system of this species, corroborating behavioral aspects, such as simultaneous hermaphroditism and ovoviviparity. We were observed the general pattern of shell morphology of *L. unilamellata* and its variation among populations from Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG, Barra Mansa, RJ, and Floriano, district of Barra Mansa, RJ. To describe the shell growth pattern, was accomplished the study of growth allometry with molluscs of different ages. The relationships between morphometric patterns of the morphotypes demonstrated the presence of two similar groups, one comprising the morphotypes of Barra Mansa and Floriano, and another by morphotypes of Juiz de Fora and Cruzília. The results of the present study clarified the shell growth pattern during the snails' development, and the relationships between different shell linear variables. There was investigated the morphological variability of the reproductive system of specimens of *L. unilamellata* from Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG, Belo Horizonte, MG, Barra Mansa, RJ and Floriano, RJ. As a result, were found differences in morphology of the reproductive system between molluscs from different populations, especially regarding the penial complex. So, snails from each locality could be recognized as distinct morphotypes. However, such morphotypes could not be distinguished through the molecular profile generated by PCR-RFLP. The length of bursa copulatrix, width of epifalo, width of flagellum and width of oviduct were the linear measurements that differed more between snails from different localities and these, therefore, are the variables with greater strength for the distinction of morphotypes. The results of the morphological and morphometric studies, as well as the Euclidean analysis and cluster analysis, confirmed the greatest similarity between the

morphotypes from Barra Mansa and Floriano, and between morphotypes from Juiz de Fora and Cruzília. The morphology and morphometry of reproductive system of molluscs from Belo Horizonte were more related to those of the last two morphotypes. The patterns of similarity resulting from discriminant analysis confirmed these results. The variations were observed mainly in organs of the proximal region of reproductive system, probably because they are involved in success of mating, and consequently, more exposed to selective pressures. The present study represents a contribution to a better understanding of the reproductive biology of *L. unilamellata*, focusing on both biological and behavioral aspects, such as morphology of reproductive system and shell. The study of shell morphometrics has been proved to be a useful tool for understanding the pattern of growth of snails over lifetime and also for detection of morphological interpopulation variability. Similarly, knowledge of reproductive system morphology clarified aspects of life history and allowed distinguish morphotypes from different populations. The combination of the different approaches used in this study constitutes a study model that can be used for reach a better understanding about the biology of different invertebrate species.

Keywords: Interpopulation variability. *K*-strategist. Life history. Reproductive system. Shell morphometrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1** Tamanho médio do comprimento da concha de *Leptinaria unilamellata* durante seu tempo de vida. Colunas brancas representam valores médios durante a fase jovem e as colunas pretas representam os valores médios durante a fase adulta.....47
- Gráfico 2** Mortalidade de *Leptinaria unilamellata* durante o tempo total de vida. A linha vertical indica o começo da idade reprodutiva.....51
- Fotografia 1** Características reprodutivas em *Leptinaria unilamellata*. **A.** Presença dos embriões no útero, visíveis através da transparência da concha (*). **B.** Embrião apresentando concha completamente desenvolvida, as setas indicam a lamela, note a fina membrana (m) que envolve o embrião. **C.** Embriões em diferentes estágios de desenvolvimento; (1e) embriões no estágio inicial de desenvolvimento; (2e-4e) embriões em um estágio mais avançado de desenvolvimento. **D.** Ovos não viáveis (células zigóticas com uma massa gelatinosa ao redor). Escala da barra = 1mm.....53
- Desenho 1** Sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata*. O útero é flexível e seu tamanho pode ser expandido para acomodar mais embriões. a: átrio genital; p: pênis; dd: ducto deferente; cp: complexo penial; o: oviduto; v: vagina; dbc: ducto da bolsa copulatória; bc: bolsa copuladora; pr: próstata; e: embrião; u: útero; ga: glândula de albúmen; dh: ducto hermafrodita; cs: complexo da espermateca; c: carrefour.....54
- Fotografia 2** Morfologia do útero grávido de *Leptinaria unilamellata*. **A.** Parede do útero não muscular, formado por um epitélio cúbico (seta) que se localiza na membrana basal, a qual é uma fina camada de tecido conjuntivo. Embriões (*) em diferentes estágios de desenvolvimento são vistos no lúmen do útero (u). Epitélio pavimentoso (cabeça da seta) limitante na região dorsal do útero. **B.** Detalhe da região ventral do útero apresentando um epitélio cúbico com células cúbicas ciliadas (seta), e por células glandulares esparsas. Barra de Escala = 50 µm.....55

Gráfico 3 Conteúdos de glicogênio (glândula digestiva + massa cefalopodal) e galactogênio (glândula de albúmen), expressos em mg de glicose/g de tecido, peso fresco e mg de galactose/g de tecido, peso fresco, respectivamente, de *Leptinaria unilamellata* nos estágios do ciclo de vida de jovem, adulto e senescente. I= desvio padrão.....56

Desenho 2 História de vida de *Leptinaria unilamellata* caracterizada por um longo tempo de vida, curta fase jovem em função do rápido alcance da maturidade sexual, com numerosos eventos reprodutivos ao longo da vida e pequeno esforço reprodutivo em cada evento. Essas características estão associadas a espécies *K*-estrategistas. A ilustração é uma escala proporcional de características de história de vida observadas durante o período de experimento. Barra de escala (= 2 cm) é referente a 112 dias do tempo de vida.....58

Fotografia 3 Sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata*. **A.** Complexo da espermateca com formato sinuoso; **B.** Do complexo da espermateca origina-se o espermoviduto (cabeça da seta), que segue em direção ao carrefour, que é a região de encontro entre o espermoviduto e o ducto da glândula de albúmen (ga); **C.** Glândula prostática (gp), localizada logo acima do oviduto livre; **D.** No final do primeiro terço proximal do oviduto, origina-se o ducto da bolsa copuladora (dbc) que permite a bolsa copuladora (bc) localizar-se em um sítio entre o oviduto e a glândula da próstata; **E.** Na altura da transição falo-epifalo, o ducto deferente penetra no interior da bainha do pênis (seta), o ceco posterior ao epifalo (e) é denominado flagelo (fl), o falo (f) apresenta uma parede muscular desenvolvida, o músculo retrator peniano (mrp) se insere na porção distal do flagelo; **F.** A região do oviduto entre a origem do ducto da bolsa copuladora e o início da parte proximal do complexo peniano corresponde à vagina (v), logo abaixo da vagina, em uma região mais alargada do oviduto localiza-se o átrio genital (ag). Barra de escala: 200 μ m.....66

Fotografia 4 **A.** Ácino folicular do ovotestis intrinsecamente associado à glândula digestiva, circundado por vasos sanguíneos (*), indicando uma forte irrigação hemolinfática; **B.** No mesmo ácino folicular há a presença de células das linhagens germinativas femininas (seta) e masculinas (cabeça da seta), delimitadas por um epitélio de

células fusiformes; **C.** Duto hermafrodita (dh), com epitélio cúbico simples ciliado com núcleo acidofílico; **D.** Oócitos em vitelogênese avançada (seta) de nucléolo evidente, apresentando citoplasma altamente granular fracamente corado e com um grande núcleo arredondado eosinofílico, com duas células foliculares (cabeça da seta) delimitando a cavidade folicular. Coloração = HE. Barra = 50µm.....68

Fotografia 5 Cortes histológicos do ovotestis de *Leptinaria unilamellata*. **A.** vista geral do ovotestis mostrando as células da linhagem masculina, espermatozóides (*), espermátides (seta) e espermatócitos (esp); **B.** Detalhe das espermátides (seta); **C.** Detalhe do oócito vitelogênico (cabeça da seta) apresentando uma fenda, próximo aos espermatócitos (esp); **D.** Detalhe dos espermatozóides já formados (*), em contato com a célula de Sertoli. Coloração = HE. Barra = 50 µm.....70

Fotografia 6 **A.** Complexo de fertilização dividido em duas porções, primeiramente o saco de fertilização com um epitélio simples pavimentoso (*); **B.** Posteriormente a espermateca (seta), constituída de um epitélio simples cúbico glandular, de núcleo central e numerosos cílios, dividida em câmaras; **C.** Células glandulares da glândula de albúmen, volumosas e ovóides ou piramidais em forma, com núcleo basal devido à grande quantidade de conteúdo citoplasmático basofílico; **D.** Células labirínticas da glândula de albúmen (cabeça da seta), interpostas entre as células glandulares do epitélio glandular. Coloração = HE. Barra = 50µm.....72

Fotografia 7 **A.** Útero com dois tipos celulares, na parte interna (região ventral), próxima ao oviduto, apresenta um epitélio do tipo secretor (es), com células cúbicas ciliadas interespaçadas com células secretoras, provavelmente caliciformes, na parte externa (região dorsal), que se localiza perto da volta corporal, sua camada é fina e apresenta um epitélio de revestimento simples pavimentoso (ep); **B.** Oviduto com um epitélio simples composto de células prismáticas alongadas altamente ciliadas apresenta lúmen (*) com paredes epiteliais altamente pregueadas internamente; **C.** Na superfície do epitélio da bolsa copuladora é possível visualizar a secreção produzida pelas células secretoras (cabeça da seta), o lúmen da bolsa copuladora apresenta uma massa de cor rósea ou arroxeadada, provavelmente os espermatozóides parcialmente digeridos; **D.** O ducto da bolsa copuladora (seta) diferentemente da bolsa copuladora se apresenta com muitos cílios em um epitélio simples cúbico.

Coloração = HE. Barra = 50µm.....74

Fotografia 8 **A.** Fase ativa da próstata, com um arranjo túbulo-alveolar com células secretórias colunares altas de rico conteúdo granular acidofílico, que formam ácinos prostáticos (*); **B.** Fase de amadurecimento da próstata, o citoplasma apresenta conteúdo granular basofílico e as células não possuem um arranjo acinar (*); **C.** Vaso deferente (vd) caracterizado por um pequeno lúmen limitado por um epitélio simples de células cuboidais de núcleo arredondado central, portando poucos e baixos cílios, no nível prostático é possível notar a presença de material amorfo acidofílico no lúmen do ducto deferente; **D.** Ao redor do epitélio do vaso deferente está uma camada fibrosa de tecido conjuntivo, externamente há uma camada relativamente espessa de musculatura circular (seta). Coloração = HE. Barra = 50µm.....76

Fotografia 9 **A.** O epifalo (e) apresenta epitélio simples prismático, com células colunares, não ciliadas e de núcleo alongado, ao lado o ducto deferente (cabeça da seta) corre paralelamente ao epifalo, a bainha do pênis envolve essas duas estruturas, constituindo-se de um epitélio simples pavimentoso de revestimento; **B.** O falo (f) possui um pequeno lúmen limitado por células cuboidais de núcleo central, sem cílios e é altamente muscular, com uma espessa musculatura arranjada circularmente internamente e longitudinalmente externamente, o átrio genital (ag) apresenta em seu epitélio dobras internas, conferindo-lhe um lúmen pregueado em forma de H, o qual é delimitado por células simples prismáticas; **C.** O flagelo (fl) possui um epitélio interno fortemente pregueado, sendo um epitélio simples cúbico com núcleo fortemente corado (basofílico); **D.** Paralelamente ao flagelo há a glândula prepucial (seta), de epitélio cúbico simples secretor, suas células são globosas de citoplasma altamente granular eosinofílico. Coloração = HE. Barra = 50µm.....78

Fotografia 10 Localização geográfica das localidades de coleta de *Leptinaria unilamellata*.
Legenda: 1 - município de Cruzília, MG; 2 - município de Juiz de Fora, MG; 3 - Floriano, distrito do município de Barra Mansa, RJ; 4 - município de Barra Mansa, RJ. Fonte: Google Earth.....86

Desenho 3 Concha de <i>Leptinaria unilamellata</i> , com as medidas lineares aferidas (A) e contagem do número de voltas (B). Legenda: comprimento total da concha (CC); largura total da concha (LC); comprimento da abertura da concha (CA); largura da abertura da concha (LA); comprimento da volta corporal (CVC); comprimento da penúltima volta (CPV) e comprimento da espira (CE). Barra de escala: 1 cm.....	89
Desenho 4 Concha do morfotipo de Juiz de Fora, MG. Barra corresponde a 1cm.....	92
Desenho 5 Concha do morfotipo de Cruzília, MG. Barra corresponde a 1cm.....	93
Desenho 6 Concha do morfotipo de Floriano, RJ. Barra corresponde a 1cm.....	94
Desenho 7 Concha do morfotipo de Barra Mansa, RJ. Barra corresponde a 1cm.....	95
Gráfico 4 Valores médios das medidas da concha de <i>Leptinaria unilamellata</i> das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, na idade de 30 dias (A), 60 dias (B), 90 dias (C), 120 dias (D), 150 dias (E) e 180 dias (F). CC – comprimento total da concha; LC – largura total da concha; CA – Comprimento da abertura da concha; LA – largura da abertura da concha; CVC – comprimento da volta corporal; CPV – comprimento da primeira volta; CE – comprimento da espira.....	100
Gráfico 5 Análise de agrupamentos da conchiliomorfometria de <i>Leptinaria unilamellata</i> de diferentes localidades na idade de 30 dias (A), 60 dias (B), 90 dias (C), 120 dias (D), 150 dias (E) e 180 dias (F). JF – moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM – moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO - moluscos provenientes da localidade de Floriano.....	110

Gráfico 6 Análise discriminante da conchiliomorfofometria de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 30 dias (A), 60 dias (B), 90 dias (C), 120 dias (D), 150 dias (E) e 180 dias (F). ▲ – moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; ■ – moluscos provenientes da localidade de Cruzília; ● – moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; ▼ - moluscos provenientes da localidade de Floriano.....112

Gráfico 7 Valores médios das medidas do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano, na idade de 80 dias (medidas em micrômetros). CdBC = comprimento do ducto da bolsa copuladora; LdBC = largura do ducto da bolsa copuladora; CBC = comprimento da bolsa copuladora; LBC = largura da bolsa copuladora; CE = comprimento do epifalo; LE = largura do epifalo; CP = comprimento do falo; LP = largura do falo; CBP = comprimento da bainha do pênis; LBP = largura da bainha do pênis; CF = comprimento do flagelo; LF = largura do flagelo; CO = comprimento do oviduto; LO = largura do oviduto; CPV = comprimento parcial da vagina; LPV = largura parcial da vagina.....131

Gráfico 8 Análise de agrupamentos da morfometria do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 80 dias. JF – moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BH – moluscos provenientes da localidade de Belo Horizonte; BM – moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO - moluscos provenientes da localidade de Floriano.....137

Gráfico 9 Análise discriminante da morfometria do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 80 dias, Bolsa copuladora (A), Complexo peniano (B) e Oviduto e vagina (C). ▲ – moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; ■ – moluscos provenientes da localidade de Cruzília; ● – moluscos provenientes da localidade de Belo Horizonte; ▼ - moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; ◆ - moluscos provenientes da localidade de Floriano.....138

Fotografia 11 Produtos de amplificação por PCR, correspondentes à região ITS do rDNA de *Leptinaria unilamellata*. Canaletas: 1. Padrão de peso molecular; 2 e 3. Moluscos da localidade de Juiz de Fora, MG; 4. Resultado negativo, DNA de moluscos da localidade de Juiz de Fora não amplificado; 5. Molusco da localidade de Juiz de Fora, MG; 6. Resultado negativo, DNA de moluscos da localidade de Floriano não amplificado; 7, 8, 9, 10 e 11. Moluscos da localidade de Floriano, RJ; 12. Resultado negativo, DNA de moluscos da localidade de Leopoldina não amplificado; 13. Molusco da localidade de Leopoldina, MG.....139

Fotografia 12 Gel de poliacrilamida com os perfis de restrição obtidos pela digestão dos fragmentos da região ITS do rDNA de *Leptinaria unilamellata*. Canaletas: 1. Controle negativo; 2. Controle positivo; 3. Padrão; 4 e 5. Moluscos da localidade de Barra Mansa, RJ; 6. Molusco da localidade de Leopoldina, MG; 7, 8, 9 e 10. Moluscos da localidade de Juiz de Fora; 11. Molusco da localidade de Barra Mansa, RJ; 12 e 13. Moluscos da localidade de Floriano, RJ.....140

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Idade, número de moluscos, crescimento médio, coeficiente de variação, mínimo e máximo da concha durante 1050 dias da longevidade de *Leptinaria unilamellata* (medidas em milímetros).....46
- Tabela 2** Tamanho e idade no alcance da maturidade, taxa de crescimento, número total de eventos reprodutivos, número total de filhotes e fecundidade *Leptinaria unilamellata*.....49
- Tabela 3** Média, desvio padrão e amplitude (mínimo e máximo) das medidas lineares aferidas de indivíduos de diferentes idades de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ (medidas em centímetros).....98
- Tabela 4** Média, desvio padrão e amplitude (mínimo e máximo) das razões entre medidas lineares da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ (medidas em centímetros).....101
- Tabela 5** Resultado do ANOVA para as variáveis da conchiliomorfometria de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....102
- Tabela 6** Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento total da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....102
- Tabela 7** Resultado do test-t para os dados pareados da largura total da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....103
- Tabela 8** Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento da abertura da

concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....103

Tabela 9 Resultado do test-t para os dados pareados da largura da abertura da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....104

Tabela 10 Resultado do test-t para os dados pareados da largura da abertura da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....104

Tabela 11 Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento da penúltima volta da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....105

Tabela 12 Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento da espira da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....105

Tabela 13 Resultado do test-t para os dados pareados do número de voltas da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....106

Tabela 14 Resultado do ANOVA para as razões entre as medidas lineares da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....106

Tabela 15 Distância Euclidiana da morfometria da concha de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....107

Tabela 16 Relações conquiliomorfométricas entre as variáveis largura da abertura da concha (LA) e largura total da concha (LC) de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ,

	nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....	115
Tabela 17	Relações conchiliomorfológicas entre as variáveis comprimento da abertura da concha (CA) e largura total da concha (LC) de <i>Leptinaria unilamellata</i> das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....	116
Tabela 18	Relações conchiliomorfológicas entre as variáveis comprimento da espira da concha (CE) e largura total da concha (LC) de <i>Leptinaria unilamellata</i> das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....	117
Tabela 19	Relações conchiliomorfológicas entre as variáveis comprimento total da concha (CC) e largura total da concha (LC) de <i>Leptinaria unilamellata</i> das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....	118
Tabela 20	Relações conchiliomorfológicas entre as variáveis comprimento da espira da concha (CE) e comprimento total da concha (CC) de <i>Leptinaria unilamellata</i> das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....	119
Tabela 21	Relações conchiliomorfológicas entre as variáveis comprimento da abertura da concha (CA) e comprimento total da concha (CC) de <i>Leptinaria unilamellata</i> das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....	120
Tabela 22	Média, desvio Padrão e amplitude (mínimo e máximo) das razões entre medidas lineares do sistema reprodutor de <i>Leptinaria unilamellata</i> das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Belo Horizonte, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ (medidas em micrômetros).....	130
Tabela 23	Média, desvio padrão e amplitude (mínimo e máximo) das razões entre medidas lineares do sistema reprodutor de <i>Leptinaria unilamellata</i> das	

localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Belo Horizonte, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ (medidas em micrômetros).....131

Tabela 24 Resultado do ANOVA para as variáveis da morfometria do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 80 dias.....132

Tabela 25 Resultado do test-t para os dados pareados das variáveis do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano, na idade de 80 dias.....133

Tabela 26 Distância Euclidiana da morfometria do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 80 dias.....136

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	24
2 ESTRATÉGIA DE HISTÓRIA DE VIDA DE <i>Leptinaria unilamellata</i> (d' Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE).....	42
3 MORFOLOGIA MACRO E MICROSCÓPICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE <i>Leptinaria unilamellata</i> (d' Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE).....	61
4 ONTOGENIA DA CONCHA E VARIABILIDADE CONQUILIOMORFOLÓGICA EM POPULAÇÕES DE <i>Leptinaria unilamellata</i> (d' Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE).....	85
5 VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR EM POPULAÇÕES DE <i>Leptinaria unilamellata</i> (d' Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE).....	125
6 CONCLUSÕES	144
7 REFERÊNCIAS	145
8 APÊNDICES	158

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Leptinaria unilamellata

Mollusca compreende um filo animal altamente diverso com mais de 100.000 espécies reconhecidas, a maioria das quais apresenta uma concha como um esqueleto externo distinto, a qual foi amplamente utilizada por naturalistas dos séculos XVII e XVIII na sua classificação e conhecimento (WILKE et al., 2002). Essa diversidade reflete-se em diferentes linhagens dentro do grupo, que possuem variadas características de história de vida, morfologia e habitats. Como exemplo, estima-se que existam mais de 30.000 espécies de gastrópodes terrestres, que ocupam uma ampla variedade de habitats terrestres. A história de vida e a biologia reprodutiva desses animais são igualmente diversas e provavelmente refletem a irradiação do grupo, sendo investigadas sob a ótica de diferentes áreas de conhecimento, como a embriologia, histologia, ecologia e sistemática filogenética (BARKER, 2001; GÓMEZ, 2001; HEALY, 2001; HELLER, 2001).

Os gastrópodes terrestres da família Subulinidae são primariamente um grupo tropical de estilomatóforos terrestres, de ampla distribuição, com mais de 1300 espécies descritas (PILSBRY, 1906 *apud* NAGGS, 1994) e cerca de 70 gêneros são reconhecidos atualmente (ZILCH, 1959 *apud* NAGGS, 1994). A maior parte das espécies foi descrita, e são conhecidas somente pela concha, devido a sua ampla distribuição, torna-se necessário o conhecimento do limite entre espécies dentro desse grupo.

Várias espécies de gastrópodes pulmonados terrestres subulinídeos, podem atuar como hospedeiros intermediários de parasitos de animais domésticos e do homem. Dentre elas destaca-se a espécie *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835), por atuar como hospedeiro intermediário de *Postharmostomum gallinum* (AMATO e BEZERRA, 1989; DUTRA, 1988), parasito de aves, *Tanaisia bragai* (ARAÚJO e KELLER, 1993), parasito de pombos, e *Eurytrema coelomaticum* (ARAÚJO, 1982), parasito de bovinos. Pode ser encontrada no Brasil e Bolívia (SIMONE, 2006), possuindo uma ampla distribuição geográfica por ação antrópica (DUTRA, 1988); no Brasil ocorre nos estados Amazonas, Pará, Rondônia, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (ARAÚJO, 1982; DUTRA, 1988). Esta espécie possui habitat sobre plantas de jardim, sob pedras e em madeira em decomposição (SANTOS, 2005), ocorrendo com maior frequência após um período de maior pluviosidade (ARAÚJO e KELLER, 1993). A fácil manutenção dessa espécie em laboratório permite sua utilização como modelo biológico em estudos de biologia e morfologia (ALMEIDA e BESSA, 2001; ARAÚJO, 1982; BRANDOLINI e GOMES, 2002; DUTRA, 1988).

DUTRA (1988) realizou coletas mensais de *L. unilamellata*, em uma área do Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, caracterizada com uma cobertura vegetal herbácea, onde predominavam gramíneas e ciperáceas. Essa espécie foi encontrada no solo, sobre e sob talos e folhas caídas, com distribuição de forma agregada. Nos meses mais quentes habitava entrelaçados secos de ramos, gramíneas e raízes, evitando dessa forma, a incidência direta do sol e conseqüentemente a dessecação. Ocorrem de maneira simpátrica e predominante a outras espécies de moluscos terrestres, tais como *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) e *Sarasinula* sp., tendo sido menos freqüente a simpatria com *Subulina octona* (Brugüière, 1792). ARAÚJO (1982) também cita simpatria com espécies de subulinídeos, como *Opeas* e *S. octona*.

Em observação a aspectos da biologia, BRANDOLINI e GOMES (2002), investigaram a influência da dieta sobre o crescimento, reprodução e mortalidade de *L. unilamellata*, submetida a diferentes dietas, sob condições de laboratório. Concluíram que a dieta composta somente de ração para codornas em postura inicial possibilitou um maior crescimento, e quando oferecida combinada com vegetais, propiciou menor mortalidade e uma maior produção de filhotes. ALMEIDA e BESSA (2000) verificaram que a densidade populacional influencia o crescimento dessa espécie, mas não afeta sua reprodução. Esses autores confirmaram o comportamento agregativo de *L. unilamellata*, e verificaram a ocorrência de autofecundação, em indivíduos mantidos isolados desde o nascimento, sendo que nestes indivíduos a produção de filhotes foi maior, do que aqueles mantidos agrupados (ALMEIDA e BESSA, 2001). D'ÁVILA et al. (2004), verificou a resistência dessa espécie à dessecação, através da manutenção de 20 indivíduos em câmara climatizada à temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e 80% de umidade relativa do ar. Após 12 horas de exposição houve retração da massa cefalopodal, e após um período de 48 horas todos os indivíduos estavam mortos. Os autores concluíram que *L. unilamellata* é capaz de sobreviver à condições desfavoráveis, por um período de pelo menos 36 horas, sendo que apresenta uma capacidade de resistência ainda maior na presença de um substrato mineral e ou orgânico, que propicie o enterramento desses animais.

Essa espécie também foi utilizada como modelo biológico em laboratório, em testes com substâncias de potencial moluscicida. SOUZA (2003) trabalhou com adultos dessa espécie testando a atividade moluscicida da cafeína e do timol, sendo essas duas substâncias demonstraram-se tóxicas a esses moluscos, não havendo efeito tóxico residual. NETO (2003) testou a atividade moluscicida dos látices de três espécies de plantas, *Euphorbia cotinifolia*, *Euphorbia milii splendens* e *Euphorbia tirucalli*, as quais apresentaram uma baixa atividade repelente. A espécie *E. cotinifolia*, estimulou o deslocamento vertical, um comportamento considerado atípico para *L. unilamellata*, e somente o látex de *E. milii splendens* em elevadas concentrações, exibiram atividade moluscicida. SANTOS (2005) investigou a influência da cafeína e do timol sobre a sobrevivência, crescimento e

reprodução em indivíduos de diferentes idades, demonstrando que a cafeína atuou como substância moluscicida e o timol atuou como substância moluscicida apenas para jovens de 10 dias. Não atuou como moluscicida com 30 dias nas primeiras 24 horas devido a concentração letal estar associada ao tamanho corporal dos adultos.

TRYON e PILSBRY (1906) relataram que as espécies de *Leptinaria* Beck, 1837, são de difícil e crítica diagnose por apresentarem grande variação conquiliológica, com conquiliomorfologias extremas conectadas por formas intermediárias. Ressalta que só com a realização de estudos com boas séries de jovens a adultos ficariam determináveis as espécies do gênero. DUTRA (1988) verificou que características da concha de *L. unilamellata*, tais como peristômio simples, lamela parietal e columela truncada desde o embrião, não sugerem algum indicativo conquiliológico externo do seu grau de desenvolvimento. Dessa forma, muitas vezes exemplares jovens dessa espécie, foram confundidos com outras espécies de subulinídeos, pela grande convergência apresentada nos caracteres da concha e seleção de nichos ecológicos.

A maior parte das descrições de *L. unilamellata* e seu gênero se limitam a descrição da morfologia da concha e seu local de ocorrência. TRYON e PILSBRY (1906) estudaram os caracteres morfológicos, especialmente das conchas dos Subulinidae. Caracterizaram os gêneros *Subulina* e *Leptinaria*, incluindo as espécies de interesse para o Brasil e a distribuição geográfica por continentes. THIELE (1992) descreve o gênero *Leptinaria* Beck, 1837, com concha oval forma de cone para turrificada e de forma cilíndrica, fina, na maioria dos casos transparentes, lisa ou ornamentada; abertura ocasionalmente com uma lamela parietal, columela coberta com um “callus”, torcido para baixo e mais ou menos truncado, com ocorrência na América tropical.

O primeiro a descrever a espécie foi D'ORBIGNY (1835), com o nome específico de *Helix unilamellata*, de ocorrência na Província Santa Cruz de la Sierra (república Boliviana). O mesmo autor D'ORBIGNY, 1837-1840, em *Voyage dans L'Amérique Méridionale*, relatou ser *Helix unilamellata*, sinônimo de *Bulimus unilamellatus*, com características de concha alongada, tênue, um pouco arredondada, diáfana, lisa ou ligeiramente marcada de estrias; espira cônica, obtusa à seu ápice, composta de sete voltas ligeiramente arredondadas, cuja a última volta ocupa a metade do comprimento total da concha; abertura oval, um pouco oblíqua, borda delgada e cortante. Uma lâmina saliente ocupa a base da columela, e se continua no interior da concha; columela contorta, em saliência aguda, truncada à sua extremidade. Cor branca ou ligeiramente tingida de amarelo, com dimensões de 12 mm em comprimento, e 11 mm em largura, com ocorrência em Santa Cruz de La Sierra, Bolívia. Posteriormente, REEVE (1849-1850) a descreveu como *Achatina anomala*, de concha turrificada, brevemente umbilicada, suturas da espira profundas, sete a oito voltas da concha, arredondadas, finamente estriadas, columela curta, calosa, refletida, abertura pequena, de ocorrência

no Peru, assemelhando-se intimamente com *Bulimus* pela razão do crescimento refletido da columela.

PFEIFFER (1848) caracterizou *Achatina anomala*, com uma concha subperforata, oblongo-cônica, tênue, estriada sutilmente, pelúcida, nítida, voltas convexas 6 ½, columela curta, não atingindo a base, truncada-entortada, abertura semioval, perístoma reto, simples, margem columelar direita duplicada, reflexa, perfuração fingente, com ocorrência habitat no Peru.

BAKER (1962) *Leptinaria unilamellata* (Orbigny), informa que essa espécie tinha sido registrada amplamente por VAN DER SCHALIE, 1948:56, provavelmente em lugares de cultivo. E relata que infelizmente em trabalho anterior (BAKER, 1945 *apud* BAKER, 1962), adotou o primeiro nome mais amplamente utilizado *Leptinaria lamellata* (Potiez & Michaud), do que o primeiro nome nomeado por Orbigny. De acordo com ARAÚJO (1982), a sistemática e a classificação de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835), pode ser colocada como:

Helix unilamellata d'Orbigny, 1835: 9

Bulimus unilamellatus d'Orbigny, 1835: 257

Achatina lamellata Potiez & Michaud, 1838: 128, pl. 11, f. 7-8.

Tornatellina ferussacii Pfeiffer, 1848: 394.

Achatina lamellata Reeve, 1849: sp. 97, pl. XVIII.

Tornatellina unilamellata Pfeiffer, 1859: 649-650.

Leptinaria lamellata Pilsbry, 1906: 288-289. Pl. 42, figs. 39-40, pl. 43, fig. 50.

Leptinaria unilamellata Wenz, 1960: 348, fig. 1280

Leptinaria (Leptinaria) lamellata Haas, 1962: 52-53, pl. VII, figs. F-G

Leptinaria lamellata Duarte, 1977: 11, 28.

Classificação de *Leptinaria unilamellata*

Classe Gastropoda

Subclasse Pulmonata

Ordem Stylommatophora

Subordem Sigmurethra

Família Subulinidae

Gênero *Leptinaria* Beck, 1837

Leptinaria unilamellata (d'Orbigny, 1835)

História de vida em gastrópodes terrestres

Os moluscos terrestres podem apresentar diferentes estratégias de história de vida, envolvendo a reprodução, o crescimento e a longevidade, em função do padrão de alocação de recursos para os tecidos somáticos e aqueles relacionados à reprodução (ALMEIDA e BESSA, 2001a,b; CICHÓN, 1999; GUTIERREZ et al., 2001; HELLER, 2001; HODASI, 1979; MONTEIRO e KAWANO, 1998; SOUZA e MAGALHÃES, 2000). Os padrões de distribuição de energia para o crescimento e reprodução, influenciam na longevidade, tempo para o alcance da maturidade, intervalo entre eventos reprodutivos, número de filhotes por evento e número de eventos reprodutivos realizados no tempo total de vida, além de diferenças nos padrões de crescimento (HELLER, 2001). Todos os organismos exibem antagonismo entre o fornecimento de energia para a reprodução e para o crescimento e sobrevivência (HURD, 2001). Quando o aumento da alocação de recursos para a reprodução ocorre gradativamente ao longo da vida do organismo, espera-se uma maior sobrevivência após a maturidade, maior número de eventos reprodutivos ao longo da vida e um menor número de filhotes por evento reprodutivo. Por outro lado, quando há um grande esforço reprodutivo em um curto período de tempo, observa-se frequentemente um menor tempo de vida após o alcance da maturidade, menor número de eventos reprodutivos e maior número de filhotes por evento reprodutivo (HELLER, 2001; HURD, 2001).

A maior parte dos estudos sobre longevidade de moluscos terrestres e sua relação com outros aspectos da história de vida foi realizada com espécies de climas temperados (BAUR e BAUR, 2000; HELLER, 2001; HOMMAY et al., 2001; OCAÑA, 2003). Alguns estudos sobre longevidade foram desenvolvidos com o objetivo de determinar o ciclo de vida e padrões de reprodução e crescimento de moluscos (GRYPTA & OLI, 1988; OCAÑA, 2003). Para a lesma *Anadenus altivagus* (Rishi, 1956) foi observada uma longevidade de 720 dias, sob condições de laboratório (OCAÑA, 2003). RENDELL e COWIE (2003), afirmaram que o tempo de vida para *Succinea thaanumi* Ancy, 1899 foi de 253 dias e para *Catinella rotundata* Gould, 1846 foi de 267 dias, sob condições de laboratório. O tempo de vida dessas duas espécies de succínídeos é muito curto em comparação a muitos achatilenídeos, os quais podem viver até 19 anos (RENDELL e COWIE, 2003). No Brasil, o conhecimento das características do ciclo de vida desses animais, tais como estratégias reprodutivas, crescimento e longevidade, ainda se encontram em estado incipiente.

Com relação à longevidade, os gastrópodes terrestres foram classificados por HELLER (2001) em duas categorias: aqueles com curto tempo de vida, os quais vivem por até dois anos ou se reproduzem durante uma única estação, ou longo tempo de vida, os quais vivem por mais que dois anos e se reproduzem por ao menos duas estações. Entretanto, as observações relatadas por este autor se referem em grande parte a moluscos de climas temperados e ainda não há uma clara

resolução sobre os contextos de história de vida que favorecem estratégias com curto ou longo tempo de vida, especialmente para as espécies de clima tropical.

O conhecimento das relações existentes entre os padrões de reprodução, crescimento e longevidade, quando combinados representam as estratégias de história de vida das diferentes espécies de moluscos terrestres. O conhecimento dessas estratégias pode subsidiar estudos sobre a ecologia, filogenia, comportamento e biologia desses animais. Além disso, esse conhecimento é essencial para a estruturação de formas de manejo das populações de moluscos em risco de extinção, estratégias de controle das populações de parasitos que utilizam esses moluscos como hospedeiros intermediários (D'ÁVILA et al., 2004), assim como estratégias de controle de populações de moluscos que atuam como pragas agrícolas (ARAÚJO, 1989; PICORAL e THOMÉ, 1989).

Os estudos relacionados às estratégias de história de vida em moluscos terrestres são fundamentais na elucidação de como esses organismos alocam recursos energéticos ao longo da vida otimizando o sucesso reprodutivo (CICHÓN, 1999; NORTON e BRONSON, 2005). Os padrões de alocação de recursos direcionados para a reprodução e o crescimento em moluscos terrestres, estão associados com diferentes estratégias de história de vida, selecionadas ao longo da evolução (ANTKOWIAK e CHASE, 2003).

Há dois tipos de alocação de recursos durante a vida. No padrão mais comum, após o nascimento, toda a energia excedente é direcionada ao crescimento antes da maturidade, após a maturidade o crescimento pode cessar, e toda energia é direcionada à reprodução caracterizando o crescimento determinado. O outro padrão é caracterizado pelo crescimento após a maturidade até o final da vida, após a maturidade, o crescimento desacelera e finalmente pára, caracterizando o crescimento indeterminado (CICHÓN, 1999). O crescimento indeterminado foi observado nos moluscos terrestres *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Subulinidae) por D'ÁVILA e BESSA (2005) e *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (Bulimulidae) por SILVA et al. (2008). Diferentemente, o molusco terrestre *Bradybaena similaris* Ferrusac (1821) (Bradybaenidae) apresenta crescimento determinado e curto tempo de vida associada a um alto esforço reprodutivo em poucos eventos (CARVALHO et al., 2008).

O crescimento pós-maturidade pode não diminuir o sucesso reprodutivo, desde que organismos tenham um alto grau de compensação para sua baixa reprodução atual por um aumento na futura reprodução, devido a uma alta taxa de produção permitida pelo maior tamanho do corpo (CICHÓN, 1999). O crescimento continuado, associado à distribuição do esforço reprodutivo em muitos eventos durante a vida, representa uma estratégia que aumenta o sucesso reprodutivo. A distribuição do esforço reprodutivo compensa, em longo prazo, as desvantagens causadas pelo

antagonismo entre o crescimento e reprodução no evento reprodutivo atual. Mais tarde na vida, os moluscos são maiores e podem produzir um número maior de filhotes. SILVA et al. (2008), em um estudo da história de vida de *B. tenuissimus* verificaram que essa espécie apresenta tempo de vida longo e retarda a produção de ovos até atingir tamanho favorável. Segundo esses autores, os moluscos com maior tamanho ganham em sucesso reprodutivo pela produção de um número maior de filhotes.

Vários estudos sobre a biologia e o comportamento reprodutivo de moluscos, abordam como os padrões de história de vida estão associados com a alocação de energia (ANTKOWIAK e CHASE, 2003; EVANNO et al., 2005; HAASE e KARLSSON, 2004; ILANO et al., 2004; OCAÑA e EMSON, 1999; PARMAKELIS e MYLONAS, 2002; RAUT e PANIGRAHI, 1988; REISE, 1995). Os recursos destinados aos diferentes processos biológicos são limitados podendo existir antagonismo entre aspectos da história de vida, como reprodução, crescimento e longevidade. Como exemplo, uma diminuição no tempo para se tornar sexualmente maduro, pode levar a um aumento da longevidade (ZERA e HARSHMAN, 2001); um curto tempo de vida pode estar associado a um esforço reprodutivo máximo em poucos eventos (BAUR e BAUR, 2000). Sendo os recursos limitados, os diferentes padrões são caracterizados por *trade-offs* entre duas características da história de vida de um organismo.

NORTON e BRONSON (2005) encontraram uma relação negativa entre o crescimento e a reprodução durante o período de produção de ovos, isso evidencia a alocação de recursos, a energia alocada à reprodução não é disponível para o crescimento e outras atividades. A disponibilidade de alimento, portanto, limitaria a preferência do papel sexual (NORTON e BRONSON, 2005). A morte dos indivíduos após a postura observada em alguns estudos indica que o sucesso de vida nestas espécies está associado ao seu curto tempo de vida e alta produtividade (ELEUTHERIADIS e LAZARIDOU-DIMITRIADOU, 2001; GRYPTA e OLI, 1988;). A energia é principalmente direcionada à reprodução, em detrimento dos recursos utilizados para a manutenção da sobrevivência e homeostase, no período posterior à reprodução (GRYPTA e OLI, 1988).

A influência do tamanho e do *trade-off* existente entre crescimento e reprodução, na escolha do papel sexual levantaria uma hipótese, de que indivíduos de maior tamanho são capazes de uma maior produção de ovos. A possível explicação é de que esses indivíduos teriam que investir no crescimento primeiramente a fim de que no futuro, possuam uma maior produção de ovos. A produção de ovos é um processo metabolicamente caro associado a um alto custo, sendo um processo limitado por recursos. Devido a esse fato, a produção de ovos somente deve ocorrer quando o tamanho da prole ultrapassa um valor mínimo no qual os benefícios reprodutivos ultrapassem os custos investidos no evento reprodutivo. Maiores posturas de ovos evitariam a dessecação, por outro lado os riscos de predação podem favorecer deposições mais frequentes de

pequenas posturas em sítios múltiplos (ANTKOWIAK e CHASE, 2003). Nas espécies que possuem ovos sem uma casca calcárea protetora à dessecação, várias estratégias são adotadas como, escavação de um ninho para deposição de ovos (ALMEIDA e BESSA, 2001; OCAÑA e EMSON, 1999), arranjo da disposição dos ovos (OCAÑA e EMSON, 1999) e produção de pelotas fecais especiais depositadas na ovipostura (RAUT e PANIGRAHI, 1988).

VAREILLE-MOREL et al. (1998) observaram que em *Lymnaea truncatula* Müller, 1774, a produção de ovos foi influenciada pela temperatura e umidade. A diminuição na densidade de massas de ovos foi resultado da diminuição do número de adultos, que alcançaram o seu tamanho máximo e morreram, e pela maior produção de ovos por molusco no começo do período de produção e queda no número até o final da vida. A taxa de fecundidade diminui possivelmente devido à estocagem de espermatozóides que ao longo do tempo podem perder ou diminuir sua capacidade de fertilização.

Seleção sexual em gastrópodes terrestres

Em hermafroditas, a posse dos dois sistemas reprodutivos funcionais, levaria os mecanismos de seleção sexual a agirem principalmente pós-copulatoriamente, diferente dos animais gonocoristas (BEESE et al., 2005, EVANNO et al., 2005). A adoção de diferentes padrões visa a maximização do sucesso reprodutivo, caracterizando a história de vida adotada pelo organismo (CICHÓN, 1999). Em moluscos a seleção sexual tem um papel fundamental como mecanismo que favorece a seleção a favor de comportamentos associados ao sucesso de acasalamento, escolha do parceiro e maior fecundidade (EVANNO et al., 2005).

A habilidade de autofertilização é considerada valiosa quando utilizada como um último recurso, devido ao declínio da população, as chances para fertilização cruzada diminuem, e o animal é capaz de contribuir para a perpetuação da espécie por assegurar a reprodução em uma baixa densidade populacional. As desvantagens podem incluir uma redução no sucesso reprodutivo imediato causado pela diminuição na própria prole, e baixa diversidade genética resultante da recombinação reduzida (GÓMEZ, 2001). Para hermafroditas simultâneos, a opção para reproduzir através da autofertilização ou fertilização cruzada é, portanto, uma das mais importantes características da história de vida. Nenhum caso de partenogênese foi registrado ou auto cópula no qual o pênis do próprio indivíduo foi propelido a sua própria vagina. Na fertilização cruzada os espermatozóides são descarregados na bolsa copuladora, mas não permanecem ali, indo até o espermioviduto para a região do carrefour, onde a fertilização ocorre possivelmente na câmara de fertilização (DUNCAN, 1975).

MONTEIRO e KAWANO (1989) afirmam que mesmo com a vantagem que o hermafrodita possui, por possuir um aparelho reprodutor comum aos dois sexos, o modelo gonocorista ainda é mais econômico, já que este investe apenas no desenvolvimento e manutenção de um sistema reprodutor, e na produção de apenas um tipo de gameta. Conseqüentemente, num balanço final, dois hermafroditas simultâneos têm menos energia disponível para aplicar na produção de gametas do que dois indivíduos de uma espécie gonocorista.

Há um dilema na alocação dos recursos entre a função feminina e masculina, ambos durante um simples encontro e durante seu tempo reprodutivo em hermafroditas, conceituado como, conflito do hermafrodita. Há quatro opções de reprodução, no que diz respeito ao destino dos espermatozoides: fertilizar seus óvulos com os próprios espermatozoides (auto-espermatozoides); dar preferência aos espermatozoides recebidos do parceiro (aloespermatozoides) para fecundar seus próprios óvulos, isto é, praticar fecundação cruzada; transferir parceladamente certas quantidades de seus espermatozoides a um parceiro; partilhar espermatozoides, fertilizando seus óvulos com espermatozoides que seu parceiro recebeu, anteriormente, de outro parceiro em uma cópula anterior (MONTEIRO e DIAS, 1989). É possível que os caramujos usem os aloespermatozoides nas etapas iniciais de troca para não arriscar os seus auto-espermatozoides em um processo no qual a evasão do parceiro ou o uso de gametas como nutriente é possível (MONTEIRO e KAWANO, 1989).

Há uma correlação positiva entre o tamanho do corpo e a produção de ovos. Essa correlação influenciaria a escolha de um papel sexual particular em relação a um dado tamanho, indicando uma adaptação a indivíduos maiores agirem como fêmeas, já que os ovos são mais custosos alocariam mais energia, e pequenos indivíduos atuarem como machos (NORTON e BRONSON, 2005). O acasalamento recíproco seria comum quando os animais fossem de tamanho similar, assim isso poderia levar ao conflito quando a reciprocidade é impedida ou pela anatomia ou vantagem de preferência de um papel (LEONARD, 1991). Em hermafroditas a evidência na escolha de acasalamento é rara e isso pode ser devido a dois fatores: os caracteres envolvidos na escolha são difíceis de detectar, ou a seleção sexual age essencialmente durante ou após a cópula. A habilidade de longa duração de armazenamento do espermatozoide pode aumentar o potencial de seleção sexual pós-copuladora (EVANNO et al., 2005).

Em espécies onde múltiplas inseminações ocorrem, poderá haver competição entre os espermatozoides fornecidos por diferentes doadores, e as fêmeas podem selecionar pós-copulatoriamente os espermatozoides, já que eles carregam a informação da qualidade do macho. A escolha críptica da fêmea é exercida através de mecanismos moleculares e fisiológicos e ou por estruturas morfológicas no trato reprodutivo da fêmea (HAASE e BAUR, 1995). O lançamento do dardo pode promover algumas formas de seleção sexual pós-copulatória. Logo antes da cópula, os

moluscos empreendem o dardo calcáreo em seus parceiros, os quais eventualmente aumentam o número de espermatozoides armazenado pelo recipiente através de uma modificação temporária na genitália feminina causada por elementos químicos no muco que cobre o dardo. O doador, portanto evitaria a digestão da maioria dos espermatozoides dentro da bolsa copuladora do receptor, e, portanto aumenta o seu sucesso reprodutivo (EVANNO et al., 2005).

Os interesses antagônicos entre os sexos podem levar à evolução de adaptações especiais: ao invés de evitar serem inseminados, indivíduos de muitas espécies de moluscos digerem o espermatozoides recebido, o que pode influenciar o surgimento de seleção sexual pós-copulatória com respeito às características dos espermatozoides e o tamanho do órgão feminino armazenador de espermatozoides. A digestão de espermatozoides reduz a habilidade competitiva dos espermatozoides e pode haver seleção para o aumento do número de espermatozoides, assim como estruturas para proteger o espermatozoides contra a digestão. Um alto número de túbulos na bolsa copuladora pode permitir uma melhor separação de espermatozoides de diferentes parceiros e também um uso seletivo do espermatozoides para a fertilização, favorecendo um parceiro em particular (EVANNO e MADEC, 2007).

Uma grande quantidade de espermatozoides transferidos de diferentes machos, a existência de órgãos para o armazenamento dos espermatozoides e de mecanismos para a digestão do excesso de espermatozoides pode ser uma evidência de interações intersexuais, onde a evolução de um caráter reprodutivo no trato masculino dispara uma resposta evolutiva no trato feminino e vice-versa. A competição espermática e a interação entre as características do espermatozoides do macho com o ambiente morfológico e fisiológico do trato reprodutivo feminino podem gerar oportunidades para outros aspectos da seleção sexual pós-copulatória, como escolha críptica da fêmea e conflito sexual (EVANNO e MADEC, 2007). Como o fluxo gênico é restrito entre populações, a coevolução dos tratos reprodutivos pode constituir uma fonte importante de incompatibilidade reprodutiva entre indivíduos de diferentes populações. O resultado pode ser uma rápida divergência genética e eventual especiação, particularmente em grandes populações.

De acordo com os autores EVANNO et al. (2005), o comportamento reprodutivo de *Helix aspersa* Müller, 1774 envolve várias características, como múltiplos acasalamentos, armazenamento de longa duração de espermatozoides e comportamento de lançamento de dardo, os quais podem promover competição espermática. A escolha críptica da fêmea pode ocorrer através da espermateca, subdividida em túbulos, os quais potencialmente permitem compartimentalizar o armazenamento de espermatozoides de sucessivos acasalamentos.

Com essas informações podemos concluir que os potenciais mecanismos envolvidos na seleção sexual pós copulatória de gastrópodes terrestres incluiriam: comportamento de lançamento de dardo, habilidade na digestão do espermatozoides e escolha críptica da fêmea.

Morfologia de gastrópodes terrestres

Os gastrópodes pulmonados terrestres se caracterizam por serem hermafroditas simultâneos, ou seja, possuem órgãos reprodutivos masculinos e femininos funcionais ao mesmo tempo, e pela alta complexidade de seu sistema reprodutor (DUNCAN, 1975). O conhecimento da biologia reprodutiva dos gastrópodes pulmonados é essencial no manejo de populações em risco de extinção, no controle de espécies que atuam como pragas agrícolas, no controle de helmintos parasitos que os utilizam como hospedeiros intermediários e manutenção de espécies comestíveis (BARKER, 2001; GÓMEZ, 2001). Dentre os principais aspectos abordados nos estudos de biologia reprodutiva, a informação acerca da morfologia do sistema reprodutor (anatomia e histologia) e seus aspectos funcionais se destacam, por fornecer importantes dados na distinção das diferentes linhagens dentro do grupo e nos estudos de filogenia.

Há algumas dificuldades na literatura com relação à terminologia da morfologia do trato reprodutivo pulmonado, devido principalmente, a utilização de palavras originalmente usadas para vertebrados, diferentes porções da parte feminina nomeadas independentemente por diferentes trabalhos e órgãos nomeados com base na sua função, sem ter sido esta comprovada (DUNCAN, 1975). Apesar disso, informações a cerca da morfologia do sistema reprodutor, têm levado a um importante aumento em estudos de biosistemática, com o objetivo de entender a história evolutiva e as relações das linhagens de gastrópodes terrestres (BARKER, 2001).

Os moluscos pulmonados são hermafroditas e apresentam uma gônada única, o ovotestis, responsável pela produção de gametas masculino e feminino. De acordo com HOLM (1946), o sistema reprodutivo hermafrodita é composto por 3 divisões: a glândula hermafrodita e ducto, o trato genital feminino e o trato genital masculino. O sistema reprodutor destes moluscos caracteriza-se pela presença de um gonoduto palial dentro da cavidade corporal; separação da glândula do albúmen da glândula da cápsula, que possui sua própria abertura no gonoduto palial; presença de um longo duto na bolsa copulatória, que mantém sua abertura na parte distal do gonoduto palial ainda com seu saco retendo uma associação com o pericárdio e a presença de um pênis, que se retrai dentro da cavidade corporal quando o animal não está sexualmente ativo (MORTON, 1955 *apud* FRETTER e PEAKE, 1975; GÓMEZ, 2001).

Os gastrópodes pulmonados exibem uma grande diversidade com respeito aos seus sistemas reprodutivos, refletindo na sua filogenia. Todos possuem uma simples gônada localizada na massa visceral, usualmente intrínseca a glândula digestiva, o ovotestis. O ovotestis se abre em um gonoduto, o qual tem funções de conduzir os gametas através do poro genital, e no qual varia em complexidade de um táxon ao outro (BARKER, 2001). Possuem um sistema reprodutor complexo, cujas funções primárias são a produção de espermatozóides e oócitos; armazenamento e transporte

de gametas maduros em um meio adequado; papéis estruturais e fisiológicos nos processos de corte e cópula, transferência de espermatozoides endógenos aos dutos reprodutivos do parceiro; recepção de espermatozoides exógenos; oferecer um sítio e microambiente próprios para a fertilização do oócito, recobrir os zigotos com camadas nutritivas e protetoras, reabsorção de produtos reprodutivos remanescentes e, finalmente, a ovipostura.

O sistema reprodutor dos moluscos pulmonados apresenta grande variação quanto à forma e função das estruturas que o compõem, especialmente no que diz respeito às estruturas masculinas envolvidas no processo de cópula. Entre os Stylommatophora, a morfologia do complexo peniano é muitas vezes espécie-específica e essa variação é interpretada como uma forma de reforço das barreiras reprodutivas entre espécies (HEALY, 2001). A genitália terminal desses pulmonados geralmente apresenta um conjunto elaborado de estruturas relacionadas à cópula, assim como estruturas para a produção e recepção de espermatozoides e órgãos estimuladores auxiliares (BARKER, 2001). A morfologia do aparelho genital masculino integra o conjunto de critérios utilizados na sistemática de veronicellídeos (THOMÉ, 1965, 1967, 1970a, b, 1971, 1972, 1975, 1976, 1981, 1983, 1984, 1986), planorbídeos (LIMA et al., 1993; PARAENSE, 1975, 1981, 1984, 1987, 2003; PARAENSE e DESLANDES, 1955; PARAENSE et al., 1992; YONG et al., 2001), dentre outros pulmonados (ARAÚJO, 1982; ARAÚJO e BESSA, 1993; ARAÚJO et al., 1960; BAUR et al., 2000, JURBERG, 1964, 1988; LANZIERI, 1965; LANZIERI e REZENDE, 1965; REZENDE et al., 1962; SALGADO et al., 1995).

A compreensão dos eventos envolvidos na reprodução, desde a gametogênese até a liberação de ovos ou filhotes no meio externo, depende do estudo da morfologia macro (anatomia) e microscópica (histologia) de cada componente do sistema reprodutor (FURTADO et al., 2004; JOOSE e REITZ, 1969; MONTEIRO e KAWANO, 1998; OSSELAER e TURSCH, 2000). O conhecimento da morfologia dos órgãos, ductos e glândulas do sistema reprodutor permite elucidar o papel de cada uma dessas estruturas (GÓMEZ 2001; JOOSE e REITZ 1969), discriminar as variações funcionais entre espécies (GÓMEZ, 2001), compreender suas estratégias reprodutivas (MONTEIRO et al., 1984; MONTEIRO e DIAS, 1989), subsidiar estudos de sistemática (BARKER, 2001), auxiliar na descrição de espécies (PARAENSE, 1984, 2002, 2003), e, em certos casos, diferenciar espécies de um mesmo gênero (RODRIGUES e MARTINS, 2003).

O conhecimento gerado pelos estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor de gastrópodes pulmonados tem contribuído significativamente para a compreensão da história evolutiva desse grupo. Fornecendo o conhecimento necessário para a resolução de questões de natureza prática, como a correta identificação das espécies e o controle e manejo de populações. A morfologia corrobora estudos comportamentais e ecológicos no aspecto da biologia reprodutiva e

história de vida, como os processos envolvidos no acasalamento, digestão e armazenamento de gametas, seleção copulatória, entre outros aspectos. Os moluscos pulmonados possuem várias vantagens em estudos de genética micro evolutiva, apresentam diversidade intra e interpopulacional, possuem baixa mobilidade e são geralmente tolerantes às condições de laboratório. Essas vantagens levam a um amplo interesse nos pulmonados entre os estudiosos de ecologia e genética de populações, e geram uma literatura extensa correspondente (CLARKE, 1975).

Além da importância para a sistemática tradicional, os conhecimentos acumulados a respeito da morfologia do sistema reprodutor dos gastrópodes pulmonados têm contribuído muito para os estudos em sistemática filogenética. Características morfológicas, tais como a presença de glândula de albúmen espacialmente separada, gonoduto palial localizado fora da cavidade palial e livre na cavidade corporal, presença de uma câmara para fertilização – receptáculo seminal, presença de um pênis retrátil, gonodutos paliais masculino e feminino, fundidos ou separados, são utilizadas para a reconstrução das relações filogenéticas deste grupo (BARKER 2001).

De acordo com BARKER (2001), apesar de a monofilia de Pulmonata ser geralmente aceita, as relações filogenéticas entre as várias radiações adaptativas reconhecidas como pertencentes a este grupo não estão bem resolvidas e como conseqüência, a nomenclatura e a taxonomia deste grupo ainda não está bem estabelecida. Por este motivo, o desenvolvimento de esquemas de classificação baseados em relações evolutivas é de grande interesse. Entretanto, é necessário um grande esforço para o conhecimento da morfologia das espécies, especialmente nos ambientes tropicais, uma vez que as reconstruções filogenéticas mais consistentes apresentadas até o presente baseiam-se em caracteres morfológicos (PONDER e LINDBERG, 1997).

A análise histológica dos diferentes órgãos do sistema reprodutivo de gastrópodes terrestres, bem como a identificação e a procedência das secreções elaboradas, permitem entender a funcionalidade e fisiologia de cada componente e a sua integração na reprodução desses animais (DUNCAN, 1975; GÓMEZ, 2001). A caracterização das células e tecidos de função estrutural e secretora que compõem os órgãos, assim como a formação dos gametas, elucidam aspectos da gametogênese; do processo copulatório; local de fertilização; transferência de espermatozoides; recepção do exoesperma; armazenamento de gametas e do desenvolvimento dos ovos (ARAÚJO e BREURE, 1977; ARAÚJO et al., 1960; JURBERG, 1964; LANZIERI, 1964; PENA et al., 2005; REZENDE e LANZIERI, 1963; REZENDE e LANZIERI, 1964; REZENDE et al., 1972; TEIXEIRA et al., 2006).

Em moluscos a conceituação de oviparidade e viviparidade é controversa (DUTRA, 1988). Essa classificação se baseia no local do desenvolvimento do embrião (dentro do duto reprodutivo ou não), na origem dos nutrientes e no meio de obtê-lo pelo embrião (MACKIE, 1978). A maioria dos gastrópodes terrestres é ovípara e liberam seus ovos contendo somente uma única célula zigótica.

Algumas espécies podem reter seus ovos dentro do ducto reprodutivo, e quando estes são liberados podem conter embriões em estado avançado de desenvolvimento, os casos extremos de retenção de ovos em que os nutrientes utilizados provêm somente do ovo são chamados de ovoviviparidade. Em espécies em que os nutrientes são passados do organismo parental ao embrião, o termo viviparidade é aplicado. Somente através da morfologia do trato reprodutivo, é possível caracterizar a estratégia reprodutiva adotada, corroborando as observações comportamentais registradas para espécies de moluscos até o presente momento.

Várias descrições de espécies de moluscos são baseadas somente na morfologia da concha, levando a identificações sem precisão. Dados relevantes da morfologia do sistema reprodutor podem fornecer ferramentas úteis a serem utilizadas na identificação correta de espécies de difícil descrição, elucidando as possíveis dúvidas. Sobretudo, dentre os vários aspectos abordados nos estudos de moluscos, esses dados tem principal importância, trazendo informações que auxiliam no conhecimento da reprodução e do comportamento desses animais (FURTADO et al., 2004). NAGGS (1994) relata que, apesar de em muitos casos a caracterização dos gêneros de subulinídeos com base somente na concha não ser satisfatória, o estudo do sistema reprodutor, pode promover o reconhecimento dos gêneros com base em características conquiliológicas com mais confiança. Esse mesmo autor afirma que há grande dificuldade no estabelecimento das espécies desse grupo, já que a maioria tem sido descritos repetidamente como um novo taxa, provavelmente esse grupo representa relativamente poucas espécies, mas não tem sido rigorosamente estabelecido.

A maior parte das espécies do filo Mollusca possui concha. Historicamente, a morfologia da concha foi utilizada para delimitação das espécies e definições de gêneros dos moluscos terrestres (KAMEDA et al., 2007). Como exemplo, por Martin Lister, Johann Chemnitz, Jean G. Brugüiere, Linnaeus, O. F. Muller e outros naturalistas do século XVII e XVIII, na tentativa de classificar este grupo (WILKE et al., 2002), que possui diversos hábitos, habitats, formas, colonização, estratégias de vida, adaptações, distribuição geográfica, dentre outras características. Atualmente, o estudo da morfologia/morfometria da concha se tornou uma das ferramentas necessárias na análise da variabilidade de populações de gastrópodes com o objetivo de utilização para fins sistemáticos, biológicos e evolutivos. O conhecimento do polimorfismo da concha pode servir de subsídio como ferramenta complementar nos estudos de variabilidade populacional. Sendo que juntamente com métodos estruturais, como anatomia do sistema reprodutor e ferramentas moleculares, um maior entendimento da radiação do grupo em estudo pode ser estabelecido, e ser verificado se a variabilidade entre as populações se reflete a nível interespecífico ou intraespecífico.

Segundo TRYON e PILSBRY (1906), as espécies do gênero *Leptinaria* Beck, 1839 são de difícil e crítica diagnose, por apresentarem grande variação da concha, com morfologias extremas

que se unem por morfologias intermediárias. Portanto, o estudo morfológico e molecular de espécies desse gênero, seria de fundamental importância na definição correta de espécies que apresentam morfologias das conchas muito semelhantes (ARAÚJO, 1982). Sobretudo do polimorfismo da concha de espécimes desse gênero de diferentes populações, devido que em alguns casos essa variabilidade apresenta-se sutilmente. Adicionalmente, o estabelecimento morfológico da morfologia interna, se apresenta como importante ferramenta na diferenciação interespecífica. Com o recente aumento do interesse de situações em que os moluscos têm sido importantes modelos biológicos em estudos evolutivos e ecológicos (KAMEDA et al., 2007), a identificação correta das espécies se torna de extrema importância.

A palavra espécie significa “aquilo que se vê”, vem de uma raiz indo-européia, *spek*, de onde também deriva, por exemplo, “retrospectiva”, olhar para trás. A forma é a mais antiga fonte de informação utilizada no reconhecimento dos organismos, em comparação, o reconhecimento a partir do comportamento, fisiologia ou da biologia molecular, é recente. Ao longo do século XX, houve várias tentativas de formalizar a análise da forma, apenas a partir do final da década de 80, com a disponibilidade de ferramentas computacionais poderosas, novos conceitos e a solução de problemas matemáticos, ingressaram-se uma nova era nas análises morfométricas (MONTEIRO e REIS, 1999) A quantificação de fenômenos por meio de modelos matemáticos e métodos estatísticos é uma prática estabelecida em diversos ramos da biologia (PERES-NETO et al., 1995; MONTEIRO e REIS, 1999).

O tipo de ambiente pode influenciar na morfologia da concha. Em geral, moluscos que habitam áreas de florestas primárias pouco alteradas com maior umidade e menores temperaturas, apresentam um maior crescimento da concha. Já os que habitam áreas de maior alteração antrópica, apresentam menor largura da abertura, isso pode estar relacionado à uma menor retenção de umidade e temperaturas maiores apresentadas nessas áreas, já que a serrapilheira é mais escassa (SANTOS, 2007). O estudo da variabilidade da morfometria da concha pode resultar na constatação de diferentes padrões morfométricos. As relações morfométricas fornecem instrumentos que permitem inferir sobre a forma e o padrão de crescimento da concha, um exemplo é a relação altura/diâmetro que indica a forma da concha, se trocóide ou globóide. Esses padrões podem complementar estudos de autoecologia, estabelecendo relações entre a forma da concha e o tipo de ambiente em que as espécies se encontram.

Estudos recentes anatômicos e moleculares têm encontrado que muitas das espécies nominais geralmente não refletem linhagens evolutivas verdadeiras (KAMEDA et al., 2007). Em alguns casos, populações regionais com morfologias das conchas peculiares são erroneamente vistas

como espécies independentes, ou caso contrário representam variantes geográficas de espécies com uma ampla distribuição (DAVISON et al., 2005).

O padrão de diferenciação morfológica pode refletir o estágio de especiação alopátrica em populações isoladas geograficamente (KAMEDA et al., 2007). Devido à baixa mobilidade das populações de moluscos, ocorre um baixo fluxo genético entre as populações o que levaria a microhabitats parcionados e potenciais adaptações morfológicas e de história de vida relacionadas idealmente às condições locais (PFENNINGER e POSADA, 2002). Como exemplo, os indivíduos podem possuir o mesmo genótipo para uma particular taxa de potencial crescimento, entretanto, se o crescimento apenas ocorre quando existem condições ambientais ideais, resultando em diferentes fenótipos diferentes de acordo com cada tipo de habitat (ANDERSON et al., 2007).

Recentemente, os avanços na habilidade de manipular o ácido desoxirribonucléico (DNA) com precisão permitiram o desenvolvimento de técnicas que tem sido amplamente empregadas em estudos sobre a sistemática de diversos organismos. O uso de métodos moleculares em associação com os aspectos morfológicos tem se mostrado muito útil na identificação de espécies de diversos grupos de moluscos terrestres. Dentre estes métodos, a clivagem de DNA em sítios específicos, por meio de nucleases de restrição, tem sido utilizada para a resolução de problemas relacionados à identificação de espécies e diferenciação de populações de gastrópodes pulmonados. As nucleases de restrição são enzimas produzidas por diferentes bactérias e apresentam a função de degradar o DNA de vírus que venham infectá-las. Estas enzimas podem ser purificadas e empregadas em bioensaios para cortar a dupla hélice de DNA em sítios específicos, definidos por uma seqüência particular de nucleotídeos. Dessa forma, uma longa molécula de DNA de fita dupla pode ser clivada em fragmentos de tamanhos definidos. Cada nuclease reconhece uma seqüência específica de quatro a oito nucleotídeos e, portanto, diferentes nucleases de restrição apresentam especificidades diferentes. Quando os sítios de restrição em regiões alvo do DNA são espécie-específicos, é possível realizar a diferenciação molecular de espécies por meio da análise de polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição.

A amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela análise de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) de regiões do DNA tem sido utilizada com resultados positivos na distinção de espécies de um mesmo gênero (SPATZ et al., 1999; CALDEIRA et al., 2000; STOTHARD et al., 2000; JORDAENS et al., 2006). Esta técnica é baseada na amplificação de regiões específicas do DNA genômico ou mitocondrial, seguida pela clivagem de fragmentos resultantes com enzimas de restrição. Alguns polimorfismos no DNA ocorrem nesses sítios de clivagem dessas enzimas, dessa forma o tamanho e o número de fragmentos obtidos pela digestão podem diferir entre indivíduos, resultando em polimorfismo no tamanho dos fragmentos de

restrição, os quais podem ser utilizados como marcadores para a construção de mapas genéticos (FARALE, 1997).

Os polimorfismos em gastrópodes terrestres envolvem coloração externa e padrões de pigmentação, morfologia da concha, estruturas do sistema reprodutor, padrões eletroforéticos de proteínas, marcadores de DNA e cromossomos (BACKELJAU et al., 2001). A discriminação entre espécies de gastrópodes terrestres através de características morfológicas, nem sempre é suficiente devido as similaridades morfológicas entre espécies (CHOH et al., 2006) e pelas variações morfológicas existentes entre populações de uma mesma espécie (CALDEIRA et al., 2000). Nestes casos, o uso de métodos moleculares em associação com os aspectos morfológicos tem se mostrado muito útil ajudando a esclarecer se diferentes populações pertencem ou não a uma mesma espécie (RAAHAUGE e KRISTENSEN, 2000; CHOH et al., 2006), bem como separar espécies que são indistinguíveis, quando a identificação é baseada somente na morfologia da concha (SPATZ et al., 1999). Além disso, os estudos morfológicos podem ser corroborados por estudos moleculares, e estes potencialmente fornecem caracteres para análise filogenética (BARKER, 2001). Devido ao desenvolvimento dos órgãos do sistema reprodutivo ser considerado intraespecífico, sazonal e variável fisiologicamente em Stylommatophora, e de difícil identificação em indivíduos imaturos, a identificação molecular pode ser aplicada na diferenciação de linhagens dentro do grupo (JORDAENS et al., 2006).

Os conhecimentos gerados pelos estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor e a biologia molecular de gastrópodes pulmonados terrestres têm contribuído significativamente para a compreensão da história evolutiva desse grupo de moluscos. Além de fornecer o conhecimento necessário para a resolução de questões de natureza prática, como a correta identificação das espécies e o controle e manejo de populações. A reconstrução tridimensional, tanto no aspecto anatômico quanto ao histológico do sistema reprodutivo de gastrópodes terrestres levam a uma maior compreensão dos eventos envolvidos na reprodução, esclarecendo aspectos ainda não compreendidos. A morfologia corrobora estudos comportamentais e ecológicos no aspecto da biologia reprodutiva e história de vida, como os processos envolvidos no acasalamento, digestão e armazenamento de gametas, seleção copulatória, entre outros aspectos.

Espécies que apresentam uma alta variabilidade de polimorfismos na concha são de difícil identificação, constituindo um complexo de espécies, como observados em ampularídeos do gênero *Biomphalaria* (CALDEIRA et al., 2000). Nesses casos, a distinção das espécies por meio da comparação da morfologia não é conclusiva e técnicas moleculares podem ser utilizadas como ferramentas complementares. Estudos que envolvam tanto os dados morfológicos quanto as análises moleculares permitem uma melhor compreensão e interpretação da diversidade biológica dos

espécimes em estudo. Um correto entendimento da identidade específica em moluscos terrestres é adquirido pela integração de várias investigações, incluindo a análise da morfologia da concha, conhecimento da morfologia interna e da variação genética de populações, baseado em uma ampla amostra geográfica de diferentes populações.

**ESTRATÉGIA DE HISTÓRIA DE VIDA DE *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835)
(MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE)**

INTRODUÇÃO

Os estudos relacionados às estratégias de história de vida em moluscos terrestres são fundamentais para esclarecer como esses organismos alocam recursos energéticos ao longo do tempo de vida, para a otimização do sucesso reprodutivo (CICHÓN, 1999; NORTON e BRONSON, 2005). Esses padrões de alocação de energia entre o crescimento e a reprodução, estão associados a diferentes estratégias de história de vida, selecionadas ao longo da evolução (ANTKOWIAK e CHASE, 2003). No entanto, a maior parte dos estudos sobre longevidade em moluscos terrestres, e sua relação com outros aspectos da história de vida, envolve espécies de regiões temperadas (BAUR e BAUR, 2000; HELLER, 2001; HOMMAY et al., 2001; OCAÑA, 2003). Poucos são os estudos realizados em regiões tropicais como o Brasil.

Leptinaria unilamellata (d'Orbigny, 1835) é um molusco terrestre que pode ser encontrado no Brasil e Bolívia (SIMONE, 2006). No Brasil, populações dessa espécie ocorrem no Amazonas, Pará, Rondônia, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (ARAÚJO, 1982). A fácil manutenção dessa espécie em laboratório permite sua utilização como modelo biológico em estudos de biologia e morfologia (ALMEIDA e BESSA, 2001; ARAÚJO, 1982; BRANDOLINI e GOMES, 2002; DUTRA, 1988). Entretanto, em todos os estudos prévios sobre *L. unilamellata*, os padrões de crescimento e reprodução não foram interpretados com o objetivo de determinar sua história de vida. Em relação à biologia dessa espécie, um aspecto que precisa ser esclarecido é a relação entre o organismo parental e os embriões. Por meio de observações comportamentais, verifica-se que, ao final do processo reprodutivo, os adultos liberam filhotes no ambiente externo. Entretanto, para esclarecer se os embriões se desenvolvem por ovoviviparidade ou por viviparidade, é necessária a investigação da morfologia do sistema reprodutor.

No presente trabalho, a estratégia de história de vida de *L. unilamellata* foi caracterizada. Foram determinados os padrões de crescimento, reprodução e longevidade dessa espécie, bem como suas inter-relações. Além disso, foi elucidada a estratégia relacionada ao desenvolvimento dos embriões, através de observações biológicas e do estudo da morfologia do útero grávido.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Manutenção dos moluscos

As criações matrizes de moluscos foram estabelecidas com espécimes coletados no município de Juiz de Fora, Minas Gerais (21° 45' 50" S, 43° 21' 0" W) (678 metros de altitude em relação ao nível do mar). Sessenta indivíduos recém nascidos foram mantidos em caixas plásticas transparentes (14 cm de diâmetro, 9 cm de altura), com 30 indivíduos por caixa, em duas réplicas. Os grupos experimentais foram submetidos ao mesmo tratamento. O fundo de cada caixa foi recoberto com terra vegetal, que foi umedecida a intervalos de dois dias, com 10 ml de água de torneira. Os moluscos foram alimentados *ad libitum* com alimento comercial de aves suplementado com carbonato de cálcio (na proporção 3:1) (BESSA e ARAÚJO, 1995). Os moluscos foram mantidos sob temperatura ambiente e condições naturais de luz e temperatura. Este estudo foi conduzido no período de 17 de Setembro de 2004 a 17 de Agosto de 2007, por um total de 142 semanas.

Com o objetivo de verificar o número de eventos reprodutivos (presença de filhotes no terrário) e número de filhotes produzidos por indivíduo, após o alcance da maturidade sexual, cada molusco foi mantido individualmente em caixas plásticas transparentes (10 cm de diâmetro, 6 cm de altura), com as mesmas condições descritas anteriormente.

2.2.2 Crescimento, reprodução e sobrevivência

Para verificar as características da história de vida de *L. unilamellata*, foi verificado, para os moluscos de cada réplica, a sobrevivência, o aumento médio no comprimento da concha e tempo médio para o alcance da maturidade sexual. Após o alcance da maturidade, foi verificado o número de filhotes produzidos, a longevidade e o crescimento de cada indivíduo. A partir desses dados, foram calculadas a taxa de crescimento (aumento do comprimento da concha por dia) e a fecundidade (número total de filhotes produzidos pelo número total de eventos reprodutivos realizados).

O comprimento da concha de cada indivíduo foi verificado, utilizando-se um paquímetro com 0,1 mm de precisão. Até a idade de 90 dias de vida, os comprimentos das conchas foram medidos a intervalos de 15 dias. Após essa idade, as medidas foram tomadas a intervalos de 30 dias.

A presença de embriões no útero dos moluscos, visualizada através da transparência da concha, indicou o alcance da maturidade sexual. Para o registro da mortalidade, o número de

eventos reprodutivos e o número de jovens produzidos por indivíduo, os moluscos foram observados semanalmente desde o alcance da maturidade até a morte do último indivíduo.

Os dados referentes aos jovens, desde o início do experimento até o alcance da maturidade sexual, representam os valores médios por réplica, enquanto os dados referentes aos adultos representam os valores médios calculados a partir dos dados de cada indivíduo. Para verificar a existência de diferenças no crescimento dos moluscos durante a fase jovem (antes do primeiro evento reprodutivo) e a fase adulta do ciclo de vida, foi utilizado o teste t de Student. Para verificar a existência de correlação entre o número de eventos reprodutivos e o número de filhotes produzidos; o número de eventos reprodutivos e taxa de crescimento; e entre o número de filhotes produzidos e a taxa de crescimento, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson ($p \leq 0.05$).

2.2.3 Histologia do útero grávido

Para elucidar a estratégia apresentada pelos moluscos em relação ao desenvolvimento dos embriões, foi investigada a morfologia do útero grávido. Para o estudo histológico, seis indivíduos adultos foram fixados em Formalina de Carson Milloning (CARSON et al., 1973) e processados seguindo as etapas da técnica histológica convencional. Os cortes de 5 μ m foram corados por hematoxilina e eosina e observados sob um microscópio de contraste de fase diferencial e interferencial. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas através de uma câmera digital acoplada ao microscópio e analisadas com o programa Image Pro Plus 5.0.

2.2.4 Anatomia do útero grávido e relação entre tamanho e características reprodutivas

Para o estudo anatômico, 60 espécimes (30 indivíduos com a idade de 80 dias de vida e 30 indivíduos adultos com diferentes idades), foram fixados em álcool 70% e dissecados sob microscópio estereoscópico. Para verificar a relação entre tamanho e características reprodutivas, foram utilizados 30 indivíduos adultos previamente utilizados no estudo anatômico. Foram medidos o comprimento e a largura da concha, glândula de albúmen e útero, utilizando um paquímetro com 0,1 cm de precisão. Além disso, foram determinados o número de voltas da concha e o número de embriões dentro do útero. Para verificar a existência de correlação entre essas variáveis, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson ($p \leq 0.05$).

2.2.5 Análise do conteúdo de glicogênio e galactogênio em moluscos jovens, adultos e senescentes

O conteúdo de glicogênio e galactogênio na massa cefalopodal, glândula digestiva e glândula de albúmen nos três estágios do ciclo de vida de *L. unilamellata*, foi analisado utilizando-se os tecidos de 18 moluscos jovens com 65 dias de vida, 24 moluscos adultos, com 145 dias e 9 indivíduos senescentes, com 1064 dias.

Os moluscos foram dissecados sob microscópio estereoscópico. A glândula digestiva, a massa cefalopodal, e a glândula de albúmen foram removidas e armazenadas a -20°C até o processamento para a determinação de glicogênio e galactogênio. Os tecidos correspondentes a cada órgão foram reunidos em amostras distintas, identificadas, portanto, por órgão e também por estágio de vida. Durante todos os procedimentos, os tecidos foram mantidos resfriados para evitar a deterioração dos carboidratos através da ação enzimática.

Os tecidos foram processados e os precipitados de glicogênio e galactogênio obtidos de acordo com a metodologia proposta por PINHEIRO e GOMES (1994). Os precipitados foram submetidos à hidrólise ácida e subsequente quantificação espectrofotométrica, através da técnica do ácido 3,5 dinitro salicílico (3,5 DNS) (SUMNER, 1924), com leitura de absorvância a 535 nm. Os valores finais foram calculados através da lei de Beer com pelo menos três leituras coerentes, e expressadas em mg de glicose/g de tecido ou mg de galactose/g de tecido (peso fresco).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Crescimento

O crescimento dos moluscos foi monitorado durante 1050 dias após o nascimento (140 semanas) (Tabela 1). Entretanto, a longevidade total observada para o grupo foi de 1064 dias (142 semanas). Os moluscos continuaram a crescer após o alcance da maturidade, que ocorreu entre 96 e 195 dias de vida (entre 12 e 25 semanas) (Figura 1).

Tabela 1. Idade, número de moluscos, diâmetro médio, coeficiente de variação, mínimo e máximo da concha durante 1050 dias da longevidade de *Leptinaria unilamellata* (medidas em milímetros).

Medição	Dias após o nascimento	Idade (semanas)	Número de moluscos	Diâmetro médio da concha (mm)	Coeficiente de variação	Diâmetro mínimo	Diâmetro máximo
1 ^o	1	0	60	2,0 ± 0,2	10 %	1	2,5
2 ^o	15	2	59	2,6 ± 0,5	19 %	2	4
3 ^o	30	4	52	3,5 ± 0,7	20 %	2	5,2
4 ^o	45	6	51	4,7 ± 1,0	21 %	2,8	7,1
5 ^o	60	8	51	5,7 ± 1,3	23 %	2,7	8,8
6 ^o	75	10	51	6,1 ± 1,2	20 %	3	8,8
7 ^o	90	12	51	6,9 ± 1,2	17 %	3,3	9
8 ^o	120	16	51	8,7 ± 2,2	25 %	3,4	12,9
9 ^o	150	20	45	9,6 ± 2,3	24 %	5,9	13,3
10 ^o	180	24	40	11,0 ± 1,9	17 %	6,9	13,9
11 ^o	210	28	39	11,5 ± 1,9	17 %	7,2	14,2
12 ^o	240	32	38	12,1 ± 1,7	14 %	7,9	14,4
13 ^o	270	36	35	12,9 ± 1,6	12 %	9,1	15,8
14 ^o	300	40	35	13 ± 1,6	12 %	9,5	15,8
15 ^o	330	44	34	13,6 ± 1,6	12 %	10,3	16
16 ^o	360	48	34	14,4 ± 1,5	10 %	11	16,6
17 ^o	390	52	34	14,6 ± 1,5	10 %	11	17
18 ^o	420	56	34	15 ± 1,6	11 %	11	17,3
19 ^o	450	60	32	15,3 ± 1,5	10 %	12,2	17,6
20 ^o	480	64	32	15,4 ± 1,4	9 %	12,5	17,4
21 ^o	510	68	32	15,5 ± 1,5	10 %	12,5	17,4
22 ^o	540	72	29	15,7 ± 1,4	9 %	12,4	17,5
23 ^o	570	76	29	15,7 ± 1,4	9 %	12,6	17,4
24 ^o	600	80	29	15,8 ± 1,4	9 %	12,6	17,6
25 ^o	630	84	28	16 ± 1,2	8 %	13,3	17,8
26 ^o	660	88	28	16 ± 1,3	8 %	13,3	17,8
27 ^o	690	92	26	16 ± 1,3	8 %	13,3	17,8
28 ^o	720	96	25	16 ± 1,3	8 %	13,2	17,7
29 ^o	750	100	22	16,3 ± 1,5	9 %	13,2	18,3
30 ^o	780	104	21	16,8 ± 1,6	10 %	13,5	20
31 ^o	810	108	21	17 ± 1,7	10 %	13,5	20,4
32 ^o	840	112	19	17,2 ± 1,8	10 %	13,7	20,5
33 ^o	870	116	18	17,2 ± 1,8	10 %	13,7	20,5
34 ^o	900	120	18	17,2 ± 1,8	10 %	13,7	20,5
35 ^o	930	124	16	17,6 ± 1,5	9 %	15	20,5
36 ^o	960	128	16	17,6 ± 1,5	9 %	15	20,6
37 ^o	990	132	15	17,8 ± 1,5	8 %	15,2	20,6
38 ^o	1020	136	15	17,8 ± 1,5	8 %	15,2	20,6
39 ^o	1050	140	12	18,1 ± 1,4	8 %	16,2	20,8

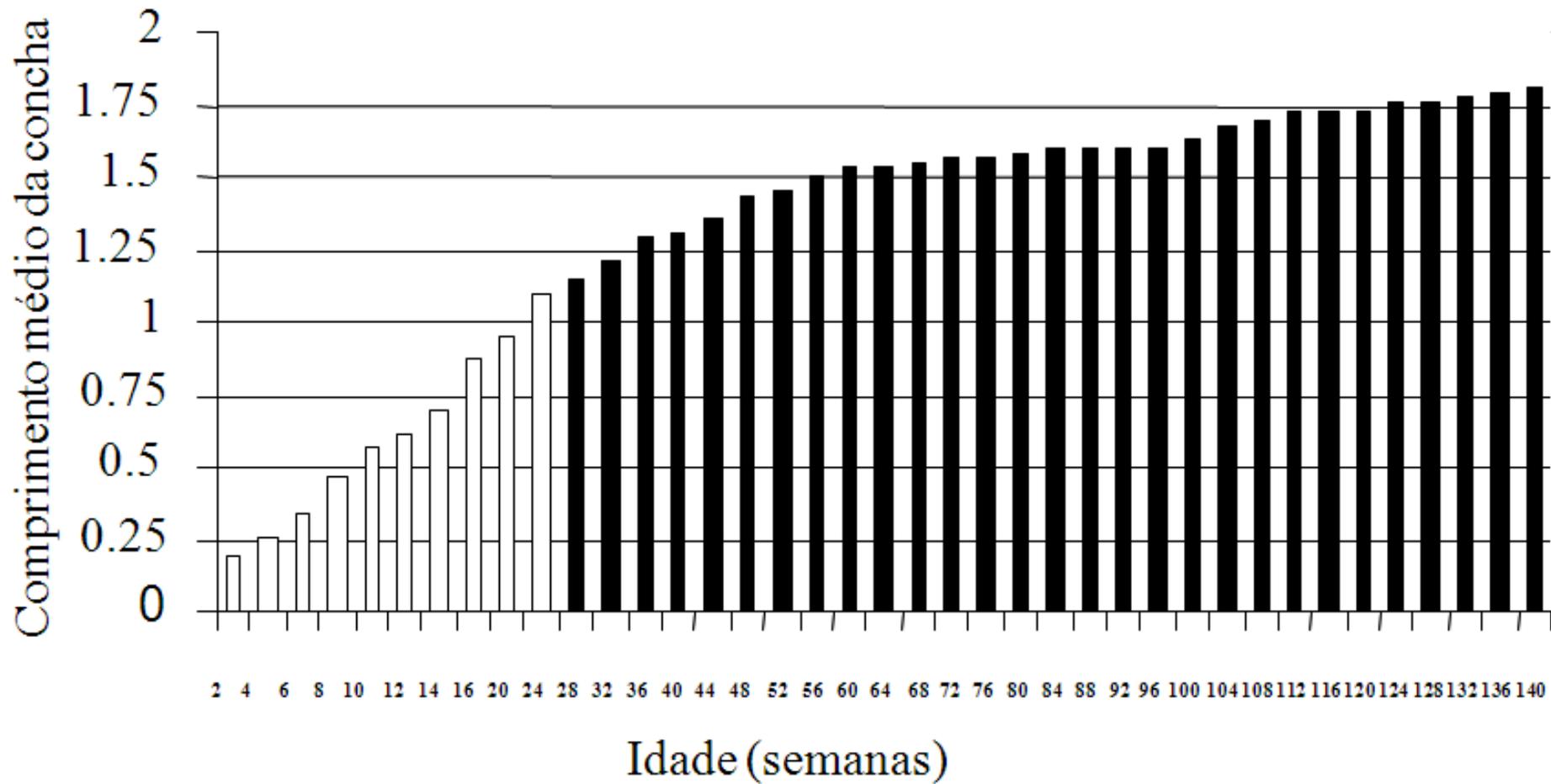


Gráfico 1. Tamanho médio do comprimento da concha de *Leptinaria unilamellata* durante seu tempo de vida. Colunas brancas representam valores médios durante a fase jovem e as colunas pretas representam os valores médios durante a fase adulta.

Houve diferença significativa ($p = 0,0343$) entre o aumento médio do comprimento da concha, tanto durante a fase jovem quanto durante a fase adulta, entre as duas réplicas. Entretanto, a taxa de crescimento foi menos pronunciada nos adultos (0,24 mm/dia) do que nos jovens, 0,44 mm/dia. Um considerável aumento na taxa de crescimento, 0,08 mm/dia, ocorreu entre 30 dias de vida (4 semanas) e 45 dias de vida (6 semanas), durante a fase jovem. Entretanto, a taxa de crescimento declinou progressivamente ao longo da fase adulta, principalmente após 450 dias de vida (60 semanas). O maior comprimento médio da concha, 18,1 mm e o maior comprimento absoluto da concha, 20,8 mm, foram registrados aos 1050 dias de vida (140 semanas), durante a fase senescente. O comprimento médio da concha dos moluscos recém-nascidos correspondeu a 22% do comprimento médio da concha dos adultos no momento do alcance da maturidade sexual. O comprimento médio da concha quando os moluscos atingiram a maturidade sexual foi 8,8 mm (6,3 - 13,6 mm) (Tabela 2). A taxa de crescimento média, durante a fase adulta, foi 0,009 mm/dia (0,002 - 0,034 mm/dia).

2.3.2 Reprodução

O total de 5880 filhotes foi produzido por 36 adultos, em 813 eventos reprodutivos. Os moluscos realizaram entre 1 e 49 eventos reprodutivos e produziram entre 5 e 376 filhotes. Houve uma correlação positiva ($r = 0,8945$) entre o número de filhotes e o número de eventos reprodutivos por indivíduo ao longo do tempo de vida. Os moluscos realizaram, em média, 22,6 eventos reprodutivos, produzindo 163,3 filhotes durante o tempo de vida. Foi observada fecundidade média de 6,72 filhotes por molusco (entre 3,27 e 11,4 filhotes) (Tabela 2).

Tabela 2. Tamanho e idade no alcance da maturidade, taxa de crescimento, número total de eventos reprodutivos, número total de filhotes e fecundidade de *Leptinaria unilamellata*.

Indivíduos	Tamanho no alcance da maturidade sexual	Idade no alcance da maturidade sexual	Taxa de crescimento	Número total de eventos reprodutivos	Número total de filhotes	Fecundidade (número de filhotes/ evento reprodutivo)
1	8,2	96	0,034	21	145	5,8
2	8,3	96	0,010	16	168	10,5
3	8,4	96	0,012	32	351	11
4	7,7	96	0,014	21	186	8,86
5	7	96	0,012	19	140	7,37
6	8,4	96	0,010	32	292	9,13
7	8,1	96	0,019	9	52	5,78
8	8,7	96	0,009	32	262	8,19
9	7,9	96	0,020	5	17	3,4
10	8,7	96	0,009	33	376	11,4
11	11,5	195	0,005	40	264	6,6
12	12,5	195	0,003	21	127	6,05
13	13,6	195	0,005	34	258	7,59
14	10,8	195	0,006	10	59	5,9
15	10,6	195	0,006	36	280	7,78
16	10,6	195	0,008	21	177	8,42
17	10,5	195	0,009	1	5	5
18	6,6	96	0,004	10	75	7,5
19	7,9	96	0,005	23	178	7,74
20	7,7	96	0,003	22	168	7,64
21	6,3	96	0,005	49	325	6,63
22	9,3	96	0,007	26	177	6,81
23	7,8	96	0,008	37	325	8,78
24	8,2	96	0,003	5	18	3,6
25	7,4	96	0,007	25	153	6,12
26	7,2	96	0,002	5	17	3,4
27	8,4	130	0,007	27	180	6,67
28	7,7	130	0,004	1	6	6
29	11,2	130	0,003	8	34	4,25
30	9,6	130	0,007	31	233	7,52
31	9,8	130	0,015	30	159	5,3
32	8,3	130	0,005	12	61	5,08
33	9,5	130	0,009	30	98	3,27
34	8,1	195	0,009	32	197	6,16
35	8,5	195	0,010	25	91	3,64
36	6,9	195	0,011	32	226	7,06

Foi observada correlação negativa ($r = -0,0093$) entre a taxa de crescimento e o número total de eventos reprodutivos realizados pelos indivíduos, durante a fase adulta. Por outro lado, foi observada correlação positiva ($r = 0,0093$) entre a taxa de crescimento e o número total de filhotes produzidos durante a vida adulta.

2.3.3 Mortalidade

Não foi observada mortalidade pronunciada na fase jovem e, portanto, 67% dos indivíduos se tornaram sexualmente maduros. Logo após o alcance da maturidade sexual, apenas 24% dos indivíduos morreram. No decorrer da fase adulta, o número de indivíduos vivos decresceu gradualmente (Figura 2). Em média, a fase jovem durou 180 dias (seis meses) (24 semanas) e a fase adulta 884 dias (dois anos e quatro meses) (118 semanas). A longevidade média observada foi de 558,05 dias (75 semanas) (entre 15 e 1064 dias), aproximadamente um ano e cinco meses. A longevidade observada para o último indivíduo a morrer foi de 1064 dias (142 semanas), aproximadamente três anos de vida.

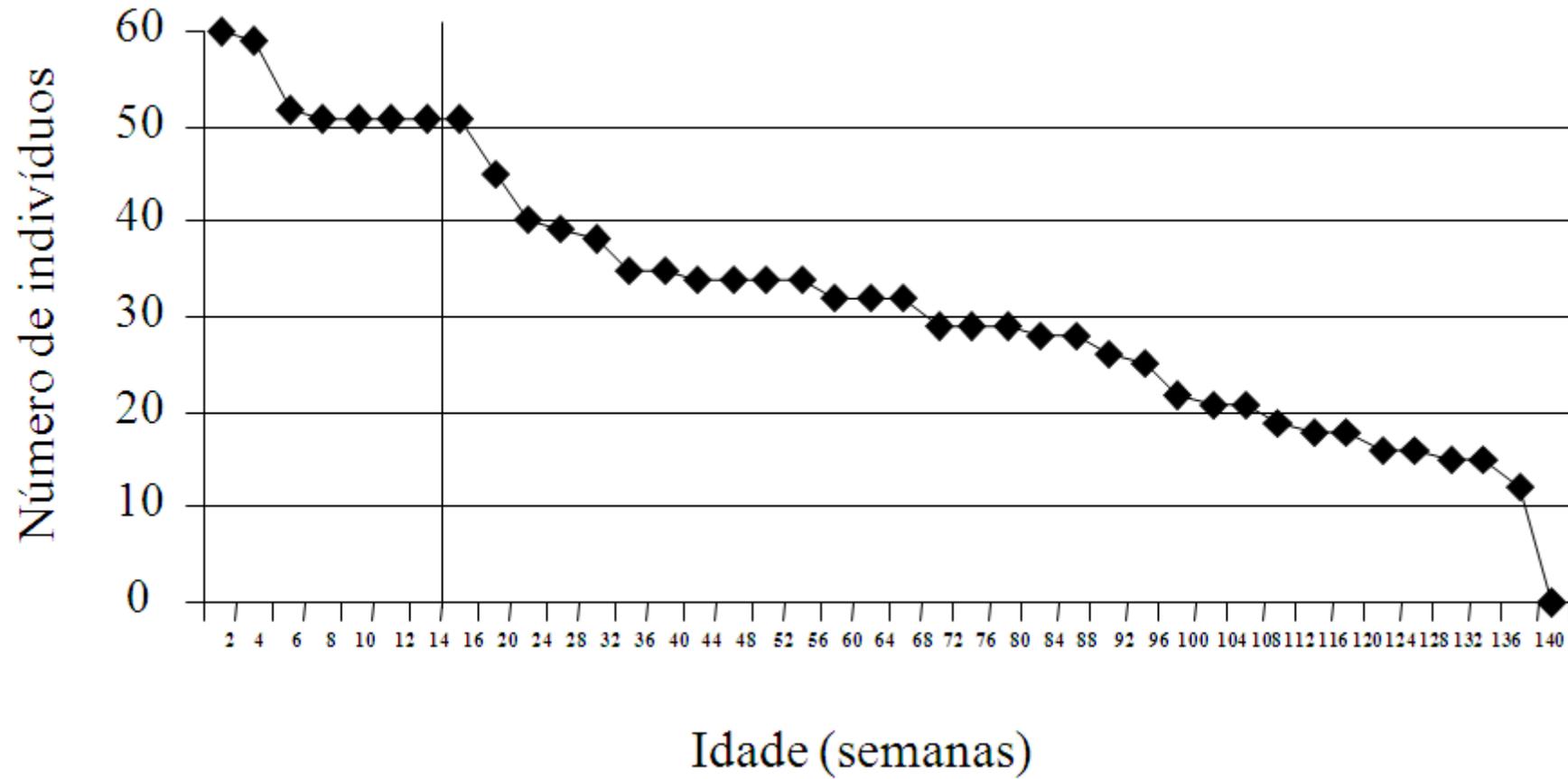
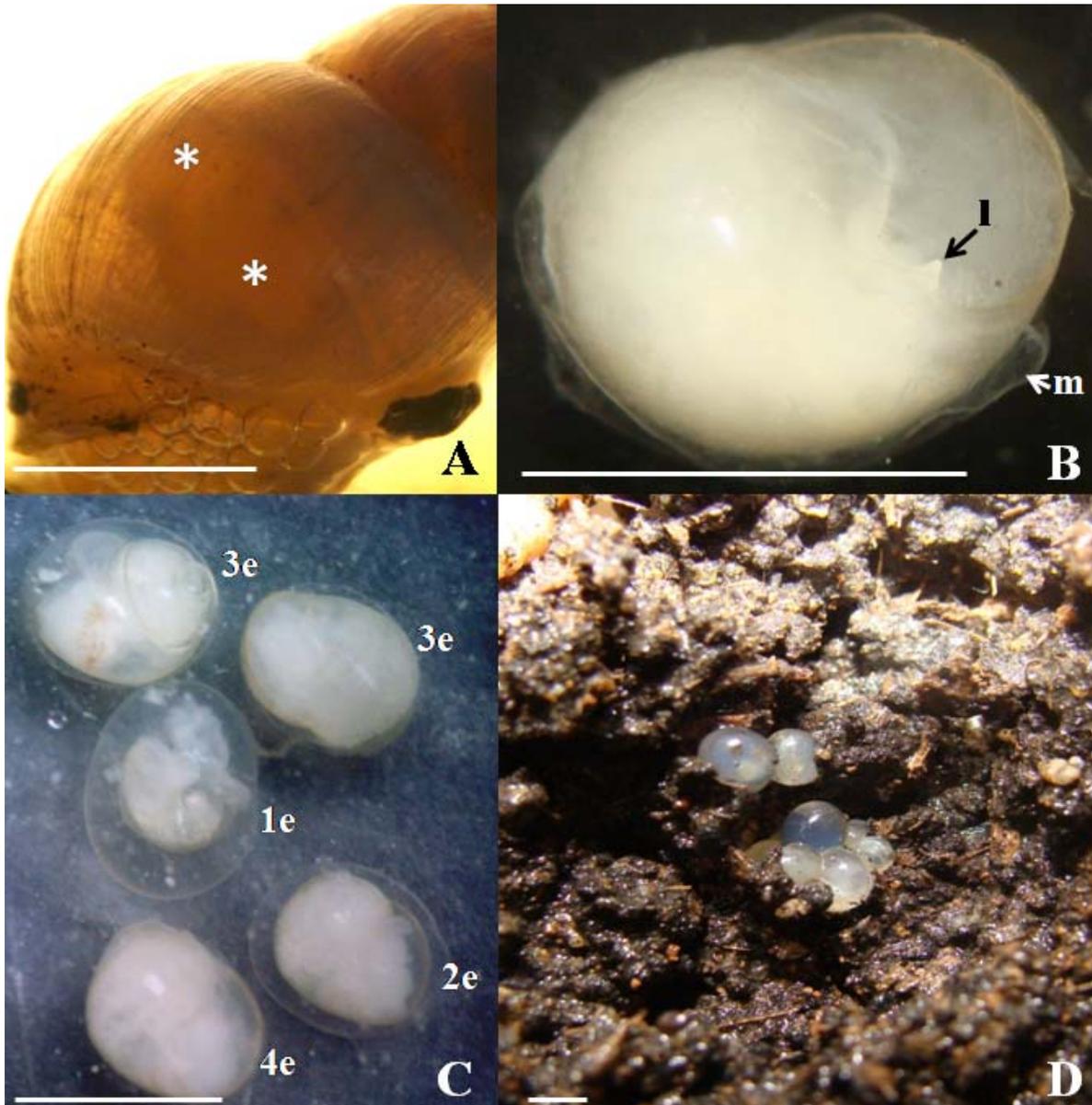


Gráfico 2. Mortalidade de *Leptinaria unilamellata* durante o tempo total de vida. A linha vertical indica o começo da idade reprodutiva.

2.3.4 Morfologia do útero grávido

A primeira presença de embriões no útero dos moluscos, visualizada através da transparência da concha, indicou o alcance da maturidade sexual dos moluscos (Figura 3A). Foi observada a presença de células zigóticas no útero de alguns indivíduos com diferentes idades. Todos os moluscos dissecados aos 80 dias de vida abrigavam embriões em diferentes fases de desenvolvimento, desde células zigóticas até filhotes totalmente formados. Tais filhotes possuíam conchas completamente desenvolvidas, cujas características morfológicas, como a forma da abertura e a presença de lamela, são similares às conchas dos adultos (Figura 3B).

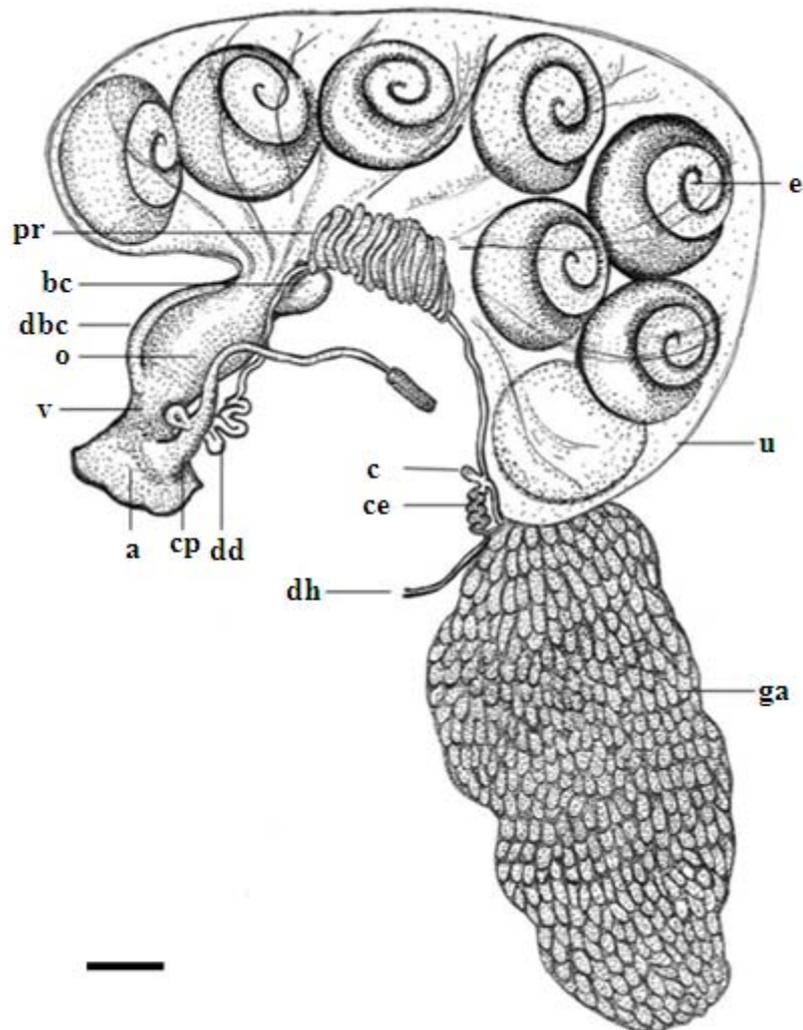
Não foi verificada qualquer estrutura anatômica que poderia indicar uma interação entre os embriões e o organismo parental. Os embriões apresentavam-se dispostos no útero em posição semelhante a uma “linha de montagem” (Figura 3C), na qual os embriões em estágio mais avançado de desenvolvimento se localizavam na região proximal à abertura genital. Os embriões são envolvidos por uma fina membrana, que é rompida antes do nascimento (Figura 3B). Nos terrários, foram encontrados apenas jovens recém nascidos, e quando foram encontrados “ovos” (Figura 3D), estes eram células zigóticas, com uma massa gelatinosa ao redor, os quais nunca completavam seu desenvolvimento, sendo, portanto inviáveis. Estes resultados indicam que essa espécie deve ser classificada como ovovivípara.



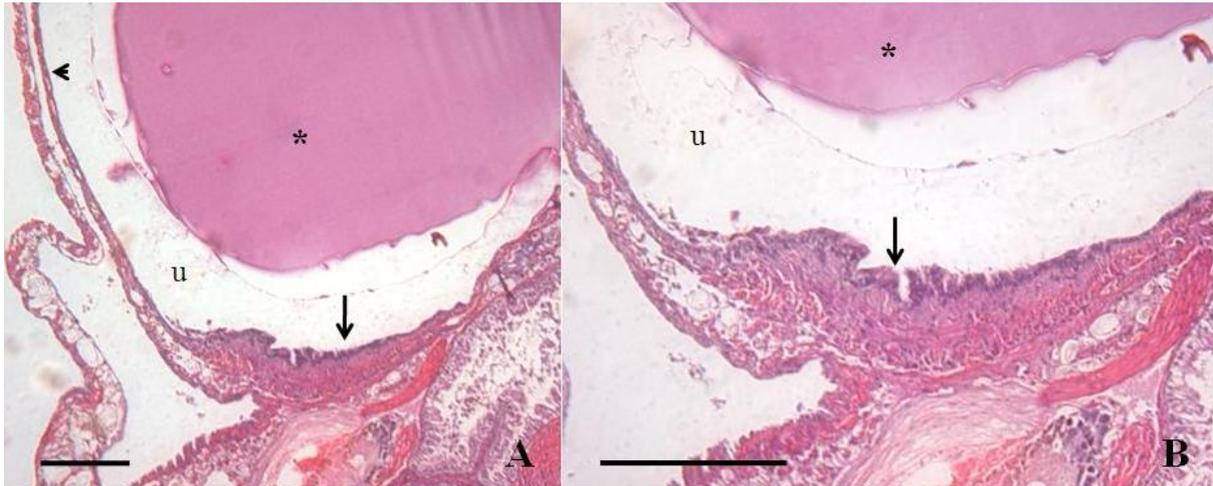
Fotografia 1. Características reprodutivas em *Leptinaria unilamellata*. **A.** Presença dos embriões no útero, visíveis através da transparência da concha (*). **B.** Embrião apresentando concha completamente desenvolvida, as setas indicam a lamela, note a fina membrana (m) que envolve o embrião. **C.** Embriões em diferentes estágios de desenvolvimento; (1e) embriões no estágio inicial de desenvolvimento; (2e-4e) embriões em um estágio mais avançado de desenvolvimento. **D.** Ovos não viáveis (células zigóticas com uma massa gelatinosa ao redor). Escala da barra = 1mm.

O útero de *L. unilamellata* é um órgão tubular flexível que pode ser expandido para acomodar um maior número de embriões (Figura 4). A parede do útero não é muscular, sendo formada por um epitélio simples, sobre uma membrana basal, formada por uma fina camada de tecido conjuntivo (Figura 5A). O epitélio do útero possui dois tipos celulares, apresentando,

portanto dupla função. Na parede ventral, o epitélio possui células cúbicas ciliadas, e por células glandulares esparsas (Figura 5B). Na parede dorsal do útero, o epitélio é formado apenas por células pavimentosas (Figura 5A).



Desenho 1. Sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata*. O útero é flexível e seu tamanho pode ser expandido para acomodar mais embriões. a: átrio genital; cp: complexo peniano; dd: ducto deferente; o: oviduto; v: vagina; dbc: ducto da bolsa copuladora; bc: bolsa copuladora; pr: próstata; e: embrião; u: útero; ga: glândula de albúmen; dh: ducto hermafrodita; ce: complexo da espermateca; c: carrefour. Barra de escala: 500 µm.



Fotografia 2. Morfologia do útero grávido de *Leptinaria unilamellata*. **A.** Parede do útero não muscular, formado por um epitélio cúbico (seta) que se localiza na membrana basal, a qual é uma fina camada de tecido conjuntivo. Embriões (*) em diferentes estágios de desenvolvimento são vistos no lúmen do útero (u). Epitélio pavimentoso (cabeça da seta) limitante na região dorsal do útero. **B.** Detalhe da região ventral do útero apresentando um epitélio cúbico com células cúbicas ciliadas (seta), e por células glandulares esparsas. Barra de Escala = 50 µm.

2.3.5 Relação entre tamanho e características reprodutivas

Foi observada correlação positiva entre os seguintes parâmetros: número de embriões contidos no útero e tamanho da concha ($r = 0,8439$; $p < 0,0001$); número de embriões e número de voltas da concha ($r = 0,7288$; $p < 0,0001$); número de embriões e tamanho do útero ($r = 0,834$; $p < 0,0001$). Além disso, houve correlação positiva entre o tamanho da concha e o tamanho do útero ($r = 0,7714$; $p < 0,0001$). Como esperado houve uma forte correlação positiva entre o tamanho e o número de voltas da concha ($r = 0,8059$; $p < 0,001$). Também foi encontrada uma relação positiva entre o tamanho da glândula de albúmen e o tamanho da concha ($r = 0,583$; $p = 0,007$).

2.3.6 Variação no conteúdo de glicogênio e galactogênio nos três estágios do ciclo de vida

O conteúdo de glicogênio encontrado na glândula digestiva dos moluscos jovens foi 14,25 mg de glicose/g de tecido; 8,89 mg de glicose/g de tecido nos adultos e 1,13 mg de glicose/g de tecido nos indivíduos senescentes. O conteúdo de glicogênio na massa cefalopodal foi 3,80 mg de glicose/g de tecido nos jovens, 2,97 mg de glicose/g de tecido nos adultos e 4,26 mg de glicose/g de tecido nos indivíduos senescentes. O conteúdo total de glicogênio, encontrado nos tecidos da

glândula digestiva e massa cefalopodal foi 18,06 mg de glicose/g de tecido nos jovens, 11,86 mg de glicose/g de tecido nos adultos e 5,39 mg de glicose/g de tecido nos indivíduos senescentes. O conteúdo de galactogênio na glândula de albúmen foi 6,96 mg de galactose/g de tecido nos jovens, 148 mg de galactose/g de tecido nos adultos e 4,72 mg de galactose/g de tecido nos indivíduos senescentes (Figura 6).

Não houve a formação de spots intermediários, não tendo sido detectada a presença de outros açúcares redutores que pudessem interferir com a dosagem efetuada.

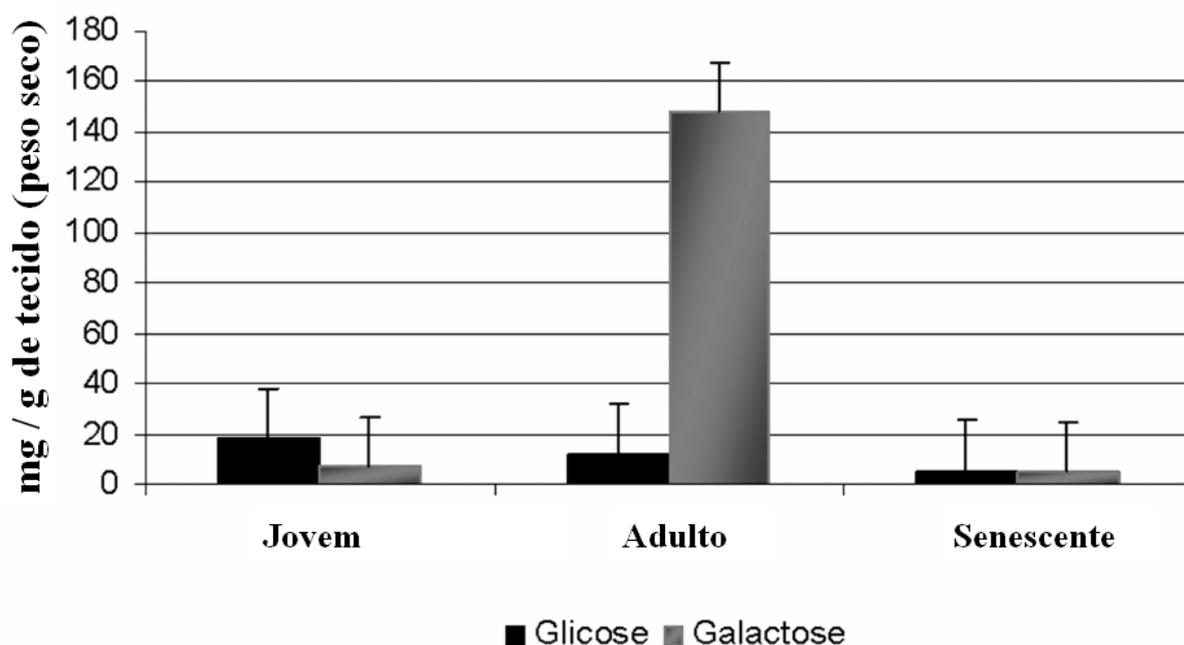


Gráfico 3. Conteúdos de glicogênio (glândula digestiva + massa cefalopodal) e galactogênio (glândula de albúmen), expressos em mg de glicose/g de tecido, peso fresco e mg de galactose/g de tecido, peso fresco, respectivamente, de *Leptinaria unilamellata* nos estágios do ciclo de vida de jovem, adulto e senescente. I= desvio padrão.

2.4 DISCUSSÃO

Os padrões de alocação de energia para a reprodução e crescimento em moluscos terrestres estão associados a diferentes estratégias de história de vida (ANTKOWIAK e CHASE, 2003). Há dois tipos de alocação de recursos energéticos durante o tempo de vida. No padrão mais comum, após o nascimento, toda a energia excedente é direcionada ao crescimento até que o indivíduo atinja a maturidade sexual. Após a maturidade, o crescimento pode ser interrompido e todo o excesso de energia é direcionado à reprodução, o que caracteriza o crescimento determinado. O segundo

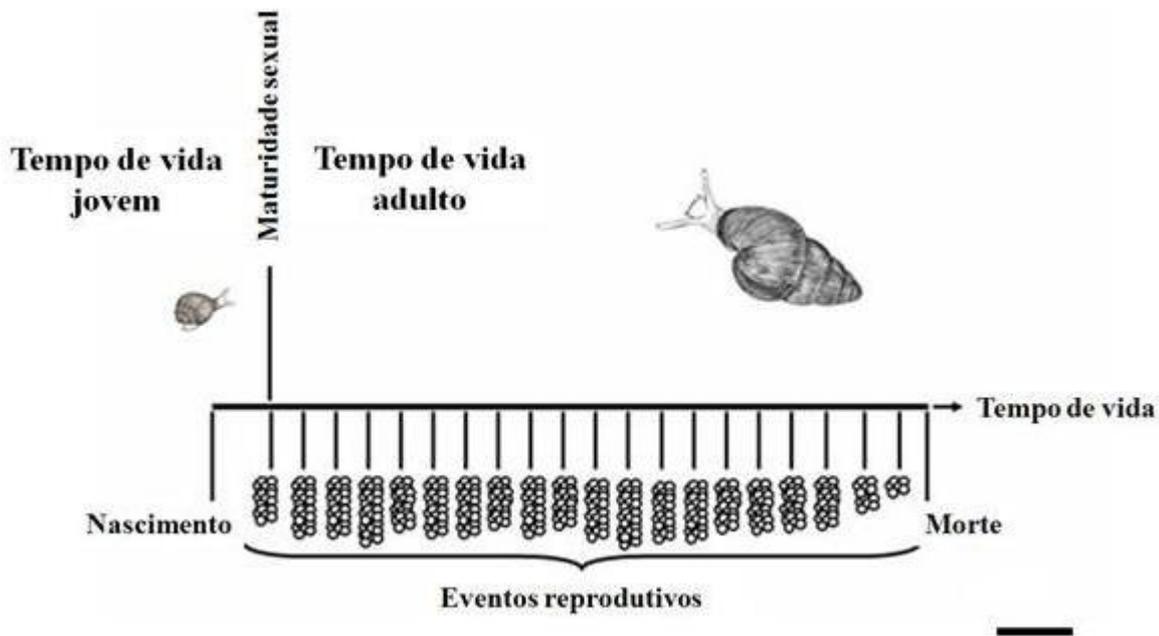
padrão, denominado crescimento indeterminado, é caracterizado pelo crescimento continuado após a maturidade e até a o fim da vida do indivíduo (CICHÓN, 1999).

Os resultados do presente estudo demonstram que *L. unilamellata* possui crescimento indeterminado, continuando a crescer após o alcance da maturidade sexual. Isso implica que, na fase adulta, os recursos energéticos são alocados não apenas ao esforço reprodutivo, mas também ao crescimento e à sobrevivência, como confirmado pelo conteúdo de glicogênio um pouco maior nos jovens do que nos adultos. Entretanto, o crescimento durante a fase adulta foi menos pronunciado do que na fase jovem. Esse resultado indica a existência de antagonismo entre a reprodução e o crescimento, confirmado pela correlação negativa entre a taxa de crescimento e o número total de eventos reprodutivos durante a fase adulta. A maior quantidade de galactogênio encontrada na glândula de albúmen dos adultos, quando comparada aos indivíduos jovens e senescentes, bem como a proporção entre glicogênio e galactogênio indicam que a energia está sendo alocada para a reprodução, em detrimento do crescimento. Dessa forma, nos adultos, grande parte da energia obtida através da alimentação é convertida em galactogênio, um substrato energético que não está disponível para outras atividades biológicas além da reprodução, especialmente a formação dos ovos. A proporção entre o conteúdo de glicogênio e galactogênio nas fases adulta e senescente do ciclo de vida, ilustra como a energia é alocada ao longo do tempo de vida de *L. unilamellata* (Figura 6).

Durante a fase jovem, a energia é armazenada tanto como galactogênio, que na fase adulta é direcionado para a reprodução, quanto na forma de glicogênio, que é direcionado para a sobrevivência, após o grande investimento energético que a reprodução demanda. Isso foi confirmado pela baixa mortalidade observada logo após o início da atividade reprodutiva. O crescimento indeterminado também foi observado nas espécies de moluscos terrestres, *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Subulinidae) por D'ÁVILA e BESSA (2005) e *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (Bulimulidae) por SILVA et al. (2008). Por outro lado, CARVALHO et al. (2008) observaram que o molusco terrestre *Bradybaena similaris* Fèrrusac (1821) (Bradybaenidae), apresenta crescimento determinado e curto tempo de vida associado a um alto investimento energético, em poucos eventos reprodutivos e um grande número de ovos em cada evento.

Quando o esforço reprodutivo, logo após o alcance da maturidade sexual, não é alto, a energia remanescente é suficiente para atender outras demandas, como o crescimento e a manutenção da homeostase. Dessa forma, o molusco é capaz de sobreviver por um longo período, crescendo e acumulando reservas energéticas. A energia acumulada como massa corporal, durante

sua vida, é distribuída em vários eventos reprodutivos, com poucos filhotes produzidos em cada evento (Figura 7).



Desenho 2. História de vida de *Leptinaria unilamellata* caracterizada por um longo tempo de vida, curta fase jovem em função do rápido alcance da maturidade sexual, com numerosos eventos reprodutivos ao longo da vida e pequeno esforço reprodutivo em cada evento. Essas características estão associadas a espécies *K*-estrategistas. A ilustração é uma escala proporcional de características de história de vida observadas durante o período de experimento. Barra de escala (= 2cm) é referente a 112 dias do tempo de vida.

O crescimento continuado, associado à distribuição do esforço reprodutivo em muitos eventos durante a vida, representa uma estratégia que aumenta o sucesso reprodutivo. A distribuição do esforço reprodutivo compensa, em longo prazo, as desvantagens causadas pelo antagonismo entre o crescimento e reprodução no evento reprodutivo atual. Mais tarde na vida, os moluscos são maiores e podem produzir um número maior de filhotes. Isso foi confirmado pela correlação positiva encontrada entre a taxa de crescimento na fase adulta e o número total de filhotes produzidos durante a vida e também pela correlação positiva entre o número de embriões contidos no útero e o tamanho da concha, entre o número de embriões e o número de voltas da concha e entre o tamanho da glândula de albúmen e o tamanho da concha. SILVA et al. (2008), em um estudo da história de vida de *B. tenuissimus* verificaram que essa espécie apresenta tempo de vida longo e

retarda a produção de ovos até atingir tamanho favorável. Segundo esses autores, os moluscos com maior tamanho ganham em sucesso reprodutivo pela produção de um número maior de filhotes.

No presente estudo, foi observado que o número de indivíduos reprodutivamente ativos e o número total de indivíduos vivos diminuíam a cada evento reprodutivo. De acordo com ZERA e HARSHMAN (2001) a mortalidade se torna sensível em relação à idade devido aos aspectos dinâmicos na alocação de energia. Inicialmente, na fase adulta, há um investimento na produção de filhotes e manutenção da homeostase e durante fase senescente, há uma diminuição na reprodução, taxa de crescimento, atividade e um aumento na mortalidade. Nessa fase, a energia remanescente é direcionada a manutenção da homeostase. Esse padrão foi confirmado pelo baixo conteúdo de glicogênio e galactogênio observado na fase senescente, quando comparada às fases jovem e adulta.

Diversos autores, realizando estudos sobre a biologia e o comportamento reprodutivo de moluscos terrestres, verificam como os padrões de história de vida estão associados à alocação de energia (ANTKOWIAK e CHASE, 2003; CARVALHO et al., 2008; EVANNO et al., 2005; HAASE e KARLSSON, 2004; RAUT e PANIGRAHI, 1988; REISE, 1995). A energia disponível para os diferentes processos biológicos é limitada e, portanto, pode ocorrer antagonismo entre diferentes aspectos da história de vida (KREBS, 1994; ZERA e HARSHMAN, 2001). Uma redução no tempo do alcance da maturidade sexual pode estar associada com o esforço reprodutivo distribuído em vários eventos reprodutivos ao longo da vida, como observado no presente estudo.

Em estudos sobre espécies com longo tempo de vida, é possível examinar a contribuição das diferentes fases do ciclo de vida para o sucesso reprodutivo e sobrevivência (BROWN, 1988). *Leptinaria unilamellata* apresenta um longo tempo de vida, atingindo a maturidade cedo na vida. Os moluscos recém nascidos são grandes, a fase jovem é curta e a alta sobrevivência dos filhotes permite que a maior parte dos indivíduos atinja a maturidade sexual. Os adultos apresentam longo tempo de vida, baixa mortalidade e crescimento continuado. A reprodução é caracterizada pela realização de numerosos eventos reprodutivos, com pequeno investimento no número de filhotes por evento e baixa mortalidade dos adultos após o primeiro evento reprodutivo. A reprodução não é limitada a uma estação reprodutiva, mas é contínua através de todo o período do ano. Pode-se concluir, com base nessas características, que *L. unilamellata* é uma espécie *K*-estrategista (Figura 7).

Não há consenso entre os diferentes autores sobre a conceituação de oviparidade e viviparidade em moluscos (DUTRA, 1988; TOMPA, 1979). No presente estudo, foram consideradas as proposições de MACKIE (1978) e TOMPA (1979), que consideram o local do desenvolvimento do embrião e a maneira pela qual o embrião se nutre. A maior parte dos gastrópodes é ovípara e os

ovos são liberados nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário. Nas espécies em que há uma ligação morfológica e fisiológica entre o organismo parental e o embrião, o conceito de viviparidade é aplicado. Algumas espécies podem reter ovos dentro do trato reprodutivo e, quando liberados, esses ovos podem conter embriões em estágio avançado de desenvolvimento. Os casos extremos de retenção de ovos, nos quais os nutrientes utilizados pelo embrião são provenientes apenas do ovo, são chamados de ovoviviparidade. No útero de espécies ovovivíparas, podem ser encontrados filhotes em diferentes fases de desenvolvimento, sem qualquer ligação fisiológica com o organismo parental. Em *L. unilamellata*, o molusco parental retém jovens no útero que apresentam tamanho relativamente grande, em comparação ao tamanho corporal do adulto. Isso limita a produção de um grande número de filhotes, restringindo o investimento reprodutivo à um pequeno número de filhotes, os quais, entretanto, exibem uma alta taxa de sobrevivência.

Um ovo internamente fertilizado pode ser provido com vitelo nutritivo, bem como com coberturas protetoras que asseguram maior proteção ao filhote (EGONMWAN, 2007). Entre os moluscos, o ovo com casca calcificada oferece proteção mecânica ao embrião no ambiente externo. Após o nascimento, a casca do ovo representa a primeira fonte alimentar de cálcio para o filhote (TOMPA, 1979). No molusco terrestre ovovivíparo *Balea perversa*, os filhotes eclodem dentro do útero do indivíduo parental e a casca do ovo é reabsorvida ou consumida pelo filhote (BAUR e BAUR, 2000). Em *L. unilamellata* a produção de ovos não calcificados provavelmente está associada com a retenção de ovos. Esse padrão de desenvolvimento dos embriões permite a economia de micronutrientes pelo molusco, durante a formação dos filhotes. Além disso, os embriões desenvolvem-se dentro do organismo parental, onde são protegidos contra injúrias mecânicas e dessecação. A liberação de jovens, ao invés de ovos, permite que os filhotes resistam ao stress ambiental e sobrevivam até a fase reprodutiva. As características morfológicas das conchas dos jovens recém nascidos, como a forma da abertura da concha e a presença de lamela, são similares à concha dos adultos. Essa semelhança também foi observada por TRYON e PILSBRY (1906) e DUNCAN, 1975.

No presente estudo, foi encontrada uma relação entre as características de história de vida de *L. unilamellata* devido à alocação diferencial de energia. A distribuição do esforço reprodutivo em muitos eventos, nos quais um pequeno número de filhotes de tamanho relativamente grande são produzidos, associada à retenção de ovos, caracteriza um investimento em longo prazo no sucesso reprodutivo.

**MORFOLOGIA MACRO E MICROSCÓPICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE *Leptinaria unilamellata*
(d'Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE)**

INTRODUÇÃO

A complexidade da morfologia do sistema reprodutor de gastrópodes terrestres é reflexo de processos biológicos elaborados, como o hermafroditismo, seleção sexual, competição espermática, dentre outros (GÓMEZ, 2001). Essas características propiciam a esses animais a capacidade de produzir ambos os gametas masculino e feminino, realizar a autofertilização e fecundação cruzada, possuir locais específicos para armazenamento e reabsorção de auto- e alo-espermatozóides e a provisão de nutrientes para o embrião.

A análise histológica dos diferentes órgãos do sistema reprodutor, bem como a identificação e a proveniência das secreções elaboradas, permitem entender a funcionalidade e fisiologia de cada componente e a sua integração na reprodução desses animais (DUNCAN, 1975; GÓMEZ, 2001). A caracterização das células e tecidos de função estrutural e secretora que compõem os órgãos, assim como a formação dos gametas, permite elucidar aspectos da gametogênese, processo copulatório, local de fertilização, transferência de espermatozóides, recepção do exoesperma, armazenamento de gametas e desenvolvimento dos ovos (ARAÚJO e BREURE, 1977; ARAÚJO et al., 1960; JURBERG, 1964; LANZIERI, 1964; REZENDE e LANZIERI, 1963; REZENDE e LANZIERI, 1964; REZENDE et al., 1972; PENA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2006).

Leptinaria unilamellata (d'Orbigny, 1835) é um molusco pulmonado terrestre que pode ser encontrado no Brasil e Bolívia (SIMONE, 2006). No Brasil, populações dessa espécie são distribuídas no Amazonas, Pará, Rondônia, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (ARAÚJO, 1982). As espécies do gênero *Leptinaria* geralmente foram descritas baseadas principalmente na morfologia da concha e local de ocorrência (TRYON e PILSBRY, 1906). Alguns estudos sobre esta espécie foram realizados envolvendo biologia e morfoanatomia (ARAÚJO, 1982; ALMEIDA e BESSA, 2001; BRANDOLINI & GOMES, 2002; DUTRA, 1988). Entretanto, em todos os estudos prévios sobre *L. unilamellata*, os aspectos da morfologia microscópica do sistema reprodutor, bem como seus aspectos funcionais não foram elucidados.

O objetivo do presente estudo foi caracterizar a morfoanatomia e a histologia do sistema reprodutor de *L. unilamellata*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção e manutenção dos moluscos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Moluscos e Helminthos - Programa de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Foram estabelecidas criações matrizes com os moluscos coletados nas seguintes localidades: município de Juiz de Fora, MG (21°44'29.65"S 43°21'19.65"O); município de Cruzília, MG (21° 50' 20" S, 44° 48' 28"W); município de Barra Mansa, RJ (22°31'59.14"S 44°9'54.21"O) e Floriano (22°31'59.14"S 44°9'54.20"O), distrito do município de Barra Mansa. Os indivíduos recém nascidos foram mantidos separados por localidade em caixas plásticas transparentes (14 cm de diâmetro e 9 cm de altura), fechados com tecido de algodão escalline e elástico para escritório, tendo como substrato três centímetros de terra vegetal, umedecida a intervalos de dois dias, com 10 ml de água de torneira (despejada sobre o substrato), e alimentados *ad libitum* com alimento comercial de aves enriquecida com carbonato de cálcio (na proporção de 3:1) (BESSA e ARAÚJO, 1995 a,b). Os indivíduos foram mantidos em condições naturais de luz e temperatura, com aproximadamente 35 indivíduos por caixa.

3.2.2 Procedimentos para o estudo anatômico

Das criações-matrizes das localidades anteriormente citadas, 30 moluscos de cada localidade com a idade de 80 dias, foram utilizados para o estudo da morfologia do sistema reprodutor. Os moluscos vivos foram colocados em pequenos vidros hermeticamente fechados contendo por completo solução salina fisiológica, colocados a 20 C° por aproximadamente 24 horas ou até que fosse verificada a morte dos animais. Após esse processo a concha foi retirada, quebrando-se fragmento de concha ao redor das suturas e o corpo do molusco separado e conservado em álcool 70%. Os indivíduos foram dissecados sob microscópio estereoscópico, utilizando pinças e tesoura microcirúrgicas, para que os órgãos do sistema reprodutor fossem evidenciados, sendo também conservados em álcool 70%.

O padrão geral da morfologia do sistema reprodutor de *L. unilamellata* foi caracterizado e desenhado sob microscópio estereoscópico Olympus equipado com câmara clara. Fotografias do sistema reprodutor foram realizadas utilizando-se máquina digital da marca Sony modelo cybershot 8.1 DSC-H3.

3.2.3 Procedimentos para o estudo histológico

Para a caracterização histológica do sistema reprodutor de *L. unilamellata*, foram utilizados moluscos sexualmente maduros. O alcance da maturidade sexual por esses moluscos foi confirmado pela presença de filhotes no útero, visível pela transparência da concha. Dois indivíduos adultos de cada localidade foram mortos e retirados da concha, como descrito anteriormente, e fixados em Formalina de Carson Milloning por, no mínimo, 24 horas (CARSON et al., 1973). O material destinado ao estudo histológico foi obtido seguindo-se protocolo proposto por FURTADO *et al.* (2004), para as etapas da técnica histológica convencional. O material fixado foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico, iniciada com álcool a 70% e finalizada com álcool absoluto, em seis séries de duas horas, perfazendo o total de 12 horas. Em seguida, foi realizada a diafanização em xilol por três horas e a impregnação pela parafina fundida em estufa a 60°C, em dois banhos de duas horas. Para a obtenção de um bloco regular de parafina, o material foi imerso em um molde retangular contendo parafina fundida, sendo os indivíduos dispostos de forma a obter cortes longitudinais e transversais. Os blocos com os tecidos incluídos foram seccionados em micrótomo, obtendo-se cortes seriados de 5 µm, os quais foram estirados em água quente e colocados em lâminas limpas. Previamente à coloração, as lâminas com os cortes foram deixadas por 2” em xilol, para a remoção da parafina. A bateria de coloração compreendeu as seguintes etapas: hidratação em álcool 100%, álcool 96% e álcool 70%, por 30” em cada concentração; coloração por hematoxilina por 1’30”; lavagem em água de torneira corrente por 2’; hidratação em álcool 50% por 15’; contra-coloração com eosina por 30” e desidratação, em dois banhos de álcool 96% e álcool 100%, por 10” em cada concentração. Após a coloração, as lâminas foram lavadas rapidamente em xilol, por menos de 1’ e montadas em meio de montagem para técnicas histológicas Erv-Mount da marca EasyPath.

Os cortes foram corados por hematoxilina e eosina e observados sob um microscópio de contraste de fase diferencial e interferencial. Foram caracterizadas as células, quanto à forma e função e os tecidos, quanto à estrutura e função. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas através de uma câmera digital acoplada ao microscópio e analisadas com o programa Image Pro Plus 5.0.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Morfoanatomia do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata*

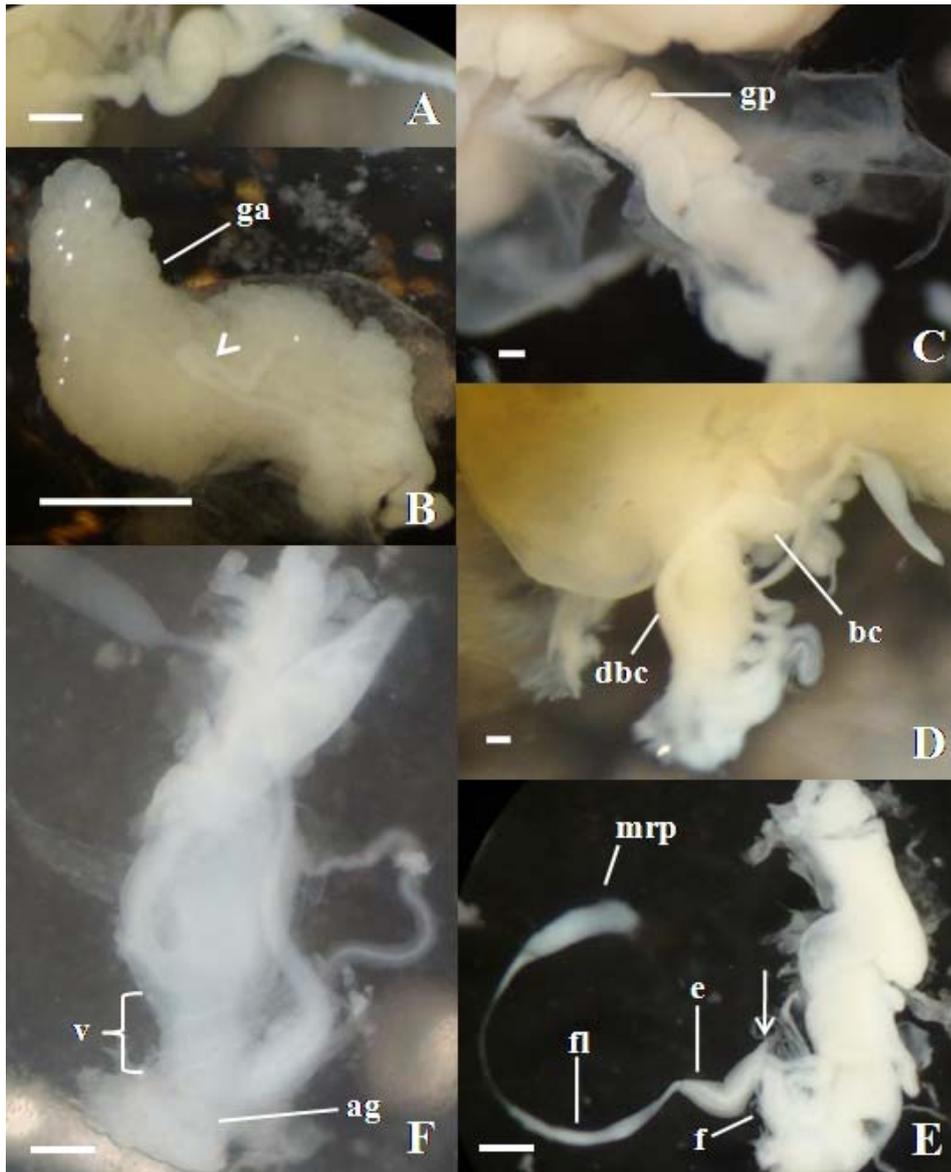
Leptinaria unilamellata é um molusco terrestre hermafrodita, sendo esta uma sinapomorfia para o grupo Pulmonata. A seguir, será apresentada a descrição do sistema reprodutor considerando-se o ovotestis como o extremo da região distal e a região proximal como a mais próxima do poro genital (vide Figura 4, capítulo 1). O sistema reprodutor consiste de uma glândula hermafrodita, denominada ovotestis, que é formado por um número relativamente pequeno de grupos foliculares de coloração pardacenta, embebido na glândula digestiva. Os canais dos diferentes grupos foliculares se reúnem em ducto coletor único de fina espessura, chamado de ducto coletor do ovotestis, que se continua no ducto hermafrodita. O ducto hermafrodita conduz os gametas do ovotestis até o complexo da espermateca (Figura 1A). Este complexo possui uma forma sinuosa, formando túbulos de paredes colabadas e compreende duas partes, a espermateca, com seus vários túbulos de fundo cego, e posteriormente o saco de fertilização ou receptáculo seminal. O receptáculo seminal compreende a região mais alargada e arredondada, onde a fertilização ocorre, localizada na porção final do complexo da espermateca. Do complexo da espermateca origina-se um fino ducto, o espermoviduto, que segue em direção ao carrefour, que é a região de encontro entre o espermoviduto e o ducto da glândula de albúmen, que conduz as secreções envolvidas na formação do ovo (Figura 1B). A glândula de albúmen é ampla, com formato curvado e arqueado nas suas duas extremidades finais delgadas, acompanhando a maior volta da concha e possui numerosos folículos arredondados. A glândula de albúmen pode apresentar coloração esbranquiçada a amarelada (Figura 1B). A glândula prostática, localizada logo acima do oviduto livre, é formada por folículos alongados de coloração esbranquiçada (Figura 1C).

Posteriormente, o espermoviduto dá origem ao útero e ao espermoduto, que não é um ducto fechado, mas um sulco ciliado localizado no assoalho do útero. Na região da próstata, o espermoduto penetra essa glândula para receber os fluidos prostáticos e emerge como o ducto deferente.

O útero é um órgão tubular com parede fina, semitransparente, expansível, que pode conter embriões no seu interior, em estágio avançado ou de uma simples célula zigótica. O útero se continua no oviduto livre, de menor calibre e parede espessa, flexível e muscular. Aproximadamente no final do primeiro terço proximal do oviduto, origina-se o ducto da bolsa copuladora o qual é ascendente, acompanhando lateralmente o oviduto livre, permitindo a bolsa

copuladora localizar-se em um sítio entre o oviduto e a glândula da próstata, na porção côncava da parede do útero. O ducto da bolsa copuladora é aproximadamente três vezes maior em comprimento do que o da bolsa copuladora. O comprimento da bolsa copuladora somado ao comprimento do ducto corresponde aproximadamente ao comprimento do oviduto (Figura 1D).

O vaso deferente emerge da próstata e percorre lateralmente o oviduto. Nessa região, o vaso deferente apresenta fino calibre, entretanto, quando se aproxima do complexo peniano, torna-se fortemente sinuoso e seu calibre aumenta. O ducto deferente posiciona-se paralelamente à parte proximal do complexo peniano e nessa região, há uma espessa camada de tecido conjuntivo envolvendo tanto o ducto deferente quanto os demais órgãos do complexo. Na altura da transição falo-epifalo, o ducto deferente penetra no interior da bainha do pênis, percorre lateralmente os dois órgãos e se insere na porção subterminal do epifalo (Figura 1E). O ceco formado posteriormente ao epifalo é denominado flagelo e compreende um órgão tubular de fino calibre, longo, transparente e glandular. O falo apresenta uma parede muscular desenvolvida, é anterior à bainha do pênis e se localiza no primeiro terço proximal do oviduto. A bainha do pênis caracteriza-se por ser ampla e recobrir quase todo o complexo peniano exceto o falo. Todo o complexo peniano é alongado, e apresenta maior comprimento do que o oviduto. A origem do complexo peniano é oposta à origem do ducto da bolsa copuladora. O músculo retrator peniano tem origem no músculo columelar, é bem desenvolvido e se insere na porção distal do flagelo (Figura 1E). A região do oviduto entre a origem do ducto da bolsa copuladora e o início da parte proximal do complexo peniano corresponde à vagina (Figura 1F). Logo abaixo da vagina, em uma região mais alargada do oviduto localiza-se o átrio genital, que se comunica ao meio externo através do poro genital. Por ser uma região de comunicação com o externo, comum aos tratos feminino e masculino, o átrio genital possibilita a exteriorização do complexo peniano durante a cópula e apresenta a função de receber o alosperma, que é encaminhado para a porção feminina do sistema reprodutor e de liberar os filhotes (Figura 1F).



Fotografia 3. Sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata*. **A.** Complexo da espermateca com formato sinuoso; **B.** Do complexo da espermateca origina-se o espermoviduto (cabeça da seta), que segue em direção ao carrefour, que é a região de encontro entre o espermoviduto e o ducto da glândula de albúmen (ga); **C.** Glândula prostática (gp), localizada logo acima do oviduto livre; **D.** No final do primeiro terço proximal do oviduto, origina-se o ducto da bolsa copuladora (dbc) que permite a bolsa copuladora (bc) localizar-se em um sítio entre o oviduto e a glândula da próstata; **E.** Na altura da transição falo-epifalo, o ducto deferente penetra no interior da bainha do pênis (seta), o ceco posterior ao epifalo (e) é denominado flagelo (fl), o falo (f) apresenta uma parede muscular desenvolvida, o músculo retrator peniano (mrp) se insere na porção distal do flagelo; **F.** A região do oviduto entre a origem do ducto da bolsa copuladora e o início da parte proximal do complexo peniano corresponde à vagina (v), logo abaixo da vagina, em uma região mais alargada do oviduto localiza-se o átrio genital (ag). Barra de escala: 200 µm.

3.3.2 Histologia do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata*

3.3.2.1 Porção hermafrodita

Ovotestis

O ovotestis é uma glândula hermafrodita, constituída de um número relativamente pequeno de grupos de ácinos foliculares de forma irregular e cingida pelos ácinos da glândula digestiva. Ao redor do ovotestis há uma grande rede de vasos sanguíneos, indicando uma intensa irrigação hemolinfática (Figura 2A). Os ácinos foliculares são revestidos por células fusiformes alongadas, e envolvidos por uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo (Figura 2B). A linhagem germinativa masculina se dispõe de maneira central no ácino folicular e a linhagem germinativa feminina ocorre em posição periférica, sendo assim, ainda que ambas as linhagens ocorram no mesmo folículo do ovotestis, há uma separação espacial entre as mesmas.

Duto hermafrodita

Os canais dos diferentes grupos foliculares, os dutos eferentes, se reúnem em único duto denominado duto hermafrodita, onde são liberados os gametas. As paredes do duto hermafrodita são de fina espessura, apresentam pequenas células cuboidais de núcleo central, com numerosos cílios altos e externamente uma fina camada de tecido conjuntivo (Figura 2C).

Células da linhagem germinativa do ovotestis

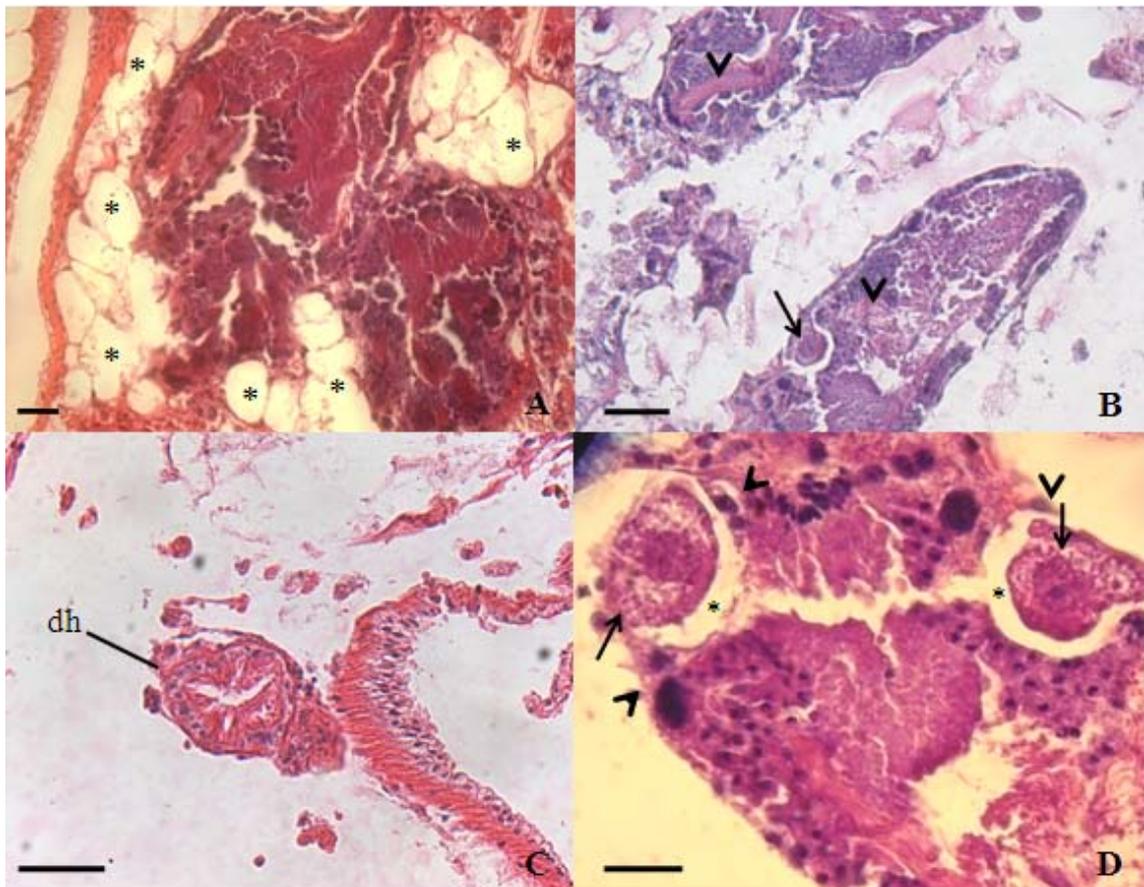
Células da linhagem germinativa feminina

Através das análises dos cortes histológicos do ovotestis de *L. unilamellata*, somente foram identificados oócitos vitelogênicos. Não foram observadas oogônias ou oócitos pré-vitelogênicos, as quais são células da linhagem germinativa feminina do início do processo de oogênese. As células sexuais femininas se originam do anel epitelial germinal, durante todo o desenvolvimento sempre se apresentaram em contato direto com o tecido conjuntivo da parede do ácino folicular. Os oócitos apresentam-se em contato com a lâmina basal das células foliculares e estas com o epitélio acinar.

Oócitos em vitelogênese são grandes células arredondadas de grande volume, com um grande núcleo arredondado eosinofílico e nucléolo evidente. Há a presença de células foliculares como limite do epitélio folicular, quando os oócitos estão em vitelogênese avançada, esse limite amplia-se dando origem a uma cavidade folicular (Figura 2D).

Células Foliculares

As células foliculares são células alongadas ou triangulares, que emitem expansões citoplasmáticas, que englobam o oócito isolando-o do epitélio acinar e de outras células das linhagens germinativas. Apresenta núcleo fortemente corado, se localizam na região do limite basal entre o oócito e o epitélio acinar (Figura 2D). Nos oócitos em vitelogênese avançada, não foi possível determinar o número de células foliculares em associação ao oócito.



Fotografia 4. **A.** Ácino folicular do ovotestis intrinsecamente associado à glândula digestiva, circundado por vasos sanguíneos (*), indicando uma forte irrigação hemolinfática; **B.** No mesmo ácino folicular há a presença de células das linhagens germinativas femininas (seta) e masculinas (cabeça da seta), delimitadas por um epitélio de células fusiformes; **C.** Duto hermafrodita (dh), com epitélio cúbico simples ciliado com núcleo acidofílico; **D.** Oócitos em vitelogênese avançada (seta) de nucléolo evidente, apresentando citoplasma altamente granular fracamente corado e com um grande núcleo arredondado eosinofílico, com duas células foliculares (cabeça da seta) delimitando a cavidade folicular. Coloração = HE. Barra = 50µm.

Células da linhagem germinativa masculina

Nos ácinos foliculares foi encontrada uma maior quantidade de células da linhagem germinativa masculina do que da linhagem germinativa feminina. Foram identificados cinco tipos celulares na linhagem masculina: espermatogônias, espermatídes, espermatócitos primários e secundários e espermatozóides, de acordo com a ordem de desenvolvimento.

As espermatogônias são as maiores células da linhagem, se caracterizam por serem arredondadas lobuladas, em forma piriforme, com pouco conteúdo citoplasmático ao redor do núcleo (Figura 3A). O núcleo ocupa a maior porção celular com cromatina heterocromática fortemente corada. Estão dispostas em grupos de número variável, localizadas parcialmente ao redor das células de Sertoli.

As espermatídes são células arredondadas, com citoplasma eosinofílico e núcleo altamente heterocromático possuindo várias formas devido a mudanças morfológicas observadas durante o processo das fases meióticas (Figura 3B). Estão dispostas em grupos de grande número de células, sempre associadas às células de Sertoli.

Os espermatócitos estão organizados em grupos, e se encontram sempre associados às células de Sertoli. Foram diagnosticadas duas fases de desenvolvimento, os espermatócitos primários e os espermatócitos secundários. Os espermatócitos primários são células de pequeno tamanho, arredondadas, com citoplasma eosinofílico e núcleo pequeno, com cromatina condensada, arredondado e deslocado para um dos pólos da célula (Figura 3C). Após uma divisão mitótica, originam os espermatócitos secundários, que são células de formato alongado, núcleo alongado e claramente polarizado e heterocromático (Figura 3C).

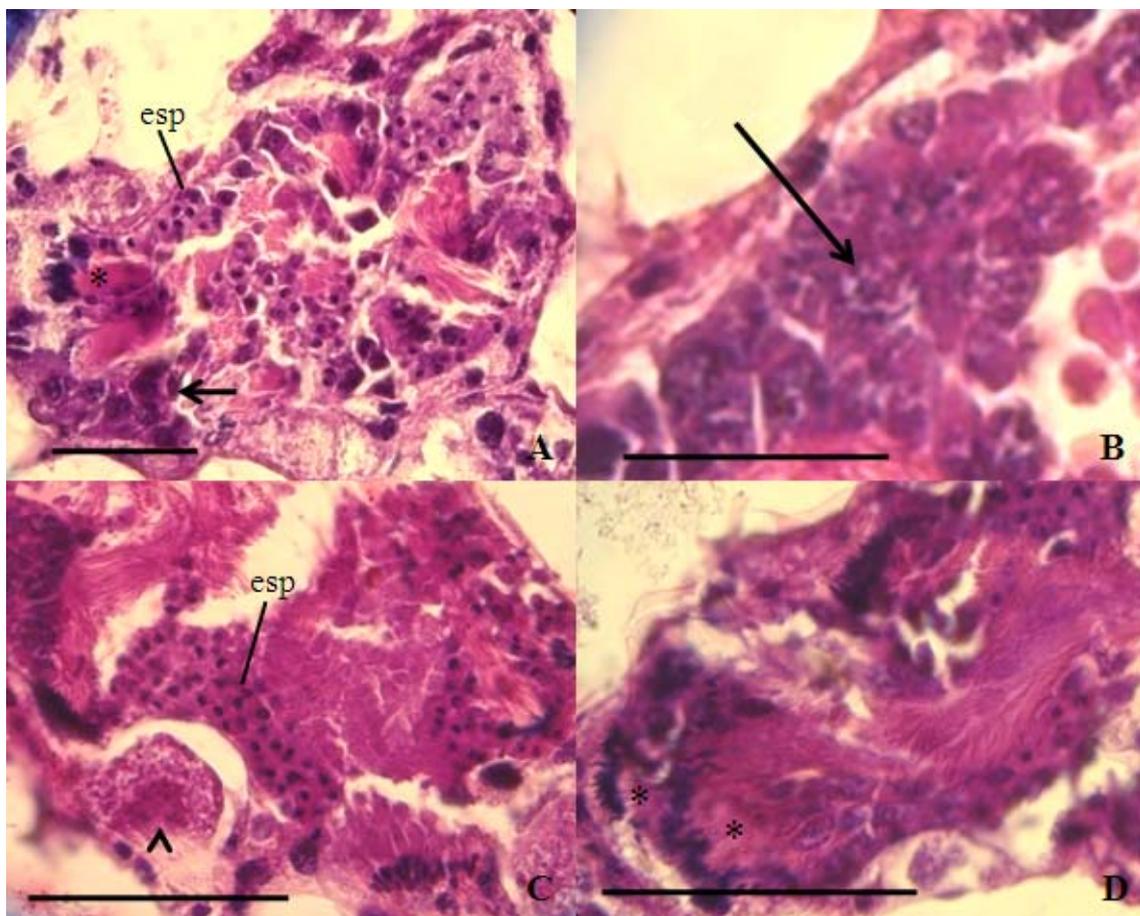
Os espermatozóides são as células mais evidentes da linhagem germinativa masculina. Dispostos em grupos e paralelamente alinhados, podem estar ligados às células de Sertoli ou livres no lúmen acinar. Possuem uma região acrossômica, contendo um núcleo altamente heterocromático e uma longa cauda eosinofílica (Figura 3B, 3C e 3D). Na espécie em estudo, o acrossoma dos espermatozóides apresenta formato helicóide alongado.

Células de Sertoli

As células de Sertoli estão em contato com a lâmina basal nos locais onde as células femininas não estão presentes. Entretanto, mantêm sempre contato uma com a outra, formando uma camada epitelial de células que dividem o lúmen do ácino em um compartimento feminino e masculino, entre os tipos celulares das linhagens germinativas femininas e masculinas. O

compartimento feminino sendo periférico mais próximo à lâmina basal, e o compartimento masculino na região mais central do lúmen acinar.

Todas as células da linhagem masculina, espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides, encontram-se associadas à célula de Sertoli. Esta célula é relativamente grande em relação às células germinativas, possui um núcleo de forma ovalada, de tamanho proporcional à célula e fortemente corado (Figura 3A). A célula de Sertoli permanece amplamente associada ao limite basal do ácino folicular, emitindo expansões citoplasmáticas no lúmen acinar, às quais as células germinativas masculinas se associam.



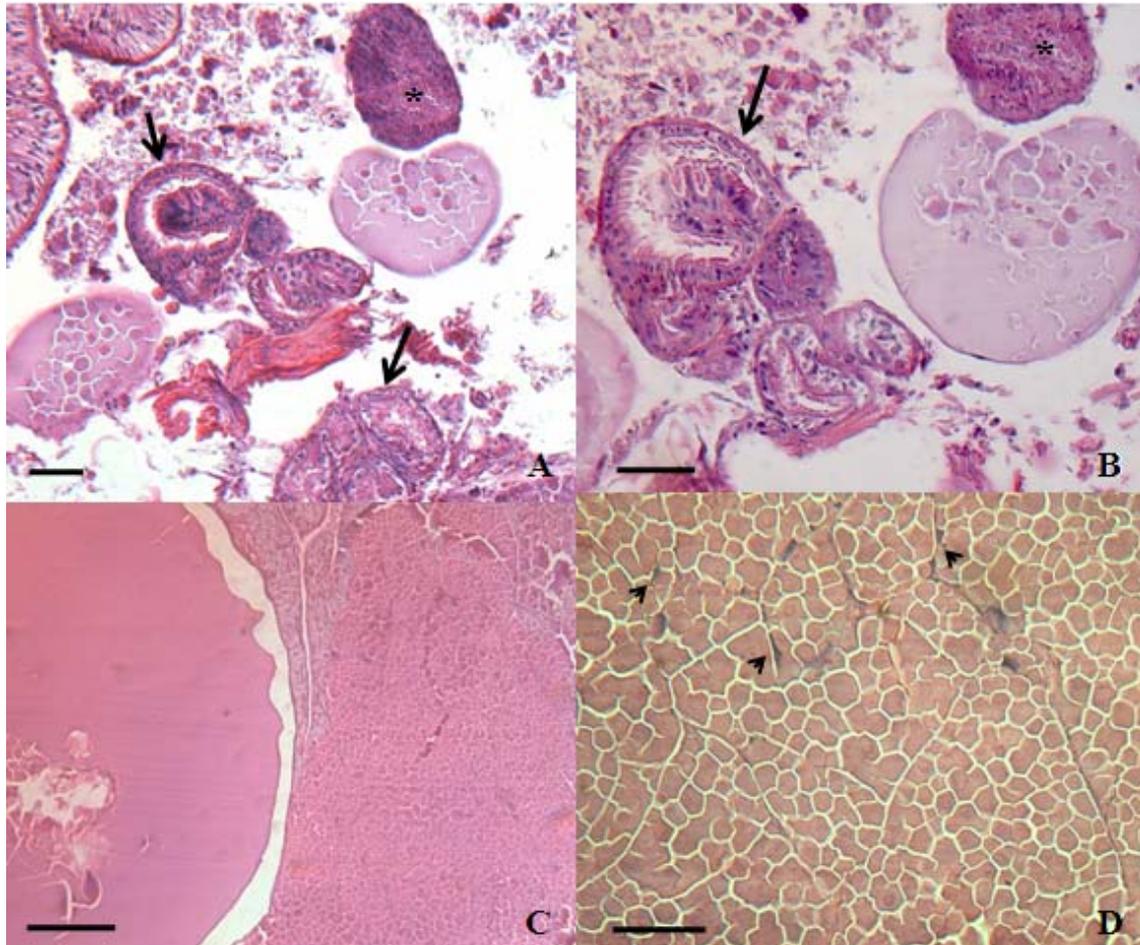
Fotografia 5. Cortes histológicos do ovotestis de *Leptinaria unilamellata*. **A.** vista geral do ovotestis mostrando as células da linhagem masculina, espermatozóides (*), espermatídes (seta) e espermatócitos (esp); **B.** Detalhe das espermatídes (seta); **C.** Detalhe do oócito vitelogênico (cabeça da seta) apresentando uma fenda, próximo aos espermatócitos (esp); **D.** Detalhe dos espermatozóides já formados (*), em contato com a célula de Sertoli. Coloração = HE. Barra = 50 μ m.

Complexo de fertilização

O complexo de fertilização é dividido em duas porções, primeiramente o saco de fertilização que possui um epitélio simples pavimentoso (Figura 4A), e posteriormente, a espermateca dividida em câmaras, constituída de um epitélio simples cúbico glandular, de núcleo central e numerosos cílios (Figura 4A e 4B). Todo o complexo apresenta-se envolvido por uma fina camada de tecido conjuntivo.

Glândula de albúmen

A glândula de albúmen é do tipo alveolar com numerosos folículos amplos e ramificados (Figura 4C). As células glandulares são volumosas, de forma ovóide ou piramidal e possuem um núcleo basal devido à grande quantidade de conteúdo citoplasmático basofílico (Figura 4D). Há a presença de células labirínticas da glândula de albúmen, interpostas entre as células glandulares, são células achatadas e alongadas delimitando o labirinto basal. Externamente, a glândula de albúmen é envolvida por uma camada delgada de tecido conjuntivo.



Fotografia 6. **A.** Complexo de fertilização dividido em duas porções, primeiramente o saco de fertilização com um epitélio simples pavimentoso (*); **B.** Posteriormente a espermateca (seta), constituída de um epitélio simples cúbico glandular, de núcleo central e numerosos cílios, dividida em câmaras; **C.** Células glandulares da glândula de albúmen, volumosas e ovóides ou piramidais em forma, com núcleo basal devido à grande quantidade de conteúdo citoplasmático basofílico; **D.** Células labirínticas da glândula de albúmen (cabeça da seta), interpostas entre as células glandulares do epitélio glandular. Coloração = HE. Barra = 50µm.

3.3.2.2 Porção feminina

Útero

O epitélio do útero possui dois tipos celulares, apresentando, portanto dupla função. A parede do útero não é muscular sendo formada por células epiteliais sobre uma membrana basal, que é uma fina camada de tecido conjuntivo. A parede ventral do útero, na região de transição entre o útero e o oviduto, apresenta um epitélio cúbico simples ciliado com células secretoras esparsas. A parede dorsal do útero apresenta um epitélio de revestimento simples pavimentoso (Figura 5A).

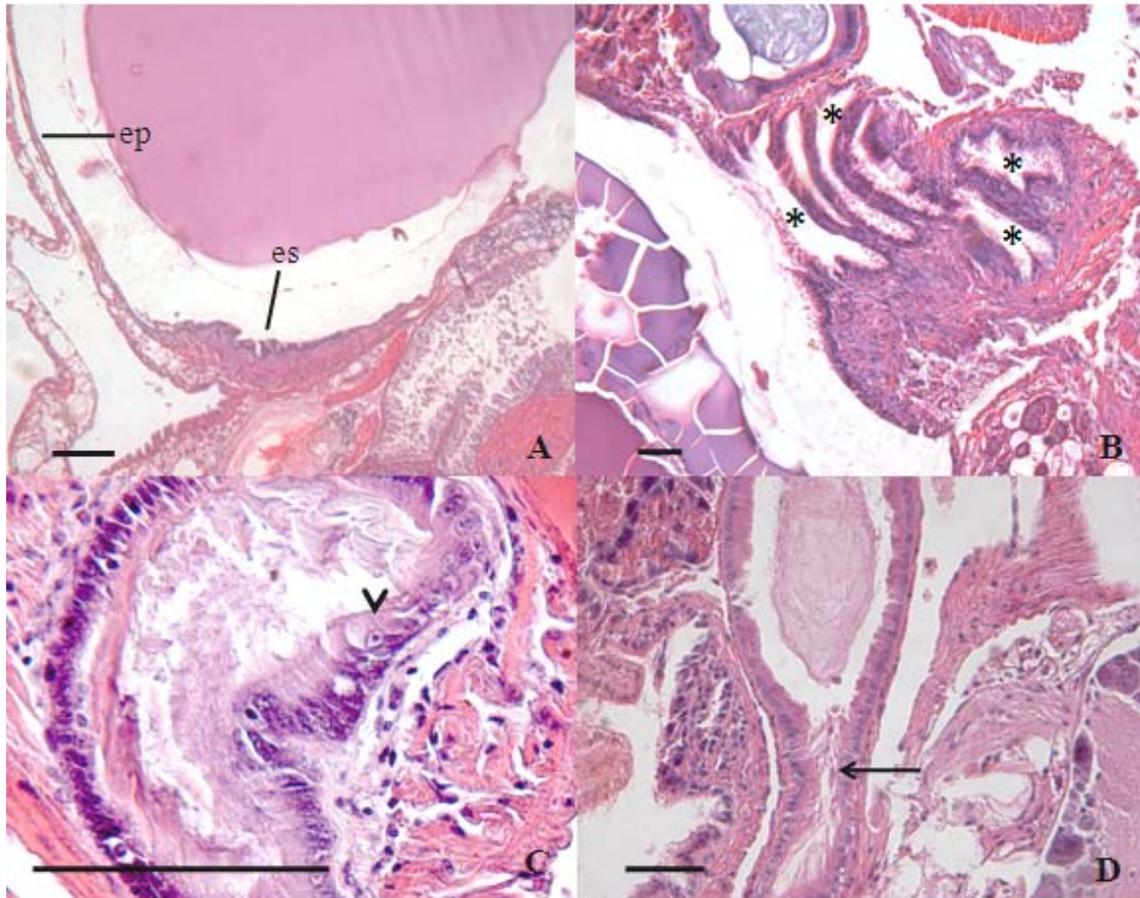
Oviduto livre

O oviduto possui um epitélio simples composto de células prismáticas alongadas com núcleo na porção terço basal, portando longos cílios, com comprimento maior do que o comprimento do corpo celular. Foi observado que a lâmina basal é formada por uma espessa camada de tecido conjuntivo denso não modelado. Externamente, envolvendo a lâmina basal, há uma camada delgada de tecido muscular liso. Todo o conjunto é envolvido por uma membrana, formada por tecido epitelial simples pavimentoso. Em seção transversal, a parede do oviduto apresenta-se altamente pregueada. Estas projeções da parede provavelmente conferem elasticidade ao oviduto, permitindo a expansão da sua luz. Na parte mais alargada do oviduto livre, na região de transição para o útero, as pregas da parede se ampliam. As células que revestem o oviduto são densamente ciliadas, e o movimento ciliar provavelmente cria a corrente de fluido que permite aos espermatozóides alcançar a porção distal do sistema reprodutor e chegar à câmara de fertilização (Figura 5B).

Bolsa copuladora

A bolsa copuladora é revestida por um epitélio simples prismático secretor, circundado por tecido conjuntivo e fibras musculares circulares e que, diferentemente de ducto, não apresenta cílios. Na superfície desse epitélio é possível visualizar a secreção apócrina produzida pela bolsa copuladora, enquanto na luz do órgão é possível observar uma massa de material eosinofílico, corada de rosa ou arroxeada (Figura 5C).

O ducto da bolsa copuladora é revestido por um epitélio simples cúbico densamente ciliado e não-secretor, apoiado sobre uma membrana basal distinta, composta de tecido conjuntivo arranjado frouxamente, envolvida por uma camada muscular. A parede do ducto é pregueada internamente e, em seu lúmen, pode-se notar a presença de material amorfo (Figura 5D).



Fotografia 7. **A.** Útero com dois tipos celulares, na parte interna (região ventral), próxima ao oviduto, apresenta um epitélio do tipo secretor (es), com células cúbicas ciliadas inter espaçadas com células secretoras, provavelmente caliciformes, na parte externa (região dorsal), que se localiza perto da volta corporal, sua camada é fina e apresenta um epitélio de revestimento simples pavimentoso (ep); **B.** Oviduto com um epitélio simples composto de células prismáticas alongadas altamente ciliadas apresenta lúmen (*) com paredes epiteliais altamente pregueadas internamente; **C.** Na superfície do epitélio da bolsa copuladora é possível visualizar a secreção produzida pelas células secretoras (cabeça da seta), o lúmen da bolsa copuladora apresenta uma massa de cor rósea ou arroxeada, provavelmente os espermatozóides parcialmente digeridos; **D.** O ducto da bolsa copuladora (seta) diferentemente da bolsa copuladora se apresenta com muitos cílios em um epitélio simples cúbico. Coloração = HE. Barra = 50µm.

3.3.2.3 Porção masculina

Próstata

Foi observado que a próstata se apresenta em duas diferentes fases de desenvolvimento ou atividade glandular, com um tipo celular distinto em cada fase. A principal diferença entre as fases

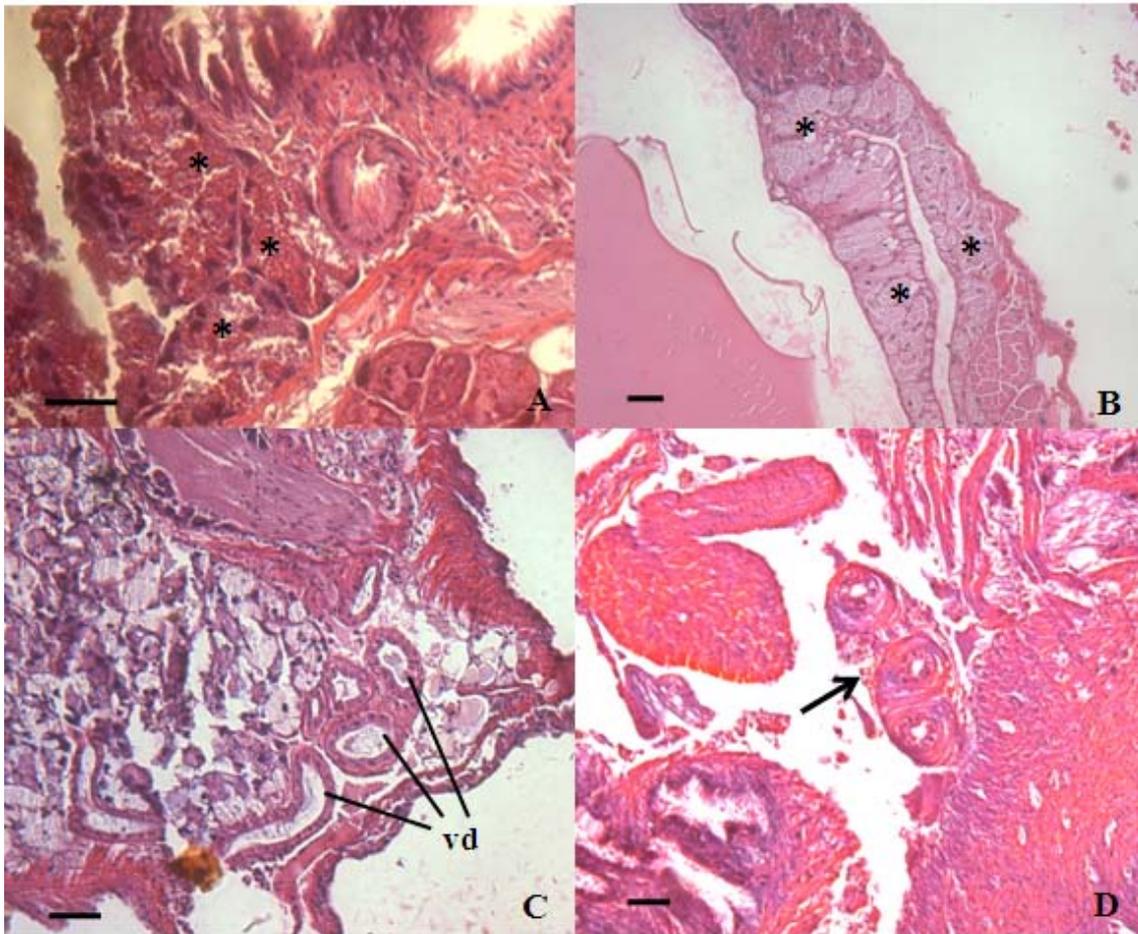
diz respeito ao conteúdo citoplasmático e o arranjo celular. As células prostáticas, nas duas fases, aparentemente apresentam citoplasma de dois tipos: granular acidofílico e granular basofílico.

Na fase que parece ser ativa, a glândula prostática apresenta arranjo túbulo-alveolar, com células secretórias colunares altas que formam grupos acinares, dando origem aos ácinos prostáticos, visíveis durante o estudo morfo-anatômico da glândula. Cada ácino possui espaços luminais ao centro, formando o ducto prostático. As células prostáticas possuem rico conteúdo granular acidofílico e devido à grande quantidade de conteúdo citoplasmático, o núcleo é deslocado para a região basal da célula (Figura 6A).

Na fase de amadurecimento, as células apresentam citoplasma granular basofílico e núcleos menores, arredondados e acidofílicos, em posição periférica. Nesta fase, as células não apresentam arranjo acinar (Figura 6B). Essas células não apresentam arranjo túbulo-alveolar. Abaixo do epitélio glandular, há uma fina camada de fibras de tecido conjuntivo.

Vaso deferente

Esse tubo fino filiforme é caracterizado por um pequeno lúmen limitado por um epitélio simples de células cuboidais, de núcleo arredondado central, portando poucos cílios que apresentam um terço do comprimento do corpo celular. No nível prostático, é possível notar a presença de material amorfo acidofílico no lúmen do ducto deferente, provavelmente secreções prostáticas lançadas no interior do ducto (Figura 6C). O epitélio de revestimento do ducto deferente apóia-se sobre uma camada de tecido conjuntivo, envolta externamente por uma camada relativamente espessa de musculatura circular. Na região em que o ducto deferente penetra o complexo peniano, a camada muscular que envolve o ducto e o pênis é contínua. Na membrana basal de tecido conjuntivo, são encontradas muitas células grandes com um citoplasma basófilo e um pequeno núcleo excêntrico (Figura 6D).



Fotografia 8. **A.** Fase ativa da próstata, com um arranjo túbulo-alveolar com células secretórias colunares altas de rico conteúdo granular acidofílico, que formam ácinos prostáticos (*); **B.** Fase de amadurecimento da próstata, o citoplasma apresenta conteúdo granular basofílico e as células não possuem um arranjo acinar (*); **C.** Vaso deferente (vd) caracterizado por um pequeno lúmen limitado por um epitélio simples de células cuboidais de núcleo arredondado central, portando poucos e baixos cílios, no nível prostático é possível notar a presença de material amorfo acidofílico no lúmen do duto deferente; **D.** Ao redor do epitélio do vaso deferente está uma camada fibrosa de tecido conjuntivo, externamente há uma camada relativamente espessa de musculatura circular (seta). Coloração = HE. Barra = 50µm.

Complexo peniano

O pênis é um órgão altamente muscular, com uma espessa musculatura circular arranjada internamente e longitudinal externamente e possui um pequeno lúmen limitado por células cuboidais de núcleo central, sem cílios (Figura 7B).

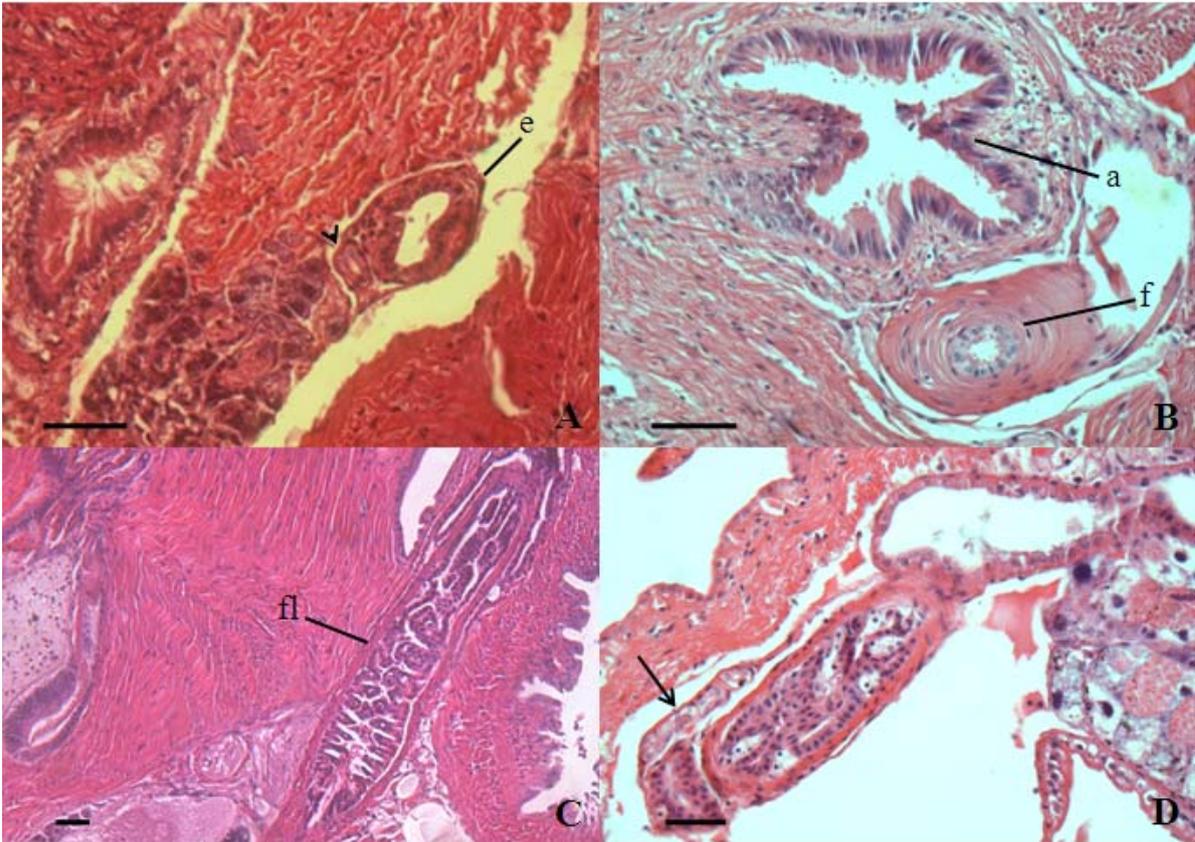
O epifalo é um órgão cilíndrico, representado por uma região glandular, é posterior ao pênis e recoberto pela bainha do pênis. O epifalo apresenta epitélio simples prismático, com células

colunares, não ciliadas e de núcleo alongado. Em seção transversal, podemos notar ao lado do epifalo a presença do ducto deferente que corre paralelamente ao epifalo (Figura 7A). A bainha do pênis envolve essas duas estruturas, constituindo-se de um epitélio simples pavimentoso de revestimento (Figura 7A). Entre a bainha do pênis e a parede do epifalo há uma espessa camada de tecido conjuntivo, e externamente uma camada de musculatura longitudinal, e uma camada de musculatura circular. O lúmen do epifalo é característico por apresentar rugosidades na parede. A parede apresenta duas projeções ou pregas não muito acentuadas, formadas provavelmente devido ao desenvolvimento muscular ser especialmente pronunciado, nesses dois pontos. Essas projeções formam dois sulcos longitudinais que atravessam o comprimento inteiro do órgão.

O flagelo é de fino calibre, longo e histologicamente parece ser glandular. Este órgão é revestido por epitélio simples cúbico, cujas células apresentam o núcleo fortemente corado, apoiado sobre uma membrana basal de tecido conjuntivo. O flagelo é revestido pela bainha do pênis, formada por epitélio de revestimento simples pavimentoso. Associada à parede do flagelo, observa-se a presença de células secretoras globosas, com citoplasma altamente granular eosinofílico, constituindo a glândula prepucial (Figura 7C). É possível observar que a secreção das células da glândula prepucial atinge a luz do flagelo através de ductos. Essa secreção parece também atingir o lúmen do epifalo. Em seção longitudinal do flagelo, é possível visualizar o lúmen com parede interna altamente pregueada (Figura 7D).

Átrio genital

O átrio genital possui uma ampla luz, seu epitélio apresenta dobras internas, conferindo-lhe um lúmen pregueado em forma de H, revestido por um epitélio simples prismático (Figura 7B). As células do epitélio são altas, com núcleo alongado longitudinalmente, corado fortemente e com numerosos cílios altos. A membrana basal sobre a qual o epitélio do átrio se apóia é formada por uma trama de fibras musculares longitudinais e por uma pequena quantidade de tecido conjuntivo frouxo.



Fotografia 9. **A.** O epifalo (e) apresenta epitélio simples prismático, com células colunares, não ciliadas e de núcleo alongado, ao lado o ducto deferente (cabeça da seta) corre paralelamente ao epifalo, a bainha do pênis envolve essas duas estruturas, constituindo-se de um epitélio simples pavimentoso de revestimento; **B.** O fallo (f) possui um pequeno lúmen limitado por células cuboidais de núcleo central, sem cílios e é altamente muscular, com uma espessa musculatura arranjada circularmente internamente e longitudinalmente externamente, o átrio genital (ag) apresenta em seu epitélio dobras internas, conferindo-lhe um lúmen pregueado em forma de H, o qual é delimitado por células simples prismáticas; **C.** O flagelo (fl) possui um epitélio interno fortemente pregueado, sendo um epitélio simples cúbico com núcleo fortemente corado (basofílico); **D.** Paralelamente ao flagelo há a glândula prepucial (seta), de epitélio cúbico simples secretor, suas células são globosas de citoplasma altamente granular eosinofílico. Coloração = HE. Barra = 50µm.

3.4 DISCUSSÃO

Os gastrópodes pulmonados possuem um sistema reprodutor morfológica e funcionalmente complexo (DUNCAN, 1975; GÓMEZ, 2001). Suas funções primárias são a produção de espermatozoides e oócitos; armazenamento e transporte de gametas maduros em um meio

adequado; exercer papéis estruturais e fisiológicos nos processos de corte e cópula; transferência de espermatozoides endógenos aos dutos reprodutores do parceiro; recepção de espermatozoides exógenos; oferecer um sítio e microambiente próprios para a fertilização do oócito; recobrir os zigotos com camadas nutritivas e protetoras; reabsorção de produtos remanescentes e, finalmente, a oviposição (GÓMEZ, 2001). A complexidade morfológica permite a diferenciação de espécies, enquanto a complexidade funcional reflete nos sistemas elaborados de comportamento sexual, originados pelo conflito sexual entre a função feminina e masculina (LEONARD, 1991).

As análises histológicas do ovotestis de espécimes de *L. unilamellata*, indicam que estes moluscos são hermafroditas simultâneos, produzindo gametas masculinos e femininos no mesmo ácino folicular, com a possibilidade de se reproduzir por autofecundação. Estas características histológicas corroboram aspectos comportamentais observados em laboratório. Ao redor dos ácinos foliculares do ovotestis há a presença de uma rede de vasos sanguíneos próximos à lâmina basal do epitélio germinativo, indicando uma forte irrigação hemolinfática. Em *Arion ater* a direta relação entre as células de Sertoli com o suprimento sanguíneo e o desenvolvimento dos gametas sugere que, essas células agem como pontos intermediários no transporte de nutrientes e também como suporte mecânico dos gametas (PARIVAR, 1980).

Em *L. unilamellata*, o desenvolvimento de ambas as linhagens germinativas no mesmo ácino folicular, assim como a morfologia e disposição espacial dessas células, foram similares ao encontrado para outras espécies de moluscos (CUEZZO, 1995; FURTADO et al., 2004; GRIFFOND et al., 1991; HORN et al., 2005; JONG-BRINK, et al., 1977; JOOSSE e REITZ 1969; RUNHAM, 1982; TEIXEIRA et al., 2006). Os gametas femininos permanecem em contato direto com as células foliculares, durante todo o seu desenvolvimento. As células foliculares, por sua vez, estão em contato direto com a lâmina basal da parede do ácino folicular. O oócito apresenta inicialmente uma fase móvel, que, mais tarde, é seguida por uma fase vitelogênica sésil, durante a qual o oócito é circundado por células foliculares, dando origem a um folículo (JOOSSE e REITZ, 1969). Contrariamente, os gametas masculinos encontram-se permanentemente associados às células de Sertoli, as quais formam uma camada epitelial, que divide o lúmen dos ácinos em um compartimento masculino central e outro feminino periférico (FURTADO et al., 2004; HOGG e WIJDENES, 1979; JONG-BRINK et al., 1976; JOOSSE e REITZ, 1969).

São atribuídas às células foliculares as funções de controle do microambiente de desenvolvimento do oócito, por agirem como uma barreira permeável, na formação de envelopes secundários, transporte e nutrição do oócito, fagocitose, produção de hormônios e no envolvimento no processo de ovulação pela formação da cavidade folicular (HILL, 1977; JONG-BRINK et al., 1976;

KHAN e SALEUDDIN, 1983). As células de Sertoli são consideradas células que atuam no suporte, nutrição, transporte de espermatozóides, produção de hormônios, fagocitose e envolvimento no processo de espermiogênese (JONG-BRINK et al., 1977; PARIVAR, 1980). As espermatogônias e as espermátides ocupam principalmente a área basal e central da célula de Sertoli respectivamente, enquanto que os espermátócitos secundários e os espermatozóides localizam-se na região apical celular (BOJAT et al., 1991). Foi observado em microscopia eletrônica que ao final da fase de espermátide um grande número de mitocôndrias estava presente no ápice das células de Sertoli, isso indica que o envolvimento dessas células no processo de espermiogênese envolve um elevado gasto energético (JONG-BRINK et al., 1977).

A liberação dos espermatozóides e oócitos produzidos no ovotestis, no ducto hermafrodita, é funcionalmente separada (DUNCAN, 1975). Além de permitir a passagem dos gametas, o complexo da espermateca possui a função de agir como uma vesícula seminal antes que o esperma seja liberado na cópula. Alguns estudos sugerem que esta área seria de armazenamento e que possuiria uma região glandular responsável pela capacitação espermática (HOGG e WIJDENES, 1979; DUNCAN, 1975).

Os animais hermafroditas possuem ambos os sistemas reprodutores masculino e feminino funcionais. Dessa forma, os mecanismos de seleção sexual pós-copulatórios atuam de maneira diferente do que o observado nos animais gonocoristas (BEESE et al., 2006). A seleção pós-copulatória envolve, a competição espermática (BEESE et al., 2006) ou escolha críptica da fêmea (EVANNO et al., 2005; HAASE e KARLSSON, 2004). Esse processo de escolha críptica envolve a seleção pela função feminina de determinado conjunto de espermatozóides, dentre todos aqueles provindos de parceiros de acasalamentos sucessivos, armazenados nos túbulos de fundo cego da espermateca (HAASE e KARLSSON, 2004; EVANNO et al., 2005). Um maior investimento em número das células sexuais masculinas seria vantajoso, por um maior risco de perda desses gametas, devido ao conflito sexual entre a função masculina e feminina do hermafrodita (CUEZZO, 1995).

Na maior parte dos estudos, os mecanismos de seleção pós-copulatória, são inferidos a partir de dados comportamentais, permanecendo algumas interpretações não totalmente esclarecidas. A morfologia microscópica tem sido essencial para o entendimento dessas interpretações. Como exemplo, o processamento do esperma na espermateca pode ocorrer mecanicamente através da movimentação de músculos e cílios e ou quimicamente através de secreções epiteliais (CATALÁN et al., 2002; BOJAT et al., 2001). No presente estudo, a espermateca apresentou-se dividida em túbulos, com longos cílios, fornecendo a evidência de que *L. unilamellata* apresenta provavelmente processamento mecânico do esperma. Durante a transferência de espermatozóides, os cílios do ducto

comum também podem evitar que o autoesperma entre na espermateca, onde eles juntamente com o aloesperma seriam utilizados na auto-fertilização (BOJAT et al., 2001).

Na junção do ducto hermafrodita com os tratos masculino e feminino, no carrefour, abre-se também o ducto da glândula de albúmen adicionando sua secreção nutritiva nos ovos fertilizados. A ação dos tratos ciliados, bainhas de músculos e esfíncteres devem servir para direcionar a saída de autoespermatozóides no espermoduto. Quando a fertilização cruzada ocorre, os aloespermatozóides ascendem pelo trato feminino atingindo o complexo da espermateca. O armazenamento do aloesperma ocorre nos túbulos laterais de fundo cego desse complexo. (DUNCAN, 1975).

Após a fertilização o zigoto fecundado recebe camadas protetoras e nutritivas, sendo a camada de albúmen a principal fonte de nutrientes para o desenvolvimento do embrião. A glândula de albúmen apresentou células glandulares com grande conteúdo citoplasmático, provavelmente secreções nutritivas a serem incorporadas ao zigoto. A composição das células glandulares de albúmen sugere o envolvimento na síntese da camada de albúmen do ovo, a qual é feita de um material complexo mucoprotéico suplementado por quantidades significativas de cálcio (CATALÁN et al., 2002). A concha nos filhotes recém nascidos provê suporte mecânico, resistência à dessecação e habilidade de procura por alimento (DUNCAN, 1975). Em *L. unilamellata* provavelmente há grande mobilização das secreções produzidas na glândula de albúmen, devido à liberação de filhotes com seu desenvolvimento completo. Entretanto esse gasto energético em um primeiro momento é compensado pela maior taxa de sobrevivência por parte dos filhotes.

A secreção prostática é o principal componente do fluido seminal e nos estilomatóforos lhe é atribuída três funções: contribuição ao fluido seminal, facilitar o acesso de aloespermatozóides ao local de fertilização e contribuir à formação do ovo (BAYNE, 1967). No nível prostático, foi possível observar material amorfo acidofílico no lúmen do vaso deferente, provavelmente representando a contribuição ao fluido seminal das secreções prostáticas. Foi observado que a próstata se apresenta em duas diferentes fases de desenvolvimento ou atividade glandular, com um tipo celular distinto a cada fase. HOLM (1946) também observou em *Lymnaea stagnalis appressa*, que a próstata é composta de dois tipos celulares, o primeiro sendo células colunares estreitas, arranjadas em grupos com núcleo basal e o segundo tipo, células colunares de núcleo central. As do primeiro tipo se assemelham às encontradas no presente estudo. Provavelmente, esses tipos celulares estão relacionados a estágios cíclicos da glândula prostática dos moluscos.

Em seção transversal, o oviduto apresenta um lúmen com paredes epiteliais altamente pregueadas internamente, presença de cílios e uma musculatura desenvolvida. Uma morfologia similar do oviduto foi encontrada para as espécies *Achatina fulica* e *A. monochromatica* (TEIXEIRA

et al., 2006) e *Cornu aspersum* (HOLM, 1946). O oviduto apresenta-se extremamente envolvido no processo reprodutivo dos gastrópodes pulmonados, por sua participação no transporte de espermatozóides, recebimento de aloespermatozóides do parceiro, provisão de camadas e liberação dos ovos (CATALÁN et al., 2002; DUNCAN, 1975).

No presente estudo, foi observado que a parede do útero de *L. unilamellata* é formada por células epiteliais e células glandulares esparsas. Este padrão também foi observado para outras espécies de moluscos terrestres. Células caliciformes foram encontradas em entremeio a um epitélio prismático simples ciliado em *A. fulica* e *A. monochromatica* (TEIXEIRA et al., 2006). As células do epitélio do útero promovem um meio interno intra-uterino adequado para o desenvolvimento dos embriões. Provavelmente essas células secretoras encontradas no presente estudo são células caliciformes, entretanto seria necessário o emprego de outras técnicas histoquímicas para a confirmação adequada.

O benefício evolutivo dos acasalamentos múltiplos reside em um ganho de sucesso reprodutivo pela função masculina, como observado nos animais gonocoristas, entretanto, a digestão do esperma na bolsa copuladora equilibraria os benefícios da função feminina (EVANNO e MADEC, 2007). O lúmen da bolsa copuladora de *L. unilamellata* apresentou uma massa de material amorfo eosinofílico, a qual provavelmente representa os aloespermatozóides parcialmente digeridos. Células glandulares epiteliais de secreção apócrina seriam responsáveis por essa digestão (GÓMEZ, 2001). Estudos sugerem fortemente a função de digestão de espermatozóides pela bolsa copuladora, na qual o espermátóforo descarrega espermatozóides e fluido seminal (DUNCAN, 1975; CATALÁN et al., 2002). O ducto da bolsa copuladora possui uma grande quantidade de cílios, que provavelmente direcionam os espermatozóides para a bolsa, o que diminui o número de espermatozóides que alcançam o trato reprodutor feminino, e realizem, portanto a fecundação do oócito. Geralmente, no ducto da bolsa copuladora não ocorre digestão por ser delimitado por um epitélio pregueado com células de revestimento e não secretórias (VISSER, 1973). Os espermatozóides com o movimento dos cílios são levados a bolsa copuladora através desse ducto, onde por sua vez são degradados. Esse mecanismo, aliado ao armazenamento de espermatozóides no complexo da espermateca, se apresenta como mais um aspecto da seleção pós-copulatória por parte da função feminina do hermafrodita. Os aloespermatozóides que atingem o complexo da espermateca seriam selecionados, ou poderia haver preferência por autofecundação.

O pênis em *Stylommatophora* é um órgão altamente muscular, que funciona como portador de autoespermatozóides, os quais são depositados dentro do trato reprodutor do parceiro, na forma de um espermátóforo ou uma massa seminal simples (GÓMEZ, 2001). No presente estudo, este foi o

órgão do complexo peniano que apresentou uma musculatura mais desenvolvida. A morfologia do pênis possui um alto valor nos estudos taxonômicos, em diferentes espécies de moluscos a morfologia foi descrita em detalhes (DUNCAN, 1975). A morfologia microscópica do pênis também é utilizada na comparação entre espécies (COOKSON, 1982). Dessa forma, a morfologia do pênis pode ser observada como sendo espécie-específica e, portanto, interpretada como a principal característica de reconhecimento no acasalamento e particularmente no sucesso da cópula (GÓMEZ, 2001).

O epifalo é um órgão cilíndrico caracterizado igualmente por paredes altamente musculares, principalmente na região correspondente às pilastras longitudinais. Constitui uma parte glandular do complexo peniano, as pilastras possuem células globosas de secreção mucosa e de secreção neutra (HOLM, 1946). No presente estudo, células semelhantes foram encontradas em entremeio ao tecido conjuntivo.

Em muitos estilomatóforos os espermatozóides são transferidos através de um espermatóforo. A glândula prepucial se localiza na camada de tecido conjuntivo do flagelo, e parece ser responsável pela formação do espermatóforo. A forma do espermatóforo é determinada pela conformação da parede interna do epifalo. Esse espermatóforo possui morfologia muitas vezes espécie-específica, conferindo a vantagem de proteção aos espermatozóides no duto reprodutor do parceiro, evitando maiores riscos de perda de espermatozóides ao meio ambiente externo e o cruzamento interespecífico. Na fecundação cruzada em um ambiente terrestre, sua permanência seria favorecida pela vantagem adaptativa que conferiu na transição do grupo do ambiente aquático para o ambiente terrestre (VISSER, 1973). Em *L. unilamellata*, foi observada a presença de um epifalo com parede interna apresentando projeções, resultando em uma configuração complexa, além da presença de uma glândula prepucial. Estas características indicam que *L. unilamellata* forma espermatóforo, que provavelmente apresenta uma configuração complexa.

No presente estudo as características histológicas da parede do átrio genital também apresentou semelhanças aos encontrados por COOKSON (1982), para três espécies de moluscos terrestres.

A maior parte das informações existentes sobre o sistema reprodutor de gastrópodes terrestres se baseia somente na anatomia, os estudos microscópicos e funcionais são escassos (LEONARD, 1991; GÓMEZ, 2001). Esses estudos são relevantes na compreensão dos eventos envolvidos na reprodução, desde a gametogênese até a liberação de ovos ou filhotes no meio externo (FURTADO et al., 2004; JOOSSE e REITZ, 1969; MONTEIRO e KAWANO, 1998; OSSELAER e TURSCH, 2000;). A morfologia microscópica dos órgãos do sistema reprodutor corrobora estudos comportamentais e

ecológicos no aspecto da biologia reprodutiva e história de vida. Sobretudo, esclarece, a um nível mais apurado, as rotas migratórias de estágios parasitários intra-hospedeiro (MENDONÇA et al., 2003), a influência sobre os tecidos dos moluscos tratados com métodos de controle químicos e os processos envolvidos no acasalamento, digestão e armazenamento de gametas, seleção copulatória, entre outros aspectos da biologia reprodutiva (BEESE et al., 2006; EVANNO e MADEC, 2007; KOEMTZOPOULOS e STAIKOU, 2007).

Os estudos morfoanatômicos detalhados do sistema reprodutor, além de se apresentarem importantes na sistemática, auxiliam na compreensão de alguns aspectos histológicos. O esclarecimento da morfologia microscópica do sistema reprodutor de *L. unilamellata*, fornece conhecimentos relevantes ao estudo da morfologia comparativa de gastrópodes terrestres, até então, o conhecimento acerca da morfologia microscópica dos diferentes sistemas era inexistente. Este estudo promove subsídios para futuros estudos que utilizem a morfologia microscópica como ferramenta.

**ONTOGENIA DA CONCHA E VARIABILIDADE CONQUILIMORFOLÓGICA EM POPULAÇÕES DE
Leptinaria unilamellata (d'Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE)**

INTRODUÇÃO

O grupo Mollusca compreende um filo animal altamente diverso com mais de 100.000 espécies reconhecidas, a maioria das quais apresenta uma concha como esqueleto externo distinto. As conchas foram amplamente utilizadas por naturalistas dos séculos XVII e XVIII na classificação e conhecimento desse grupo de animais (WILKE et al., 2002). Entre os moluscos terrestres, a maior parte das espécies foi descrita com base na morfologia da concha e no século XVIII, os naturalistas já observavam padrões de variação conquiliomorfológica (FIORENTINO et al., 2008). No entanto, foi a partir da observação de que a forma da concha apresenta uma distribuição bimodal em faunas de moluscos terrestres, que os malacologistas passaram a investigar os aspectos funcionais da morfologia da concha (FIORENTINO et al., 2008). Atualmente, o estudo da morfologia e morfometria da concha se tornou uma das ferramentas necessárias na análise da variabilidade de populações de gastrópodes terrestres, com o objetivo de utilização para fins sistemáticos e de estudo sobre biologia e evolução.

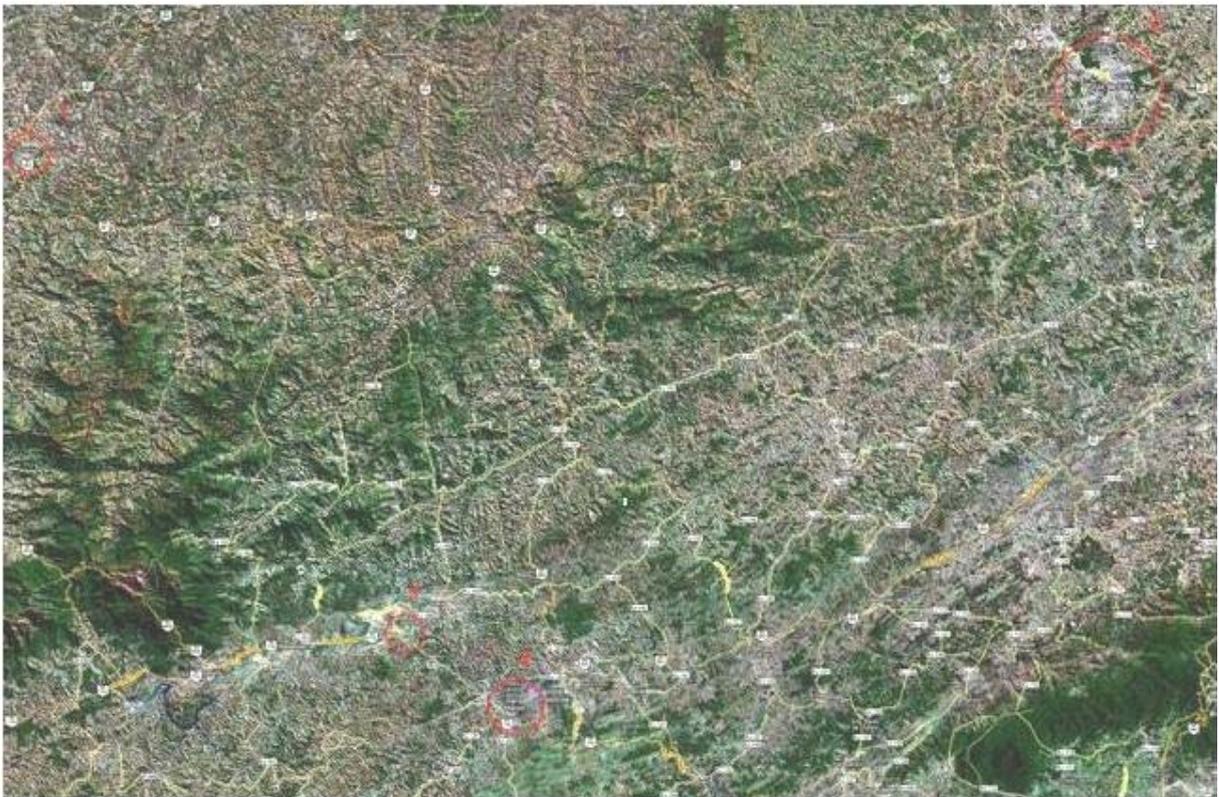
O polimorfismo da concha foi observado em diversos grupos de moluscos terrestres e diversos autores demonstraram a existência de um componente genético determinando as diferenças morfológicas. Em muitos casos, a forma da concha relaciona-se a características físicas do ambiente e parece ter sido selecionada em resposta a pressões ambientais. Entretanto, alguns estudos mostram a ausência de relação entre as características ambientais e as diferenças morfológicas entre populações. Quando não existem evidências de relação entre restrições ambientais e variação morfológica, os autores atribuem tal variação a fatores que atuaram no passado, tais como processos neutros ou pressões seletivas que deixaram de agir (CHIBA e DAVISON, 2007; FIORENTINO et al. 2008). A análise morfométrica da concha é amplamente utilizada nos estudos de variabilidade populacional (BACKELJAU et al., 2001). A morfometria, associada ao estudo da anatomia do sistema reprodutor, à abordagem genética ou a ferramentas moleculares, tem permitido o maior entendimento do significado funcional das variações morfológicas entre populações.

Os objetivos do presente estudo foram descrever a ontogenia da concha de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) e verificar se moluscos provenientes de diferentes populações apresentam variação nos padrões conquiliomorfológicos e conquiliomorfométricos e se estas variações se refletem em diferenças no processo de formação da concha.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção dos moluscos e local dos experimentos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Moluscos e Helmintos - Programa de Pós-graduação em Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Criações-matrizes foram estabelecidas com espécimes de *L. unilamellata* coletados nas seguintes localidades: município de Juiz de Fora, MG (21°44'29.65"S 43°21'19.65"O); município de Cruzília, MG (21° 50' 20" S, 44° 48' 28" W); município de Barra Mansa, RJ (22°31'59.14"S 44°9'54.21"O) e Floriano, distrito do município de Barra Mansa, RJ (22°31'59.14"S 44°9'54.20"O) (Figura 1).



Fotografia 10. Localização geográfica das localidades de coleta de *Leptinaria unilamellata*. Legenda: 1 - município de Cruzília, MG; 2 - município de Juiz de Fora, MG; 3 - Floriano, distrito do município de Barra Mansa, RJ; 4 - município de Barra Mansa, RJ. Fonte: Google Earth.

4.2.2 Caracterização das localidades de coleta dos moluscos

As localidades foram caracterizadas com bases nas informações disponibilizadas no site do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2008).

Município de Cruzília (MG) (21° 50' 20" S, 44° 48' 28" W)

O município de Cruzília localiza-se na Mesorregião Sul/Sudoeste de Minas Gerais, Microrregião Andrelândia e caracteriza-se pelo Bioma de Mata Atlântica, precipitação média anual de 1568 mm de chuva, temperatura média anual de 19,1 °C, altitude de 1010m e clima tropical de altitude - Cwb (clima temperado úmido com inverno seco e verão temperado). As estações são bem definidas, com chuvas de verão. O verão é temperado, com média de temperatura do ar no mês mais quente maior que 22 °C.

Município de Juiz de Fora (MG) (21° 45' 50" S, 43° 21' 0" W)

Juiz de Fora localiza-se na Mesorregião da Zona da mata, Microrregião Juiz de Fora. As terras do município encontram-se inseridas na Bacia do rio Paraíba do Sul, às margens do Rio Paraibuna, que corta o município no sentido norte-sul. Outros rios importantes que banham o município são os rios Cágado e do Peixe, afluentes do Paraibuna. O município caracteriza-se pelo Bioma de Mata Atlântica e altitude de 678m. O clima de Juiz de Fora é do tipo tropical de altitude - Cwa (clima temperado úmido com inverno seco e verão quente), caracterizado por duas estações bem definidas: uma seca e de menores temperaturas, que se estende de maio a setembro, e outra úmida e de temperaturas mais elevadas, de outubro a abril. A temperatura média anual é de 19,3°C, sendo a média das máximas em torno de 24°C e a das mínimas em torno de 15°C. O município localiza-se nos contrafortes da Serra da Mantiqueira. O relevo é predominantemente montanhoso, apresentando formações típicas denominadas “mar de morros”.

Município de Barra Mansa (RJ) (22° 32' 38" S, 44° 10' 15" W) e distrito de Floriano

Barra Mansa situa-se no sul do estado do Rio de Janeiro, na microrregião do Vale do Paraíba dentro da mesorregião do Sul Fluminense, entre as Serra do Mar e da Mantiqueira, à altitude de 381 metros. O município caracteriza-se pelo bioma de Mata Atlântica e clima tropical de altitude - Cwa (clima temperado úmido com inverno seco e verão quente), caracterizado por duas estações bem definidas, com verões quentes (temperatura média do ar maior que 22°C) e chuvosos e inverno seco. A umidade relativa do ar varia entre 77% a 69%; a temperatura média encontra-se entre 22,25°C, sendo que as mais baixas registram-se no período de maio a setembro (média mínima de 13,7°C) e as mais altas entre novembro a março (média máxima 29,74°C). O período de chuvas está entre os meses de outubro a abril com pluviosidade de 1.192,8 mm/ano. A precipitação média anual varia em torno de 1.592,5 mm de chuva, sendo de dezembro a março o período mais chuvoso (média de 247,87 mm/mês) e de maio a setembro o mais seco (média de 36,02 mm/mês). A estrutura hidrográfica do município é marcada pela presença do Rio Paraíba do Sul drenando vasta

região através de uma grande quantidade de rios e córregos espalhados por toda a superfície. O relevo do município é constituído por planaltos, com altitude média de 381 metros, porém, esta média diminui em direção ao Rio Paraíba do Sul, para formar a planície aluvial que é contornada pelo "mar de morros" com nível topográfico mais elevado.

Na margem direita do rio Paraíba do Sul, localiza-se o Distrito de Floriano, antigo Ribeirão da Divisa, 2º Distrito do Município de Barra Mansa, situado entre as cidades do Rio de Janeiro e de São Paulo e cortado pela rodovia Presidente Dutra e pelo rio Paraíba do Sul.

4.2.3 Manutenção dos moluscos

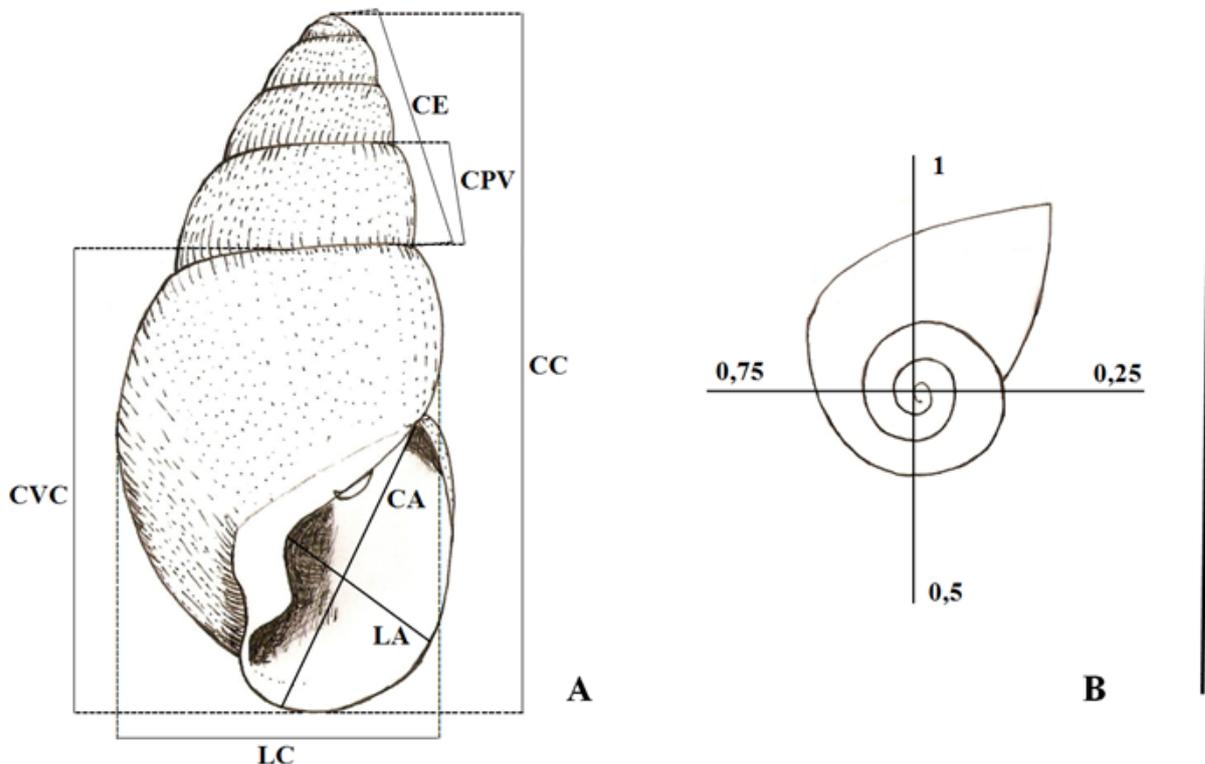
Cada criação-matriz continha moluscos provenientes da mesma localidade, mantidos em caixas plásticas transparentes (14 cm em diâmetro, 9 cm em altura), fechadas com tecido de algodão e elástico. Cada caixa foi preenchida com três centímetros de terra vegetal, umedecida com 10 ml de água a intervalos de dois dias. Os moluscos foram alimentados *ad libitum*, com alimento comercial para aves enriquecido com carbonato de cálcio (na proporção de 3:1) (BESSA & ARAÚJO, 1995 a,b) e mantidos em condições naturais de luz e temperatura. Quando os moluscos trazidos do campo se reproduziram, filhotes recém-nascidos foram retirados das criações-matrizes e transferidos para novos terrários. Cada terrário continha aproximadamente 35 filhotes de moluscos da mesma localidade, os quais foram utilizados no estudo morfológico descrito a seguir.

4.2.4 Conquiliomorfologia

Foi observado o padrão geral da morfologia da concha dos espécimes de *L. unilamellata* utilizados para o estudo conquiliomorfométrico e a variação desse padrão entre os espécimes de cada localidade. As conchas de dois moluscos de cada localidade, com idade de 180 dias, foram observadas e desenhadas sob microscópio estereoscópico Olympus com câmara clara acoplada, e posteriormente depositadas no Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira, da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. Fotografias das conchas foram realizadas utilizando-se máquina digital da marca Sony (Cybershot 8.1 DSC-H3).

4.2.5 Análise conquiliomorfométrica

Foi realizada a análise morfométrica da concha de *L. unilamellata* proveniente das localidades de Juiz de Fora; Cruzília; Belo Horizonte; Barra Mansa e Floriano. Para tanto, as conchas de trinta moluscos de cada localidade, com idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias de vida, foram medidas utilizando-se um paquímetro Kanon (Mardened Stainless 1/28 in 1/20 mm) com 0,01 mm de precisão. Foram tomadas as seguintes medidas lineares: comprimento total da concha (CC), largura total da concha (LC), comprimento da abertura da concha (CA), largura da abertura da concha (LA), comprimento da volta corporal (CVC), comprimento da penúltima volta (CPV) e comprimento da espira (CE) (Figura 2A), além do número de voltas da concha (NV) (Figura 2B). Tais medidas foram estabelecidas seguindo-se a metodologia empregada por CHIU et al. (2002). Com os valores obtidos para cada medida linear foram calculadas as seguintes razões: comprimento total/largura total da concha (CC/LC); comprimento da volta corporal/comprimento da penúltima volta (CVC/CPV); comprimento da volta corporal/largura total da concha (CVC/LC); comprimento da abertura/largura da abertura (CA/LA) e comprimento da espira/comprimento da volta corporal (CE/CVC).



Desenho 3. esquemático da concha de *Leptinaria unilamellata*, com as medidas lineares aferidas (A) e contagem do número de voltas (B). Legenda: comprimento total da concha (CC); largura total da concha (LC); comprimento da abertura da concha (CA); largura da abertura da concha (LA); comprimento da volta corporal (CVC); comprimento da penúltima volta (CPV) e comprimento da espira (CE). Barra de escala: 1 cm.

4.2.6 Análise da variação conquiliomorfológica interpopulacional

Para verificar a existência de variação na morfologia da concha dos moluscos, nas diferentes idades citadas anteriormente, os valores de medidas lineares da concha, e razões calculadas com estas medidas, foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA, $p \leq 0,05$), seguido de teste-t, para identificar entre quais localidades as variáveis apresentaram diferenças significativas nas médias.

Para caracterizar as relações de similaridade entre os padrões morfométricos das conchas dos moluscos de cada localidade, foram calculados os valores da distância Euclidiana e realizada a análise de agrupamentos pelo método de agregação Ward, levando em conta a variância mínima entre os grupos. Para verificar a possível separação de grupos das diferentes localidades em estudo com base nas variáveis aferidas, foi realizada a análise de função discriminante.

Previamente às análises, os valores das medidas lineares da concha, bem como das razões, foram submetidos à transformação logarítmica (\log_{10}) para minimizar os desvios da normalidade nos valores brutos das variáveis.

4.2.7 Análise da Alometria do crescimento

Para descrever o padrão de crescimento da concha, o estudo da alometria do crescimento foi realizado nas diferentes idades para cada localidade, a partir da análise de regressão linear pela equação geral $y = a \cdot x^b$ (sendo “a” igual ao intercepto linear e “b” o coeficiente alométrico) adaptada às relações descritas a seguir:

Relação 1: $LA = a \cdot LC^b$ (Largura da abertura da concha = a . Largura total da concha^b)

Relação 2: $CA = a \cdot LC^b$ (Comprimento da abertura da concha = a . Largura total da concha^b)

Relação 3: $CE = a \cdot LC^b$ (Comprimento da espira = a . Largura total da concha^b)

Relação 4: $CC = a \cdot LC^b$ (Comprimento total da concha = a . Largura total da concha^b)

Relação 5: $CE = a \cdot CC^b$ (Comprimento da espira = a . Comprimento total da concha^b)

Relação 6: $CA = a \cdot CC^b$ (Comprimento da abertura da concha = a . Comprimento total da concha^b)

Previamente às análises, os valores das medidas lineares da concha, foram submetidos à transformação logarítmica (\log_{10}). O coeficiente alométrico, foi utilizado com o objetivo de fornecer a proporção da variabilidade de “y” que pode ser explicada por “x”. O crescimento da concha foi

considerado alométrico positivo quando $b > 1$, alométrico negativo quando $b < 1$ ou isométrico, quando $b = 1$. Para determinar a significância estatística dos valores do coeficiente alométrico (b) foi utilizado o teste-t, com nível de significância de $p \leq 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram aplicadas para cada idade observada, utilizando-se o programa Bioestat 5.0.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Padrão geral da conquiliomorfologia de *Leptinaria unilamellata*

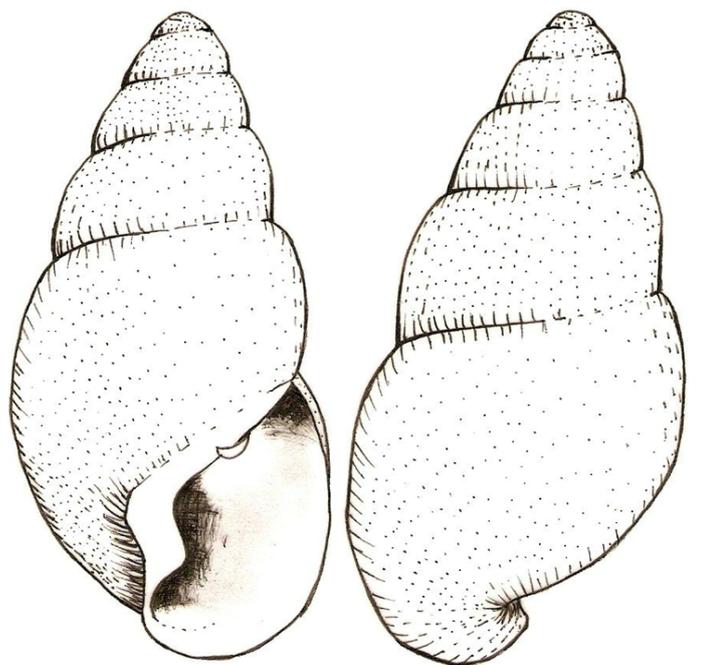
O padrão geral da morfologia da concha dos espécimes estudados, de todas as localidades, pode ser caracterizado como: concha de forma cônica, com perióstraco amarelado lustroso, semi-translúcida, abertura arredondada a oval com perístoma cortante, bordo columelar podendo ser levemente refletido, umbilicada, columela truncada contendo uma prega columelar quadrada ou triangular projetando-se ao interior da abertura, bordo parietal pode conter ou não uma lamela lisa, fina, triangular, transversal em relação à abertura, que se continua ao interior da abertura da concha com término entre o início da prega columelar e inserção da última volta, pode ser baixa ou proeminente. Protoconcha lisa, concha apresentado finas estrias longitudinais contínuas e próximas entre si. Número de voltas no molusco adulto variando de 5 a 6, volta corporal ampla correspondendo à maior parte do comprimento da concha. A espira é proeminente ou baixa. As suturas são bem marcadas, levemente inclinadas e podem ser profundas ou suaves. A distância entre as suturas varia, maiores distâncias correspondem a um maior comprimento da espira.

4.3.2 Conquiliomorfologia de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano

4.3.2.1 *Leptinaria unilamellata* proveniente da localidade de Juiz de Fora

O padrão da morfologia da concha dos espécimes da localidade de Juiz de Fora, MG pode ser descrito como uma concha cônica, com perióstraco amarelado, abertura da concha arredondada, perístoma cortante, bordo columelar levemente refletido levando a formação de um umbílico, columela truncada quadrangular, bordo parietal podendo apresentar ou não uma lamela baixa. Protoconcha lisa, as demais voltas da concha apresentam finas estrias longitudinais contínuas e próximas entre si, número de voltas no molusco adulto variando de 5 a 6. A volta corporal é ampla,

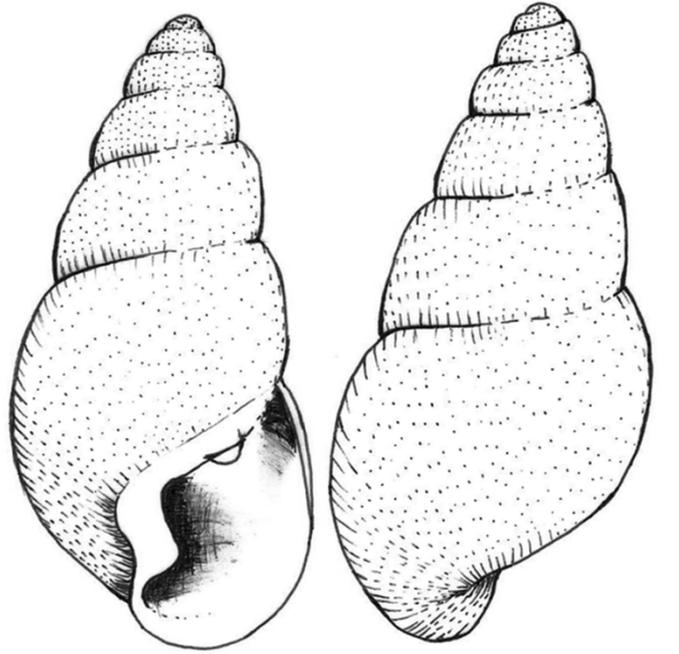
arredondada e corresponde à maior parte do comprimento da concha. As demais voltas da concha diminuem gradativamente em comprimento e são também arredondadas, entretanto, possuem um menor comprimento do que a volta corporal. A espira pode ser proeminente ou baixa, geralmente tendendo a ser mais baixa. As duas primeiras suturas são profundas, sendo as demais suturas da espira bem marcadas, mas não muito profundas e levemente inclinadas. A distância entre as suturas diminui gradualmente até a protoconcha (Figura 3).



Desenho 4. Concha do morfotipo de Juiz de Fora, MG. Barra corresponde a 1 cm.

4.3.2.2 *Leptinaria unilamellata* proveniente da localidade de Cruzília

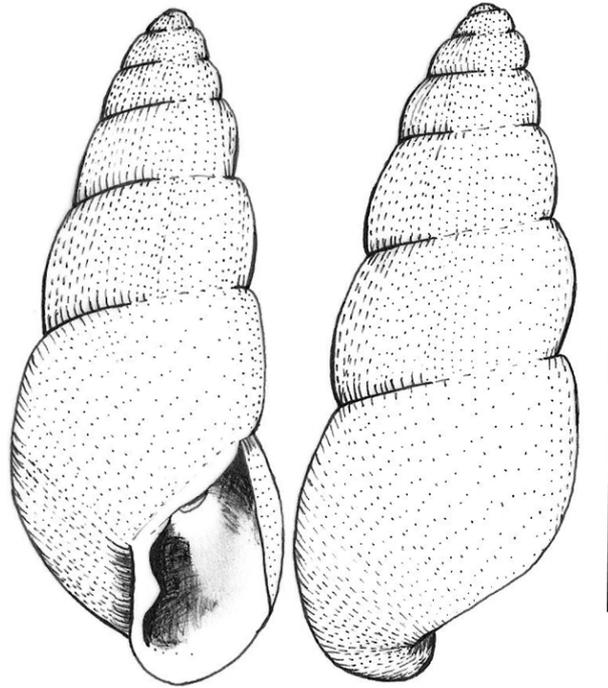
O padrão da morfologia da concha dos espécimes da localidade de Cruzília, MG, pode ser descrito como uma concha cônica, com perióstraco amarelado, abertura da concha ampla, arredondada e deslocada lateralmente do eixo central da concha, conferindo-lhe uma ampla volta corporal arredondada, perístoma cortante, com bordo columelar refletido com início próximo à base da concha, presença de umbílico, columela truncada triangular, o bordo parietal apresenta uma lamela proeminente bem desenvolvida. A protoconcha é lisa sem ornamentação, entretanto, nas demais voltas as estrias longitudinais são ligeiramente marcadas, contínuas e próximas entre si, o número de voltas no molusco adulto varia de 5 a 6. A volta corporal é ampla e arredondada, devido à grande amplitude da abertura corporal, e corresponde à maior parte do comprimento da concha, a espira em geral é baixa. Todas as suturas são bastante profundas, o que permite que as voltas da concha sejam bastante arredondadas. A penúltima volta possui comprimento maior do que as demais voltas da espira, que diminuem em comprimento gradativamente (Figura 4).



Desenho 5. Concha do morfotipo de Cruzília, MG. Barra corresponde a 1cm.

4.3.2.3 *Leptinaria unilamellata* proveniente da localidade de Floriano

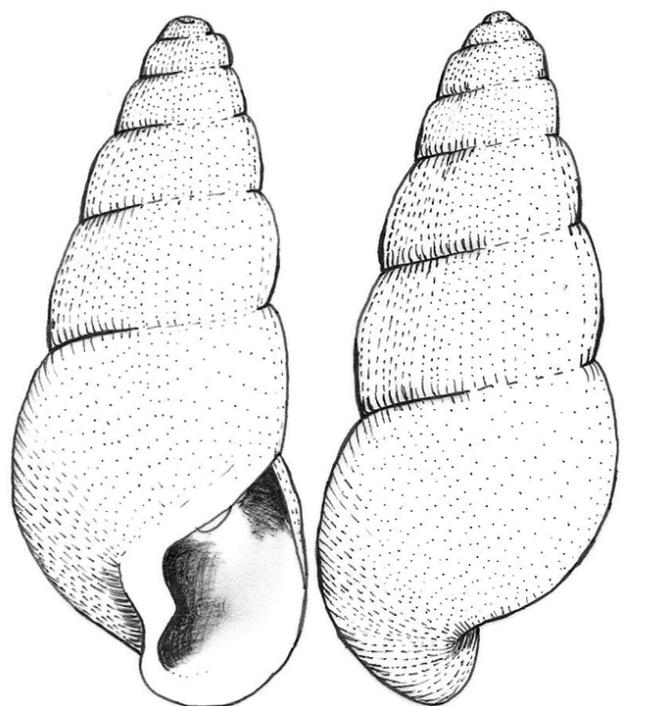
O padrão da morfologia da concha dos espécimes da localidade de Floriano, RJ, pode ser descrito como uma concha cônica, alongada, com base quadrangular, de perióstraco amarelado. A abertura da concha é ampla e ovalada, com perístoma cortante, bordo columelar levemente refletido levando a formação de um umbílico não muito profundo, columela truncada e triangular. O bordo parietal apresenta uma lamela suave. A protoconcha é lisa e as demais voltas da concha apresentam finas estrias longitudinais contínuas e próximas entre si, número de voltas no molusco adulto variando de 5 a 6. A volta corporal é arredondada, entretanto, não se destaca em relação às demais voltas. As voltas da espira são arredondadas. As suturas são suaves, com exceção da primeira, que é pouco profunda. A penúltima e antepenúltima volta são maiores em comprimento do que as outras voltas restantes da espira, sendo que nestas, o comprimento diminui gradativamente (Figura 5).



Desenho 6. Concha do morfotipo de Floriano, RJ. Barra corresponde a 1 cm.

4.3.2.4 *Leptinaria unilamellata* proveniente da localidade de Barra Mansa

O padrão da morfologia da concha dos espécimes da localidade de Barra Mansa, RJ, pode ser descrito como uma concha de forma cônica alongada, com perióstraco amarelado, com volta corporal arredondada, porém pouco globosa, ou seja, a largura da volta corporal não se destaca em relação à largura da espira, provavelmente isso se deve às suturas suaves e a diminuição gradativa no comprimento das voltas da concha. Refletindo este padrão no comprimento das voltas da concha, a espira apresenta-se proeminente. Apesar da volta corporal corresponder a maior parte do comprimento da concha, o comprimento da espira destaca-se. O padrão suave de marcação das suturas torna as demais voltas da concha pouco arredondadas. A abertura da concha é ovalada e estreita, com perístoma cortante, bordo columelar levemente refletido, com umbílico pouco profundo, columela truncada triangular, o bordo parietal apresenta uma lamela suave. Protoconcha lisa, as demais voltas corporais apresentam suaves estrias finas, longitudinais e contínuas, próximas entre si, o número de voltas varia de 5 a 6 (Figura 6).



Desenho 7. Concha do morfotipo de Barra Mansa, RJ. Barra corresponde a 1 cm.

4.3.3 Conquiliomorfometria e variação morfológica interpopulacional

As medidas lineares e razões entre variáveis tomadas das conchas de *L. unilamellata*, das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano estão descritas nas tabelas 1 e 2 e figura 7. Foi possível distinguir conquiliomorfometrias características para os moluscos de cada uma das quatro localidades. O teste ANOVA demonstrou que todas as variáveis utilizadas apresentam valores significativamente diferentes entre os moluscos das quatro localidades nas idades observadas (Tabela 3). A relação entre as variáveis e as diferenças entre os valores das medidas lineares das conchas dos diferentes morfotipos variaram durante o desenvolvimento dos moluscos, em função de diferenças nos padrões de crescimento. Portanto, para a distinção entre os quatro morfotipos, foram considerados apenas os valores observados na idade de 180 dias, quando o crescimento dos moluscos estabilizou.

Os valores médios do comprimento total da concha, comprimento da abertura da concha e comprimento da volta corporal foram significativamente diferentes para os moluscos de todas as localidades e estas, portanto, são as variáveis com maior robustez para a distinção dos morfotipos observados (Tabela 1).

As conchas dos moluscos provenientes das localidades de Barra Mansa e Floriano apresentaram morfometria mais próxima (Tabelas 4-11). Não foi possível distinguir estes

morfotipos pela largura total da concha, largura da abertura da concha, comprimento da penúltima volta e comprimento da espira. Entretanto, os valores médios do comprimento total da concha, comprimento da abertura da concha e comprimento da volta corporal foram significativamente mais altos para o morfotipo de Barra Mansa, enquanto as conchas do morfotipo de Floriano apresentaram maior número de voltas. As diferenças entre essas medidas lineares se refletiram em diferenças significativas entre todas as razões calculadas para os dois morfotipos (Tabela 12). As conchas do morfotipo de Barra Mansa apresentaram valores mais altos para as razões entre o comprimento total da concha e a largura total da concha, comprimento da abertura e largura da abertura, comprimento da volta corporal e comprimento da penúltima volta e entre o comprimento da volta corporal e largura da concha. A relação entre as medidas lineares, expressa por essas razões, reflete-se na forma mais alongada das conchas do morfotipo de Barra Mansa, quando comparado ao morfotipo de Floriano. Os maiores valores para as razões entre o comprimento da volta corporal e o comprimento da penúltima volta e entre o comprimento da volta corporal e a largura máxima da concha, refletem-se na volta corporal menos globosa das conchas da localidade de Barra Mansa.

As conchas dos moluscos da localidade de Juiz de Fora apresentaram semelhança com os morfotipos de Barra Mansa e Floriano apenas no comprimento da penúltima volta (Tabela 9). Entretanto, o morfotipo de Juiz de Fora apresentou maior número de voltas da concha. Dessa forma, pode-se concluir que as voltas anteriores à penúltima volta da concha do morfotipo de Juiz de Fora são proporcionalmente menores e a diminuição do comprimento de uma volta para a outra, em direção à protoconcha é mais expressiva, quando comparada aos morfotipos de Barra Mansa e Floriano. Além disso, o comprimento da volta corporal do morfotipo de Juiz de Fora é significativamente maior, quando comparado aos morfotipos de Barra Mansa e Floriano. A razão entre o comprimento da espira e o comprimento da volta corporal da concha do morfotipo de Juiz de Fora é próxima de 1:2, enquanto para os morfotipos de Floriano e Barra Mansa, esta razão é próxima de 1: 1.5. O resultado da relação entre essas variáveis é uma concha mais alongada, característica dos morfotipos de Barra Mansa e Floriano, que apresenta diminuição mais gradual do comprimento das voltas em direção à protoconcha, e uma concha mais abaulada, característica do morfotipo de Juiz de Fora. A forma abaulada da concha também é o reflexo da maior largura da concha apresentada pelo morfotipo de Juiz de Fora, que se reflete em uma razão entre o comprimento e a largura total da concha significativamente menor, quando comparada às razões observadas para os morfotipos de Floriano e Barra Mansa. Como consequência, a volta corporal apresenta-se ampla e globosa, com uma sutura profunda entre a penúltima volta e a volta corporal.

Os valores médios de todas as variáveis consideradas foram significativamente diferentes entre os morfotipos de Cruzília e Barra Mansa (Tabelas 4-11). As conchas dos moluscos da localidade de Cruzília apresentaram semelhança com as conchas dos moluscos da localidade de Juiz de Fora e de Floriano apenas no comprimento da espira e número de voltas da concha, respectivamente (Tabela 10 e Tabela 11). Sendo que os valores médios das demais variáveis do morfotipo de Cruzília foram mais próximos dos valores do morfotipo de Juiz de Fora do que os valores dos morfotipos de Barra Mansa e Floriano. As conchas do morfotipo de Cruzília apresentaram comprimento da volta corporal significativamente mais alto do que o observado pelos morfotipos das demais localidades. Por isso, apesar do comprimento da espira semelhante ao apresentado pelo morfotipo de Juiz de Fora, as conchas dos moluscos de Cruzília apresentaram a razão entre o comprimento da espira e o comprimento da volta corporal da concha próxima a 1:1.5, semelhante ao observado para os morfotipos de Barra Mansa e Floriano. Além disso, as conchas da localidade de Cruzília apresentaram menor número de voltas do que as conchas da localidade de Juiz de Fora. Dessa forma, pode-se concluir que o comprimento das voltas anteriores à penúltima volta das conchas do morfotipo de Cruzília são proporcionalmente maiores, quando comparadas às do morfotipo de Juiz de Fora e, portanto, apresentam diminuição mais gradual do comprimento em direção à protoconcha. Apesar disso, as conchas do morfotipo de Cruzília não são tão alongadas quanto as conchas das localidades de Barra Mansa e Floriano, porque apresentam a largura máxima da concha significativamente maior, o que se reflete na menor razão entre o comprimento e a largura total da concha e resulta em uma concha abaulada, com volta corporal ampla e globosa e sutura profunda entre a penúltima volta e a volta corporal.

As relações apresentadas demonstram que a forma abaulada das conchas dos morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília e a forma alongada das conchas dos morfotipos de Barra Mansa e Floriano devem-se às dimensões da volta corporal, expressa pela razão entre o comprimento da volta corporal e largura máxima da concha e às proporções relativas da volta corporal e espira, expressa pelas razões entre o comprimento e largura total da concha e pela razão entre o comprimento da espira e o comprimento da volta corporal. A forma abaulada das conchas dos morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília deve-se às maiores dimensões da volta corporal e às proporções relativas da volta corporal e espira. As conchas desses morfotipos apresentam a abertura da concha arredondada, como consequência da relação entre o comprimento e a largura da abertura da concha, que é mais próxima de 1:1. Nos morfotipos de Barra Mansa e Floriano observa-se que a forma da abertura ovalada acompanha a tendência alongada da concha, e, portanto, os valores da razão entre o

comprimento e a largura da concha são maiores do que aqueles observados para os morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília.

Tabela 3. Média, desvio padrão e amplitude (mínimo e máximo) das medidas lineares aferidas de indivíduos de diferentes idades de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ (medidas em centímetros).

	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
<i>Leptinaria unilamellata</i> da localidade de Juiz de Fora, MG						
CC	0.44 ± 0.04 (0.38 - 0.51)	0.67 ± 0.05 (0.58 - 0.78)	1.24 ± 0.10 (1.02 - 1.48)	1.34 ± 0.15 (1.13 - 1.6)	1.35 ± 0.16 (1.08 - 1.67)	1.33 ± 0.13 (1.16 - 1.58)
LC	0.28 ± 0.02 (0.23 - 0.34)	0.38 ± 0.02 (0.34 - 0.42)	0.58 ± 0.03 (0.52 - 0.64)	0.61 ± 0.06 (0.5 - 0.72)	0.62 ± 0.07 (0.5 - 0.76)	0.63 ± 0.06 (0.5 - 0.74)
CA	0.21 ± 0.03 (0.15 - 0.27)	0.33 ± 0.03 (0.27 - 0.39)	0.44 ± 0.03 (0.5 - 0.38)	0.53 ± 0.06 (0.45 - 0.71)	0.53 ± 0.07 (0.4 - 0.66)	0.52 ± 0.05 (0.4 - 0.6)
LA	0.13 ± 0.02 (0.09 - 0.16)	0.18 ± 0.02 (0.14 - 0.22)	0.27 ± 0.02 (0.22 - 0.31)	0.29 ± 0.03 (0.22 - 0.35)	0.32 ± 0.04 (0.24 - 0.39)	0.34 ± 0.06 (0.22 - 0.44)
CVC	0.35 ± 0.03 (0.4 - 0.29)	0.51 ± 0.03 (0.46 - 0.59)	0.77 ± 0.04 (0.67 - 0.86)	0.79 ± 0.07 (0.64 - 0.91)	0.79 ± 0.07 (0.7 - 0.93)	0.8 ± 0.06 (0.68 - 0.93)
CPV	0.10 ± 0.01 (0.07 - 0.11)	0.14 ± 0.02 (0.12 - 0.19)	0.26 ± 0.02 (0.32 - 0.19)	0.28 ± 0.03 (0.23 - 0.33)	0.31 ± 0.04 (0.25 - 0.4)	0.29 ± 0.03 (0.24 - 0.34)
CE	0.12 ± 0.02 (0.08 - 0.16)	0.20 ± 0.02 (0.16 - 0.26)	0.50 ± 0.05 (0.41 - 0.61)	0.55 ± 0.07 (0.44 - 0.68)	0.57 ± 0.08 (0.44 - 0.71)	0.57 ± 0.08 (0.43 - 0.73)
NV	3.34 ± 0.22 (2.75 - 3.75)	3.98 ± 0.34 (3.5 - 5)	5.14 ± 0.31 (4.5 - 5.75)	5.5 ± 0.35 (5 - 6.5)	5.81 ± 0.47 (5 - 6.5)	5.68 ± 0.45 (5 - 6.75)
<i>Leptinaria unilamellata</i> da localidade de Cruzília, MG						
CC	0.33 ± 0.03 (0.28 - 0.44)	0.97 ± 0.12 (0.68 - 1.22)	1.32 ± 0.18 (0.89 - 1.57)	1.18 ± 0.07 (1.05 - 1.34)	1.54 ± 0.15 (1.29 - 1.8)	1.49 ± 0.08 (1.3 - 1.66)
LC	0.22 ± 0.02 (0.18 - 0.27)	0.5 ± 0.05 (0.4 - 0.6)	0.63 ± 0.07 (0.47 - 0.72)	0.56 ± 0.04 (0.47 - 0.65)	0.73 ± 0.06 (0.61 - 0.84)	0.67 ± 0.06 (0.53 - 0.78)
CA	0.18 ± 0.03 (0.12 - 0.25)	0.44 ± 0.05 (0.32 - 0.51)	0.54 ± 0.07 (0.36 - 0.68)	0.48 ± 0.03 (0.43 - 0.58)	0.58 ± 0.06 (0.47 - 0.7)	0.58 ± 0.07 (0.4 - 0.74)
LA	0.11 ± 0.02 (0.06 - 0.14)	0.22 ± 0.03 (0.14 - 0.28)	0.28 ± 0.04 (0.21 - 0.38)	0.25 ± 0.03 (0.16 - 0.33)	0.36 ± 0.04 (0.28 - 0.44)	0.42 ± 0.05 (0.3 - 0.51)
CVC	0.27 ± 0.03 (0.23 - 0.39)	0.69 ± 0.06 (0.55 - 0.8)	0.86 ± 0.1 (0.63 - 0.99)	0.78 ± 0.04 (0.7 - 0.87)	0.95 ± 0.1 (0.57 - 1.1)	0.87 ± 0.14 (0.43 - 1.04)
CPV	0.07 ± 0.01 (0.06 - 0.08)	0.25 ± 0.03 (0.2 - 0.34)	0.32 ± 0.05 (0.21 - 0.39)	0.28 ± 0.02 (0.24 - 0.32)	0.36 ± 0.05 (0.29 - 0.45)	0.37 ± 0.11 (0.29 - 0.88)
CE	0.08 ± 0.01 (0.05 - 0.1)	0.33 ± 0.05 (0.25 - 0.46)	0.48 ± 0.08 (0.31 - 0.59)	0.41 ± 0.03 (0.36 - 0.47)	0.6 ± 0.13 (0.44 - 1.13)	0.57 ± 0.04 (0.5 - 0.65)
NV	3.06 ± 0.12 (3 - 3.5)	4.25 ± 0.38 (3.5 - 5.25)	5.08 ± 0.43 (4 - 5.75)	4.93 ± 0.22 (4.5 - 5.25)	5.68 ± 0.3 (5.25 - 6.25)	5.5 ± 0.29 (5.5 - 6)

Tabela 3 (continuação).

	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
<i>Leptinaria unilamellata</i> da localidade de Barra Mansa, RJ						
CC	0.41 ± 0.02 (0.36 - 0.46)	1.04 ± 0.05 (0.91 - 1.19)	1.12 ± 0.04 (1.05 - 1.28)	1.21 ± 0.07 (1.08 - 1.34)	1.25 ± 0.04 (1.17 - 1.33)	1.19 ± 0.05 (1.1 - 1.31)
LC	0.25 ± 0.01 (0.23 - 0.27)	0.48 ± 0.02 (0.44 - 0.53)	0.49 ± 0.02 (0.46 - 0.53)	0.51 ± 0.02 (0.45 - 0.54)	0.54 ± 0.02 (0.5 - 0.6)	0.52 ± 0.02 (0.45 - 0.56)
CA	0.18 ± 0.02 (0.23 - 0.14)	0.41 ± 0.03 (0.34 - 0.51)	0.39 ± 0.03 (0.34 - 0.47)	0.41 ± 0.03 (0.36 - 0.55)	0.44 ± 0.04 (0.38 - 0.51)	0.44 ± 0.03 (0.37 - 0.53)
LA	0.12 ± 0.02 (0.9 - 1.4)	0.25 ± 0.05 (0.16 - 0.38)	0.25 ± 0.01 (0.22 - 0.29)	0.26 ± 0.02 (0.22 - 0.29)	0.30 ± 0.3 (0.24 - 0.37)	0.29 ± 0.04 (0.21 - 0.4)
CVC	0.31 ± 0.02 (0.27 - 0.35)	0.68 ± 0.04 (0.6 - 0.74)	0.72 ± 0.02 (0.68 - 0.78)	0.74 ± 0.03 (0.67 - 0.79)	0.73 ± 0.04 (0.55 - 0.78)	0.73 ± 0.02 (0.66 - 0.76)
CPV	0.09 ± 0.01 (0.07 - 0.11)	0.27 ± 0.03 (0.2 - 0.33)	0.25 ± 0.02 (0.21 - 0.3)	0.27 ± 0.02 (0.23 - 0.31)	0.28 ± 0.02 (0.24 - 0.3)	0.28 ± 0.03 (0.21 - 0.33)
CE	0.12 ± 0.01 (0.1 - 0.14)	0.41 ± 0.03 (0.36 - 0.52)	0.43 ± 0.03 (0.38 - 0.54)	0.47 ± 0.04 (0.4 - 0.57)	0.51 ± 0.03 (0.47 - 0.58)	0.48 ± 0.05 (0.4 - 0.6)
NV	3.45 ± 0.22 (2.75 - 3.75)	4.9 ± 0.24 (4.5 - 5.75)	5.78 ± 0.27 (5.25 - 6.25)	5.87 ± 0.27 (5 - 6.25)	5.44 ± 0.30 (5 - 6)	5.18 ± 0.30 (4.5 - 6)
<i>Leptinaria unilamellata</i> da localidade de Floriano, RJ						
CC	0.4 ± 0.03 (0.35 - 0.45)	0.61 ± 0.07 (0.47 - 0.72)	1.05 ± 0.05 (0.95 - 1.16)	1.09 ± 0.03 (1.02 - 1.16)	1.13 ± 0.05 (1.05 - 1.28)	1.14 ± 0.06 (1.02 - 1.23)
LC	0.24 ± 0.01 (0.22 - 0.27)	0.25 ± 0.02 (0.2 - 0.29)	0.48 ± 0.03 (0.38 - 0.54)	0.48 ± 0.02 (0.44 - 0.53)	0.5 ± 0.02 (0.44 - 0.55)	0.5 ± 0.02 (0.46 - 0.54)
CA	0.17 ± 0.02 (0.13 - 0.21)	0.33 ± 0.03 (0.28 - 0.41)	0.4 ± 0.05 (0.29 - 0.5)	0.41 ± 0.04 (0.28 - 0.48)	0.4 ± 0.04 (0.3 - 0.47)	0.41 ± 0.02 (0.36 - 0.47)
LA	0.11 ± 0.02 (0.08 - 0.16)	0.15 ± 0.02 (0.11 - 0.18)	0.22 ± 0.03 (0.16 - 0.3)	0.24 ± 0.03 (0.2 - 0.3)	0.28 ± 0.03 (0.22 - 0.36)	0.27 ± 0.03 (0.23 - 0.34)
CVC	0.3 ± 0.02 (0.27 - 0.33)	0.42 ± 0.04 (0.36 - 0.52)	0.66 ± 0.05 (0.56 - 0.77)	0.65 ± 0.03 (0.54 - 0.69)	0.68 ± 0.03 (0.59 - 0.76)	0.68 ± 0.03 (0.64 - 0.76)
CPV	0.08 ± 0.01 (0.06 - 0.09)	0.14 ± 0.02 (0.09 - 0.18)	0.29 ± 0.03 (0.24 - 0.38)	0.28 ± 0.02 (0.23 - 0.33)	0.27 ± 0.02 (0.22 - 0.31)	0.28 ± 0.02 (0.24 - 0.33)
CE	0.11 ± 0.01 (0.09 - 0.15)	0.2 ± 0.03 (0.13 - 0.25)	0.41 ± 0.03 (0.3 - 0.47)	0.45 ± 0.03 (0.36 - 0.57)	0.46 ± 0.02 (0.41 - 0.51)	0.47 ± 0.03 (0.4 - 0.54)
NV	3.4 ± 0.22 (3 - 4)	4.4 ± 0.38 (3.9 - 5.15)	5.03 ± 0.35 (4.25 - 6.25)	5.14 ± 0.18 (4.75 - 5.5)	5.29 ± 0.19 (5 - 5.75)	5.41 ± 0.26 (5 - 6)

Legenda: CC – comprimento máximo da concha; LC – largura máxima da concha; CA – Comprimento da abertura da concha; LA – largura da abertura da concha; CVC – comprimento da volta corporal; CPV – comprimento da primeira volta; CE – comprimento da espira.

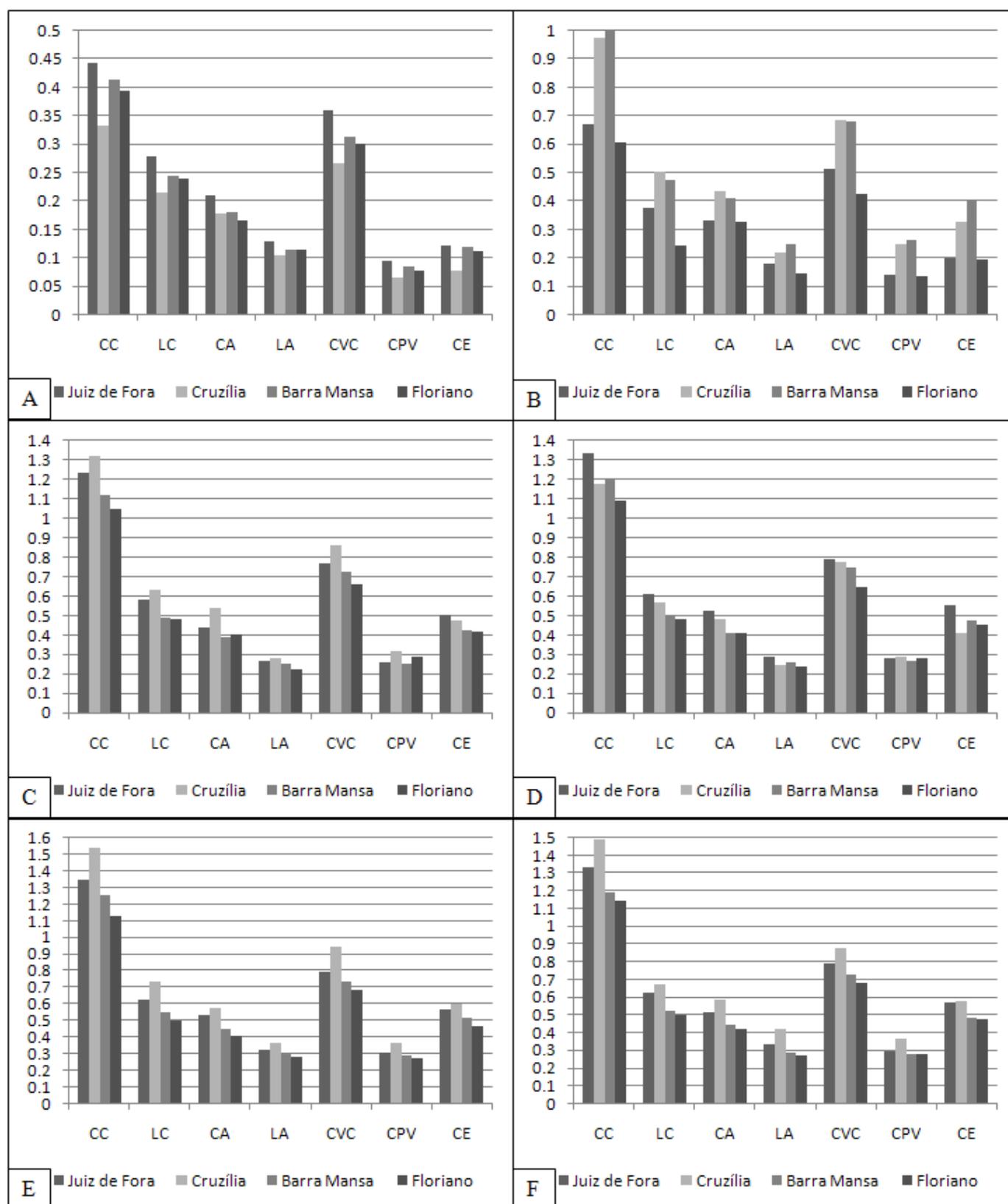


Gráfico 4. Valores médios das medidas da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, na idade de 30 dias (A), 60 dias (B), 90 dias (C), 120 dias (D), 150 dias (E) e 180 dias (F). CC – comprimento total da concha; LC – largura total da concha; CA – Comprimento da abertura da concha; LA – largura da abertura da concha; CVC – comprimento da volta corporal; CPV – comprimento da primeira volta; CE – comprimento da espira.

Tabela 4. Média, desvio padrão e amplitude (mínimo e máximo) das razões entre medidas lineares da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ (medidas em centímetros).

	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
<i>Leptinaria unilamellata</i> da localidade de Juiz de Fora, MG						
CC/LC	1.58 ± 0.08 (1.41 - 1.75)	1.77 ± 0.07 (1.64 - 1.91)	2.13 ± 0.11 (1.95 - 2.43)	2.18 ± 0.09 (1.98 - 2.38)	2.15 ± 0.12 (1.89 - 2.49)	2.14 ± 0.12 (1.8 - 2.49)
CVC/CPV	3.74 ± 0.43 (3 - 4.71)	3.65 ± 0.29 (3.11 - 4.33)	3 ± 0.22 (2.54 - 3.53)	2.84 ± 0.29 (2.24 - 3.6)	2.60 ± 0.25 (2.13 - 3.12)	2.74 ± 0.27 (1.18 - 3.32)
CVC/LC	1.25 ± 0.06 (1.15 - 1.38)	1.36 ± 0.06 (1.24 - 1.59)	1.3 ± 0.04 (1.23 - 1.41)	1.29 ± 0.04 (1.21 - 1.4)	1.27 ± 0.06 (1.18 - 1.43)	1.27 ± 0.06 (1.18 - 1.45)
CA/LA	1.70 ± 0.22 (1.36 - 2.22)	1.85 ± 0.18 (1.64 - 2.64)	0.77 ± 0.04 (0.67 - 0.86)	1.83 ± 0.23 (1.34 - 2.32)	1.67 ± 0.24 (1.29 - 2.22)	1.57 ± 0.21 (1.19 - 2.27)
CE/CVC	0.35 ± 0.04 (0.26 - 0.4)	0.39 ± 0.03 (0.34 - 0.45)	0.66 ± 0.50 (0.54 - 0.77)	0.70 ± 0.05 (0.59 - 0.81)	0.71 ± 0.05 (0.63 - 0.84)	0.71 ± 0.07 (0.56 - 0.91)
<i>Leptinaria unilamellata</i> da localidade de Cruzília, MG						
CC/LC	1.55 ± 0.09 (1.44 - 1.91)	1.93 ± 0.11 (1.58 - 2.35)	2.09 ± 0.09 (1.83 - 2.22)	2.09 ± 0.11 (1.97 - 2.43)	2.10 ± 0.08 (1.94 - 2.27)	2.16 ± 0.17 (2.05 - 2.75)
CVC/CPV	3.99 ± 0.57 (3.13 - 5.57)	2.76 ± 0.25 (2.35 - 3.26)	2.75 ± 0.39 (1.8 - 4.05)	2.76 ± 0.20 (2.42 - 3.27)	2.66 ± 0.30 (1.39 - 3.13)	2.51 ± 0.57 (0.75 - 2.97)
CVC/LC	1.23 ± 0.11 (1.10 - 1.70)	1.36 ± 0.05 (1.22 - 1.54)	1.37 ± 0.07 (1.40 - 1.45)	1.38 ± 0.06 (1.29 - 1.60)	1.29 ± 0.12 (0.71 - 1.40)	1.31 ± 0.24 (0.61 - 1.74)
CA/LA	1.70 ± 0.22 (1.21 - 2.27)	1.99 ± 0.20 (1.70 - 2.59)	1.95 ± 0.33 (1.42 - 2.87)	1.99 ± 0.31 (1.45 - 2.83)	1.61 ± 0.22 (1.23 - 2.14)	1.41 ± 0.22 (0.95 - 2.13)
CE/CVC	0.30 ± 0.04 (0.19 - 0.37)	0.48 ± 0.04 (0.34 - 0.58)	0.55 ± 0.05 (0.46 - 0.68)	0.53 ± 0.03 (0.49 - 0.60)	0.64 ± 0.15 (0.5 - 1.28)	0.69 ± 0.20 (0.55 - 1.40)
<i>Leptinaria unilamellata</i> da localidade de Barra Mansa, RJ						
CC/LC	1.69 ± 0.10 (1.56 - 2)	2.18 ± 0.10 (1.89 - 2.41)	2.28 ± 0.07 (2.19 - 2.51)	2.39 ± 0.09 (2.22 - 2.59)	2.30 ± 0.09 (2.17 - 2.56)	2.3 ± 0.13 (2.07 - 2.8)
CVC/CPV	3.69 ± 0.3 (3.1 - 4.57)	2.59 ± 0.3 (2 - 3.3)	2.88 ± 0.18 (2.43 - 3.29)	2.79 ± 0.13 (2.55 - 3.04)	2.59 ± 0.2 (2.04 - 3.08)	2.66 ± 0.3 (2.12 - 3.62)
CVC/LC	1.27 ± 0.05 (1.17 - 1.39)	1.43 ± 0.09 (1.25 - 1.68)	1.48 ± 0.05 (1.37 - 1.61)	1.47 ± 0.04 (1.40 - 1.58)	1.35 ± 0.08 (1.02 - 1.5)	1.4 ± 0.07 (1.22 - 1.62)
CA/LA	1.59 ± 0.23 (1.23 - 2.11)	1.70 ± 0.36 (1.08 - 2.68)	1.55 ± 0.14 (1.31 - 2.04)	1.58 ± 0.12 (1.38 - 1.9)	1.52 ± 0.21 (1.15 - 1.92)	1.58 ± 0.3 (1 - 2.52)
CE/CVC	0.39 ± 0.03 (0.33 - 0.45)	0.60 ± 0.06 (0.49 - 0.74)	0.59 ± 0.03 (0.69 - 0.54)	0.64 ± 0.05 (0.53 - 0.72)	0.70 ± 0.07 (0.63 - 1.05)	0.67 ± 0.06 (0.57 - 0.81)
<i>Leptinaria unilamellata</i> da localidade de Floriano, RJ						
CC/LC	1.64 ± 0.11 (1.42 - 2.05)	2.46 ± 0.16 (2.14 - 2.76)	2.19 ± 0.14 (1.9 - 2.58)	2.27 ± 0.08 (2.11 - 2.46)	2.28 ± 0.10 (2.07 - 2.47)	2.28 ± 0.10 (2.12 - 2.51)
CVC/CPV	3.85 ± 0.40 (3.11 - 4.57)	3.19 ± 0.48 (2.17 - 4.67)	2.33 ± 0.30 (1.66 - 2.96)	2.37 ± 0.24 (1.8 - 2.83)	2.58 ± 0.26 (2.16 - 3.23)	2.48 ± 0.20 (2.03 - 2.92)
CVC/LC	1.25 ± 0.06 (1.08 - 1.36)	1.72 ± 0.17 (1.39 - 2.05)	1.38 ± 0.13 (1.12 - 1.71)	1.35 ± 0.09 (1.08 - 1.53)	1.38 ± 0.08 (1.18 - 1.56)	1.36 ± 0.07 (1.28 - 1.65)
CA/LA	1.47 ± 0.18 (1.18 - 2)	2.25 ± 0.27 (1.83 - 3.15)	1.84 ± 0.35 (1.21 - 2.73)	1.74 ± 0.27 (1.27 - 2.4)	1.47 ± 0.22 (1.07 - 1.96)	1.54 ± 0.18 (1.16 - 1.88)
CE/CVC	0.37 ± 0.04 (0.3 - 0.48)	0.47 ± 0.08 (0.34 - 0.64)	0.63 ± 0.06 (0.49 - 0.79)	0.70 ± 0.06 (0.56 - 0.88)	0.68 ± 0.05 (0.57 - 0.78)	0.69 ± 0.04 (0.61 - 0.78)

Legendas: CC/LC – Razão entre o comprimento total e a largura total da concha; CA/LA – Razão entre o comprimento e a largura da abertura da concha; CVC/CPV – Razão entre o comprimento da volta corporal e o comprimento da penúltima volta; CVC/LC – Razão entre o comprimento da volta corporal e a largura total da concha.

Tabela 5. Resultado da análise de variância (ANOVA) para as variáveis da conquiomorfometria de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

Resultado ANOVA

Conquiomorfometria

	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
CC	68.55	0.0001*	216.9	0.0001*	37.47	0.0001*	39.84	0.0001*	69.64	0.0001*	96.36	0.0001*
LC	71.29	0.0001*	395.34	0.0001*	91.69	0.0001*	71.26	0.0001*	142.31	0.0001*	104.87	0.0001*
CA	18.03	0.0001*	68.67	0.0001*	62.82	0.0001*	49.25	0.0001*	67.29	0.0001*	80.30	0.0001*
LA	6.22	0.0009*	63.15	0.0001*	22.16	0.0001*	17.04	0.0001*	28.70	0.0001*	56.14	0.0001*
CVC	53.59	0.0001*	231.51	0.0001*	52.52	0.0001*	50.83	0.0001*	79.55	0.0001*	32.67	0.0001*
CPV	42.66	0.0001*	217.76	0.0001*	27.05	0.0001*	39.84	0.0001*	42.88	0.0001*	15.82	0.0001*
CE	55.83	0.0001*	221.02	0.0001*	20.05	0.0001*	42.95	0.0001*	17.43	0.0001*	29.22	0.0001*
NV	23.83	0.0001*	37.72	0.0001*	60.27	0.0001*	69.95	0.0001*	13.65	0.0001*	11.78	0.0001*

Legenda: CC – comprimento total da concha; LC – largura total da concha; CA – Comprimento da abertura da concha; LA – largura da abertura da concha; CVC – comprimento da volta corporal; CPV – comprimento da primeira volta; CE – comprimento da espira. *: diferença significativa entre as médias.

Tabela 6. Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento total da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

Resultado teste-t

Comprimento total da concha

	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
JF X CR	13.83	0.001*	14.71	0.001*	2.98	0.0034*	6.99	0.001*	6.55	0.001*	6.95	0.001*
JF X BM	3.63	0.001*	17.86	0.001*	4.20	0.001*	5.77	0.001*	3.18	0.0019	6.38	0.001*
JF X FLO	6.03	0.001*	2.97	0.0036*	6.74	0.001*	10.77	0.001*	7.47	0.001*	8.42	0.001*
CR X BM	10.20	0.001*	3.15	0.0021*	7.19	0.001*	ns	ns	9.55	0.001*	13.33	0.001*
CR X FLO	7.8	0.001*	17.69	0.001*	9.73	0.001*	3.79	0.001*	14.02	0.001*	15.38	0.001*
BM X FLO	2.40	0.0178*	ns	ns	2.54	0.0123*	5.01	0.001*	4.09	0.001*	2.05	0.0428*

Legenda: JF-moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR-moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM-moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO-moluscos da localidade de Floriano. *: diferença significativa entre as médias. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

Tabela 7. Resultado do test-t para os dados pareados da largura total da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	Resultado teste-t											
	Largura total da concha											
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
JF X CR	14.51	0.001*	15.16	0.001*	4.41	0.01*	4.98	0.001*	8.78	0.001*	4.19	0.001*
JF X BM	7.89	0.001*	11.84	0.001*	8.61	0.01*	10.9	0.001*	6.50	0.001*	9.3	0.001*
JF X FLO	8.87	0.001*	15.93	0.001*	9.55	0.01*	13.21	0.001*	10.58	0.001*	10.8	0.001*
CR X BM	6.61	0.001*	3.31	0.0012*	13.02	0.01*	5.92	0.001*	15.04	0.001*	13.5	0.001*
CR X FLO	5.64	0.001*	31.09	0.001*	13.97	0.01*	8.26	0.001*	19.36	0.001*	15	0.001*
BM X FLO	ns	ns	27.77	0.001*	ns	ns	2.34	0.0209*	3.8	0.001*	ns	ns

Legenda: JF-moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR-moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM-moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO-moluscos da localidade de Floriano. *: diferença significativa entre as médias. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

Tabela 8. Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento da abertura da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	Resultado teste-t											
	Comprimento da abertura da concha											
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
JF X CR	5.06	0.001*	11.12	0.001*	8.01	0.001*	3.27	0.0014*	3.56	0.001*	5.49	0.001*
JF X BM	4.84	0.001*	8.52	0.001*	4.34	0.001*	9.75	0.001*	5.98	0.001*	6.33	0.001*
JF X FLO	7.07	0.001*	ns	ns	3.35	0.001*	10.07	0.001*	9.32	0.001*	8.48	0.001*
CR X BM	ns	ns	2.60	0.001*	12.35	0.001*	6.48	0.001*	9.45	0.001*	11.82	0.001*
CR X FLO	2.01	0.0463*	11.44	0.001*	11.36	0.001*	6.8	0.001*	12.89	0.001*	13.97	0.001*
BM X FLO	2.23	0.0275*	8.84	0.001*	ns	ns	ns	ns	3.09	0.0025*	2.15	0.0338*

Legenda: JF-moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR-moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM-moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO-moluscos da localidade de Floriano. *: diferença significativa entre as médias. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

Tabela 9. Resultado do test-t para os dados pareados da largura da abertura da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	Resultado teste-t											
	Largura da abertura da concha											
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
JF X CR	4.30	0.001*	5.11	0.001*	1.98	0.0498	5.33	0.001*	4.14	0.001*	6.59	0.001*
JF X BM	2.37	0.0192*	8.82	0.001*	1.98	0.0498	3.66	0.001*	2.53	0.0129*	4.04	0.001*
JF X FLO	2.45	0.0158*	3.96	0.001*	5.82	0.001*	6.77	0.001*	4.69	0.001*	5.11	0.001*
CR X BM	ns	ns	3.71	0.001*	3.96	0.001*	ns	ns	6.55	0.001*	10.63	0.001*
CR X FLO	ns	ns	9.07	0.001*	7.98	0.001*	ns	ns	8.83	0.001*	11.70	0.001*
BM X FLO	ns	ns	12.78	0.001*	3.83	0.0178*	3.12	0.0023*	2.04	0.0436*	ns	ns

Legenda: JF-moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR-moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM-moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO-moluscos da localidade de Floriano. *: diferença significativa entre as médias. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

Tabela 10. Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento da volta corporal da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	Resultado teste-t											
	Comprimento da volta corporal											
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
JF X CR	12.54	0.001*	14.3	0.001*	5.69	0.001*	ns	ns	8.48	0.001*	3.90	0.001*
JF X BM	5.73	0.001*	14.0	0.001*	12.63	0.0096*	3.63	0.001*	3.24	0.0016*	3.26	0.0014*
JF X FLO	7.54	0.001*	7.47	0.001*	6.51	0.001*	11.10	0.001*	6.13	0.001*	5.36	0.001*
CR X BM	6.81	0.001*	ns	ns	8.33	0.001*	2.75	0.0068*	11.49	0.001*	7.16	0.001*
CR X FLO	4.99	0.001*	21.76	0.001*	12.20	0.001*	10.22	0.001*	14.61	0.001*	9.26	0.001*
BM X FLO	ns	ns	21.45	0.001*	3.87	0.001*	7.47	0.001*	2.73	0.0073*	2.09	0.383*

Legenda: JF-moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR-moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM-moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO-moluscos da localidade de Floriano. *: diferença significativa entre as médias. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

Tabela 11. Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento da penúltima volta da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	Resultado teste-t											
	Comprimento da penúltima volta											
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
JF X CR	10.99	0.001*	16.31	0.001*	7.42	0.001*	ns	ns	6.04	0.001*	4.88	0.001*
JF X BM	3.84	0.001*	18.67	0.001*	ns	ns	2.0	0.0477*	2.63	0.0096*	ns	ns
JF X FLO	6.49	0.001*	ns	ns	3.79	0.001*	ns	ns	4.64	0.001*	ns	ns
CR X BM	7.15	0.001*	2.36	0.02*	7.86	0.001*	2.76	0.0067*	8.51	0.001*	5.91	0.001*
CR X FLO	4.50	0.001*	17.31	0.001*	3.63	0.001*	ns	ns	10.68	0.001*	5.85	0.001*
BM X FLO	2.65	0.001*	19.67	0.001*	4.23	0.001*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Legenda: JF-moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR-moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM-moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO-moluscos da localidade de Floriano. *: diferença significativa entre as médias. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

Tabela 12. Resultado do test-t para os dados pareados do comprimento da espira da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	Resultado teste-t											
	Comprimento da espira											
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p
JF X CR	11.18	0.001*	13.2	0.001*	ns	ns	11.10	0.001*	ns	ns	ns	ns
JF X BM	2.08	0.0395*	21.16	0.001*	5.77	0.001*	5.97	0.001*	2.59	0.0109*	5.73	0.001*
JF X FLO	2.47	0.0151*	ns	ns	6.71	0.001*	7.58	0.001*	4.99	0.001*	6.73	0.001*
CR X BM	10.91	0.001*	7.96	0.001*	3.82	0.001*	5.13	0.001*	4.29	0.001*	6.4	0.001*
CR X FLO	8.71	0.001*	13.47	0.001*	4.76	0.001*	3.53	0.001*	6.73	0.001*	7.4	0.001*
BM X FLO	2.20	0.0296*	21.43	0.001*	ns	ns	ns	ns	2.27	0.0253	ns	ns

Legenda: JF-moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR-moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM-moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO-moluscos da localidade de Floriano. *: diferença significativa entre as médias. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

Tabela 13. Resultado do test-t para os dados pareados do número de voltas da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	Resultado teste-t											
	Número de voltas											
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	t	p	t	p	t	p	T	p	t	p	t	p
JF X CR	5.44	0.001*	3	0.0032*	10.35	0.001*	8.06	0.001*	ns	ns	2.11	0.0373*
JF X BM	2.08	0.0395*	10.34	0.001*	2.49	0.0139*	5.41	0.001*	4.02	0.0001*	5.84	0.001*
JF X FLO	ns	ns	4.66	0.001*	10.82	0.001*	5.05	0.001*	5.86	0.001*	3.16	0.002*
CR X BM	7.52	0.001*	7.33	0.001*	7.86	0.001*	13.47	0.001*	2.55	0.0122*	3.73	0.001*
CR X FLO	7.04	0.001*	ns	ns	ns	ns	3.01	0.0032*	4.35	0.001*	ns	ns
BM X FLO	ns	ns	5.68	0.001*	8.32	0.001*	10.46	0.001*	ns	ns	2.68	0.0084*

Legenda: JF-moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR-moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM-moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO-moluscos da localidade de Floriano. *: diferença significativa entre as médias. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

Tabela 14. Resultado do ANOVA para as razões entre as medidas lineares da concha de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Barra Mansa e Floriano nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	Resultado ANOVA											
	Razões da conquiomorfometria											
	30 dias		60 dias		90 dias		120 dias		150 dias		180 dias	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
CC/LC	254.23	0.0001*	483	0.0001*	707.56	0.0001*	1258.7	0.0001*	908.13	0.0001*	675.01	0.0001*
CA/LA	111.89	0.0001*	149.54	0.0001*	71.99	0.0001*	107.03	0.0001*	68.83	0.0001*	29.88	0.0001*
CVC/CPV	346.81	0.0001*	331.10	0.0001*	337.62	0.0001*	519.65	0.0001*	260.95	0.0001*	83.34	0.0001*
CVC/LC	211.84	0.0001*	211.84	0.0001*	230.08	0.0001*	34.29	0.0001*	34.29	0.0001*	44.63	0.0001*

Legenda: CC/LC – Comprimento total da concha/Largura total da concha; CA/LA – Comprimento da abertura da concha/Largura da abertura da concha; CVC/CPV – Comprimento da volta corporal/Comprimento da primeira volta; CVC/CE – Comprimento da volta corporal/Comprimento da espira. *: diferença significativa entre as médias.

Pela análise da distância Euclidiana foi possível verificar que o padrão de similaridade entre os grupos se estabilizou a partir do alcance da maturidade (em torno dos 90 dias) (Tabela 13). As relações entre as medidas lineares da concha variaram entre os morfotipos, nas idades de 30 e 60 dias, refletindo a existência de diferenças na ontogenia da concha durante a fase inicial do desenvolvimento dos moluscos. Nas idades posteriores, quando se aproxima a fase adulta, as relações entre as variáveis tende a estabilidade e os padrões morfométricos da concha são estabelecidos. No presente estudo, foi possível observar que os morfotipos de Barra Mansa e Floriano se tornam mais próximos ao longo do desenvolvimento dos moluscos, fato confirmado pela diminuição progressiva dos valores de distância euclidiana encontrados para esses dois morfotipos nas idades de 90, 120, 150, 180 dias de vida.

Os moluscos provenientes das localidades de Barra Mansa e Floriano apresentaram um padrão de similaridade mais robusto. Em todas as idades observadas, exceto na idade de 60 dias, foram os morfotipos que apresentaram menor distância em relação aos morfotipos das demais localidades. No começo da fase jovem (30 dias de vida) e após o estabelecimento da fase adulta (150 e 180 dias de vida), esses morfotipos apresentaram menores valores de distância euclidiana, evidenciando padrões morfométricos ainda mais similares.

Os morfotipos das localidades de Cruzília e Juiz de Fora apresentaram similaridade em nas idades observadas, exceto na idade de 30 dias. Tais morfotipos não apresentaram similaridade com o morfotipo de Barra Mansa em nenhuma idade observada, e demonstraram maior distância em relação ao morfotipo de Floriano, principalmente o morfotipo de Cruzília.

Tabela 15. Distância Euclidiana da morfometria da concha de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

	JF	CR	BM	FLO
30 dias				
Juiz de Fora (JF)	0	---	---	---
Cruzília (CR)	6.9502	0	---	---
Barra Mansa (BM)	3.4968	4.1968	0	---
Floriano (FLO)	4.5805	3.3297	1.3464	0
Menor distância (BM e FLO)	1.3464	---	---	---
Maior distância (JF e CR)	6.9502	---	---	---
60 dias				
Juiz de Fora (JF)	0	---	---	---
Cruzília (CR)	4.2942	0	---	---
Barra Mansa (BM)	5.5151	2.3819	0	---
Floriano (FLO)	2.1644	5.5172	6.1924	0
Menor distância (JF e FLO)	2.1644	---	---	---
Maior distância (BM e FLO)	6.1924	---	---	---

Tabela 15. (continuação)

	JF	CR	BM	FLO
90 dias				
Juiz de Fora (JF)	0	---	---	---
Cruzília (CR)	4.1178	0	---	---
Barra Mansa (BM)	3.1181	5.602	0	---
Floriano (FLO)	4.993	6.0936	2.8067	0
Menor distância (BM e FLO)	2.8067	---	---	---
Maior distância (CR e FLO)	6.0936	---	---	---
120 dias				
Juiz de Fora (JF)	0	---	---	---
Cruzília (CR)	4.4668	0	---	---
Barra Mansa (BM)	4.6773	4.5343	0	---
Floriano (FLO)	6.1757	3.77	3.6413	0
Menor distância (BM e FLO)	3.6413	---	---	---
Maior distância (CR e FLO)	6.1757	---	---	---
150 dias				
Juiz de Fora (JF)	0	---	---	---
Cruzília (CR)	3.2687	0	---	---
Barra Mansa (BM)	2.9222	5.4409	0	---
Floriano (FLO)	4.7618	7.2691	1.9127	0
Menor distância (BM e FLO)	1.9127	---	---	---
Maior distância (JF e FLO)	7.2691	---	---	---
180 dias				
Juiz de Fora (JF)	0	---	---	---
Cruzília (CR)	3.3634	0	---	---
Barra Mansa (BM)	4.1359	6.015	0	---
Floriano (FLO)	4.1782	6.594	1.5697	0
Menor distância (BM e FLO)	1.5697	---	---	---
Maior distância (CR e FLO)	6.954	---	---	---

A análise de agrupamentos demonstrou que os morfotipos de Barra Mansa e Floriano foram agrupados nas idades de 30, 90, 120, 150 e 180 dias, a maior similaridade entre estes morfotipos (Figura 8). Na idade de 30 dias, a distância entre estes morfotipos foi de apenas 23%, o morfotipo de Cruzília apresentou uma distância de 75% desse agrupamento. O morfotipo da localidade de Juiz de Fora se apresentou como um grupo externo ao agrupamento formado pelos outros morfotipos, apresentando 100% de distância em relação às outras localidades. Na idade de 90 dias, a distância foi de 44% entre Barra Mansa e Floriano, enquanto que nas idades de 120, 150 e 180 dias, 64%, 25% e 20%, respectivamente. Esses valores de distância confirmaram que na fase adulta, as

relações entre as variáveis tende a estabilidade e os padrões morfométricos da concha são estabelecidos, havendo menor distância entre os padrões mais similares.

Na idade de 60 dias, ocorreram dois agrupamentos, o mais similar entre os morfotipos de Juiz de Fora e Floriano, com 25% de distância, e outro entre os morfotipos de Cruzília e Barra Mansa com 30% de distância. Nesta idade, que corresponde à fase jovem, os padrões morfométricos das conchas dos morfotipos ainda não estão bem estabelecidos. Isso foi confirmado pela menor consistência na formação dos agrupamentos, que apresentaram somente 14% de distância.

Os morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília foram agrupados nas idades de 90, 150 e 180 dias, com distâncias correspondendo a 64%, 43% e 43% respectivamente. Nestas idades, as porcentagens de distância encontradas entre Juiz de Fora e Cruzília, se apresentaram mais altas do que entre Barra Mansa e Floriano. Entretanto, nas idades de 30 e 120 dias de vida, os morfotipos das localidades de Juiz de Fora e Cruzília não foram agrupados. Na idade de 120 dias, o morfotipo de Cruzília apresentou uma distância de 76% do agrupamento entre Barra Mansa e Floriano. Esse valor de distância foi muito semelhante ao encontrado aos 30 dias de vida. Também nesta idade, o morfotipo de Juiz de Fora se apresentou como um grupo externo, havendo 100% de distância em relação às outras localidades.

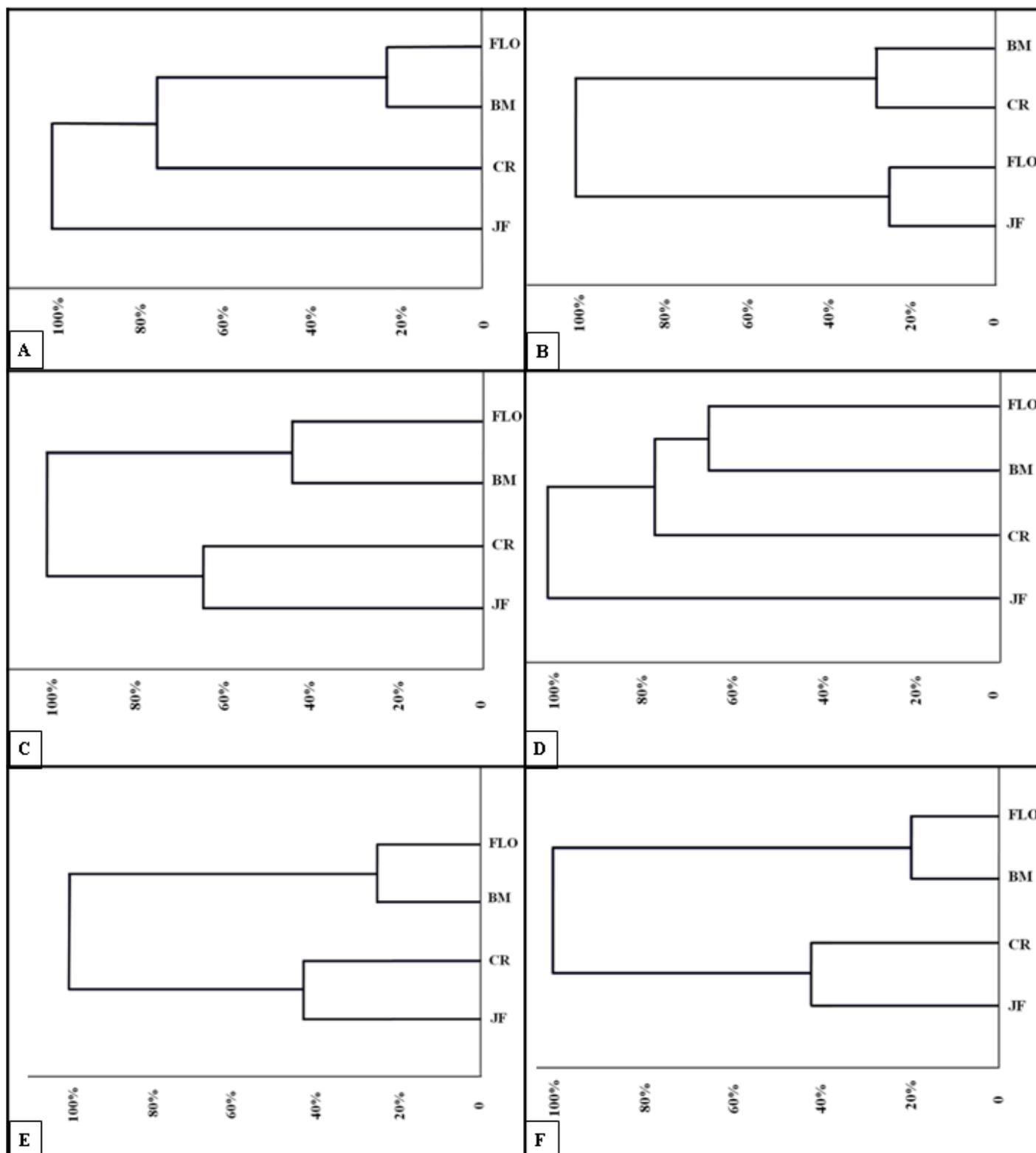


Gráfico 5. Análise de agrupamentos da conchiliomorfometria de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 30 dias (A), 60 dias (B), 90 dias (C), 120 dias (D), 150 dias (E) e 180 dias (F). JF – moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM – moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO - moluscos provenientes da localidade de Floriano.

A análise discriminante, refere-se a possibilidade de separar diferentes grupos com base nas variáveis disponíveis. O resultado da análise discriminante aplicada às variáveis morfométricas da concha dos morfotipos das quatro localidades está representado na Figura 9. Na idade de 30 dias ocorreu a formação de 3 grupos não muito bem definidos, o que significa que os padrões morfométricos nesta idade não foram estabelecidos. Um grupo composto pelo morfotipo de Cruzília, e o outro pelo morfotipo de Juiz de Fora, o terceiro grupo foi formado pelas localidades de Barra Mansa e Floriano.

Na idade de 60 dias, ao contrário, ocorreu a formação de quatro grupos bem definidos compostos por cada morfotipo em estudo separadamente. Entretanto, o morfotipo de Cruzília demonstrou ser semelhante ao morfotipo de Barra Mansa, devido a um indivíduo da localidade de Cruzília, ter apresentado morfometria da concha semelhante ao morfotipo de Barra Mansa. As conchas do morfotipo da localidade de Juiz de Fora apresentaram morfologia mais próxima às conchas do morfotipo de Cruzília, enquanto o morfotipo de Floriano demonstrou ser o grupo mais distante dos demais.

Na idade de 90 dias, como observado na idade anterior, houve a formação de grupos definidos incluindo os morfotipos de cada localidade. Além disso, foi evidenciado um padrão de similaridade entre morfotipos. Os morfotipos de Juiz de Fora e Barra Mansa se mostraram próximos, o último, por sua vez mais similar ao morfotipo de Floriano. O morfotipo de Cruzília foi representado no gráfico como um grupo distante das outras localidades, com seus componentes dispersos no gráfico.

Ao contrário do que foi visto na idade anterior de 120 dias, o morfotipo de Juiz de Fora demonstrou ser mais próximo do morfotipo de Floriano, enquanto que este último ficou relacionado com o morfotipo de Barra Mansa. A localidade de Cruzília por sua vez permaneceu isolada dos demais grupos, mas com seus componentes formando um grupo mais definido.

Aos 150 e 180 dias de vida, os resultados dos padrões morfométricos apesar de formarem grupos com componentes dispersos, foram mais similares aos encontrados pelas análises anteriores de variação interpopulacional. As localidades de Barra Mansa e Floriano se mostraram altamente relacionadas, com componentes se sobrepondo no gráfico. Dessa forma esses morfotipos nessa fase de vida apresentam padrões morfométricos bastante similares. O morfotipo de Cruzília e Juiz de Fora demonstraram ser dois grupos próximos, mas não tanto quanto as localidades anteriormente citadas. O morfotipo da localidade de Cruzília demonstrou ser o mais distante dos demais, enquanto que o morfotipo de Juiz de Fora apresentou certa semelhança com os morfotipos das localidades de Barra Mansa e Floriano.

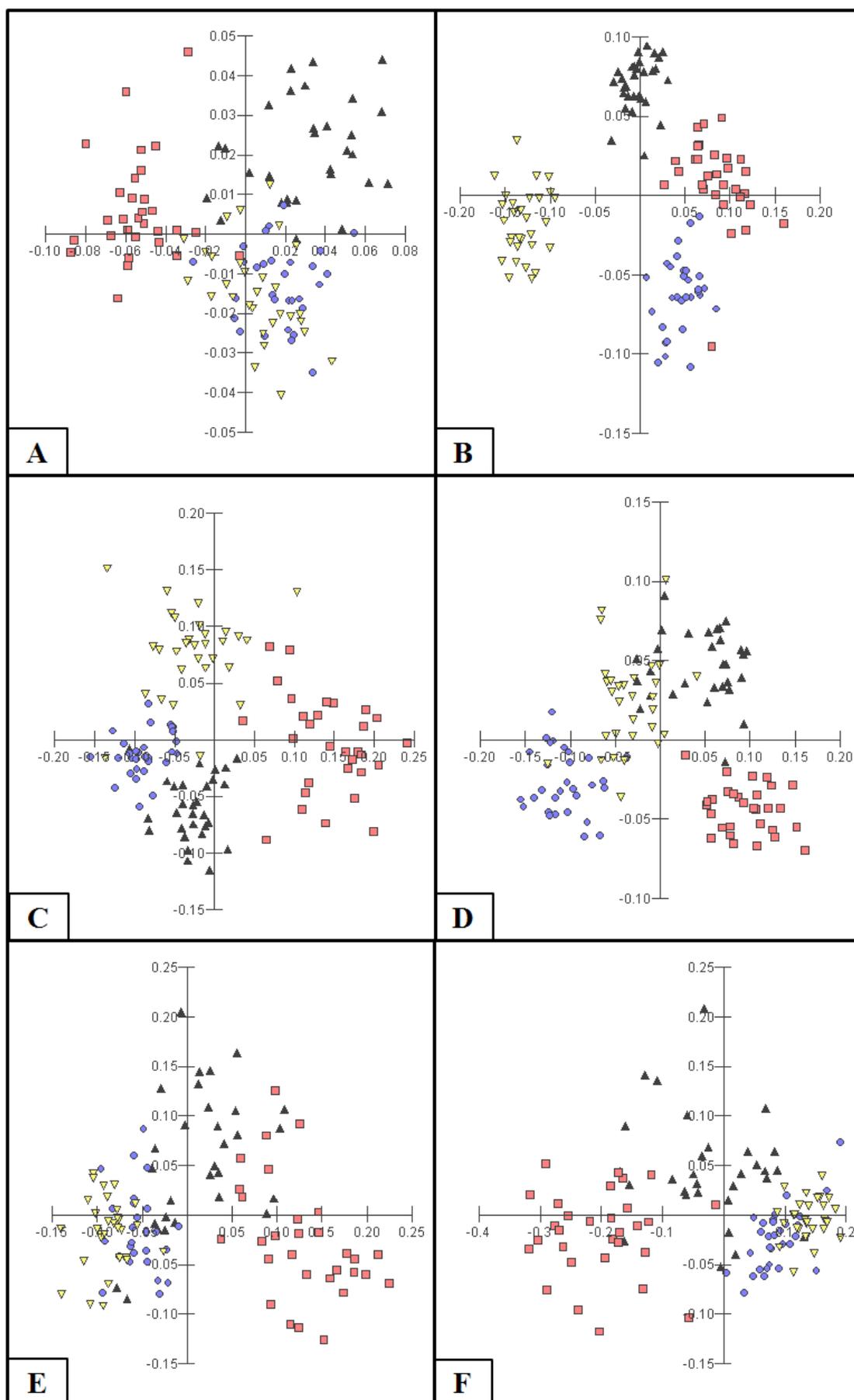


Gráfico 6. Análise discriminante da conchiliomorfometria de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 30 dias (A), 60 dias (B), 90 dias (C), 120 dias (D), 150 dias (E) e 180 dias (F). ▲ – moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; ■ – moluscos provenientes da localidade de Cruzília; ● – moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; ▼ - moluscos provenientes da localidade de Floriano.

4.3.4 Alometria do crescimento

A análise de alometria do crescimento foi aplicada com o objetivo de caracterizar o padrão de crescimento ao longo do desenvolvimento dos moluscos, e verificar se esse padrão varia entre os morfotipos das diferentes localidades. Foram analisadas 6 relações de alometria, aplicadas a cada morfotipo nas diferentes idades. Somente os valores de coeficiente alométrico (b) significativos através do teste t foram considerados. Através da relação 4: $CC = a \cdot LC^b$ (Comprimento da concha = a . Largura total da concha) e a relação 5: $CE = a \cdot CC^b$ (Comprimento da espira = a . comprimento total da concha), foram obtidos valores de coeficiente alométrico mais significativos, sendo esta as relações mais relevantes na diferenciação dos morfotipos.

Na relação 1, $LA = a \cdot LC^b$ (Largura da abertura da concha = a . Largura total da concha^b), todos os morfotipos apresentaram, na maior parte das idades observadas, alometria negativa, onde taxa de crescimento da LA é inferior à taxa de crescimento da LC. Somente nas idades de 90 e 150 dias, o padrão de crescimento das medidas lineares da concha analisado por meio dessa relação foi similar entre os morfotipos (Tabela 14).

Os morfotipos apresentaram uma maior frequência de alometria negativa para a relação 2, $CA = a \cdot LC^b$ (Comprimento da abertura da concha = a . Largura total da concha^b), o que significa que a taxa de crescimento de CA apresentou-se inferior à taxa da LC (Tabela 15). Similarmente à análise da relação anterior, com estes resultados pode-se observar que um aumento no tamanho da largura total da concha, não necessariamente é acompanhado por um aumento no comprimento da abertura da concha. Somente nas idades de 30, 120 e 180 dias, o padrão de crescimento das medidas lineares da concha analisado por meio dessa relação foi similar entre os morfotipos.

As relações 1 e 2 indicam que, ao longo do desenvolvimento dos moluscos, o crescimento da largura total da concha não é proporcional ao crescimento da largura e comprimento da abertura da concha. Portanto, a abertura da concha do molusco jovem é maior em relação ao seu tamanho corporal, quando comparado ao adulto.

Como resultado da relação 3, $CE = a \cdot LC^b$ (Comprimento da espira = a . Largura total da concha^b), diferentemente das relações anteriores, houve um maior número de relações alométricas positivas do que negativas (Tabela 16). Ou seja, a taxa de crescimento da espira foi superior à taxa de crescimento da largura total da concha. Na relação 4, $CC = a \cdot LC^b$ (Comprimento total da concha = a . Largura total da concha^b), para a maior parte das análises ocorreu a alometria negativa, onde a taxa de crescimento do CC foi inferior à taxa de crescimento da LC (Tabela 17). À medida que a concha cresce, a nova volta formada que, até a formação da próxima volta da espiral, constitui a volta corporal, é sempre maior que a volta anterior. A volta corporal sempre cresce mais em

largura do que em comprimento e, portanto, a largura total da concha corresponde à maior largura da volta corporal. A maior taxa de crescimento da largura total, em relação ao comprimento total da concha, como demonstrado pela relação 4, pode ser explicada pelo crescimento desigual da volta corporal, tornando a contribuição da volta corporal para o aumento do comprimento total da concha (volta corporal mais espira) menos significativa do que a contribuição para o aumento em largura. Os padrões expressos pela relação 3, na qual a taxa de crescimento da espira é superior à taxa de crescimento da largura total da concha e pela relação 4, onde há a expansão progressiva em largura à medida que a concha cresce, determinam a forma cônica, com base larga, característica da concha de *L. unilamellata*.

Os resultados da relação 5, $CE = a \cdot CC^b$ (Comprimento da espira = $a \cdot$ Comprimento total da concha^b), mostram que a maior parte dos padrões de crescimento foram alométricos positivos, onde a taxa de crescimento da espira foi maior do que a taxa de crescimento do comprimento total da concha (espira mais volta corporal). Esse resultado confirma que a contribuição da volta corporal para o aumento do comprimento total da concha é menos significativa do que a contribuição para o aumento em largura (Tabela 18).

A maior parte dos resultados da relação 6, $CA = a \cdot CC^b$ (Comprimento da abertura da concha = $a \cdot$ Comprimento total da concha^b), correspondeu a crescimento alométrico negativo, onde o comprimento da abertura demonstrou uma taxa de crescimento inferior à taxa do comprimento da concha (Tabela 19). O crescimento da concha de *L. unilamellata* ocorre por acréscimo de material na borda da abertura da concha. Esse acréscimo ocorre em uma direção inclinada para baixo, de maneira que a próxima volta formada sobrepõe apenas parcialmente a volta anterior. Dessa forma, o comprimento da volta corporal sempre é maior que o comprimento da abertura da concha e o acréscimo ao comprimento total da concha corresponde ao comprimento da abertura mais o comprimento da penúltima volta da concha. Esse padrão de crescimento também contribui para a forma cônica da concha.

Tabela 16. Relações conquiliomorfológicas entre as variáveis largura da abertura da concha (LA) e largura total da concha (LC) de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

População	Equação alométrica	Coefficiente de determinação	Erro padrão	Teste-t	Relação alométrica
30 dias					
JF	LA= -0.28 . LC ^{1.78}	0.81	0.0311	t=10.8 p=0.000	alometria +
FLO	LA= -0.53 . LC ^{0.66}	0.07	0.0959	t=1.47 p=0.1537	alometria -
CR	LA= -0.15 . LC ^{0.94}	0.67	0.0156	t=7.46 p=0.0000	alometria -
BM	LA= 0.09 . LC ^{0.12}	0.0087	0.0069	t=0.50 p=0.6245	alometria -
60 dias					
JF	LA= -0.37 . LC ^{0.88}	0.38	0.0303	t=4.11 p=0.000	alometria -
FLO	LA= -0.25 . LC ^{0.96}	0.63	0.0342	t=6.84 p=0.0000	Isometria
CR	LA= -0.29 . LC ^{1.25}	0.59	0.0546	t=6.29 p=0.000	alometria +
BM	LA= 0.18 . LC ^{0.16}	0.0063	0.0643	t=0.42 p=0.6765	alometria -
90 dias					
JF	LA= -0.37 . LC ^{0.88}	0.38	0.0208	t=4.31 p=0.0000	alometria -
FLO	LA= -0.44 . LC ^{0.68}	0.09	0.1086	t=1.67 p=0.1055	alometria -
CR	LA= -0.46 . LC ^{0.48}	0.13	0.1082	t=1.98 p=0.0584	alometria -
BM	LA= 0.09 . LC ^{0.33}	0.123	0.0052	t=2.25 p=0.0323	alometria -
120 dias					
JF	LA= -0.44 . LC ^{0.50}	0.19	0.0593	t=2.56 p=0.0160	alometria -
FLO	LA= -0.74 . LC ^{-0.34}	0.02	0.0739	t=0.66 p=0.5141	alometria -
CR	LA= -0.36 . LC ^{0.99}	0.20	0.092	t=2.68 p=0.0122	Isometria
BM	LA= 0.09 . LC ^{0.33}	0.1633	0.0069	t=2.34 p=0.0267	alometria -
150 dias					
JF	LA= -0.39 . LC ^{0.52}	0.22	0.0643	t=2.79 p=0.0094	alometria -
FLO	LA= -0.78 . LC ^{-0.71}	0.08	0.0628	t=-1.60 p=0.1197	alometria -
CR	LA= -0.34 . LC ^{0.82}	0.28	0.0586	t=3.37 p=0.0022	alometria -
BM	LA= 0.22 . LC ^{0.13}	0.0054	0.0317	t=0.37 p=0.7167	alometria -
180 dias					
JF	LA= -0.25 . LC ^{1.12}	0.37	0.116	t=4.03 p=0.0000	alometria +
FLO	LA= -0.63 . LC ^{-0.19}	0.005	0.0649	t=-0.37 p=0.7135	alometria -
CR	LA= -0.36 . LC ^{0.13}	0.0076	0.1022	t=0.46 p=0.6466	alometria -
BM	LA= 0.26 . LC ^{0.05}	0.0006	0.0519	t=0.13 p=0.8949	alometria -

Legenda: JF- moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – Moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM – Moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO – Moluscos provenientes da localidade de Floriano.

Tabela 17. Relações conquiliomorfológicas entre as variáveis comprimento da abertura da concha (CA) e largura total da concha (LC) de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

População	Equação alométrica	Coefficiente de determinação	Erro padrão	Teste-t	Relação alométrica
30 dias					
JF	CA= -0.17 . LC ^{0.93}	0.31	0.0676	t=3.71 p=0.0009	alometria -
FLO	CA= -0.45 . LC ^{0.54}	0.0669	0.067	t=1.42 p=0.1674	alometria -
CR	CA= -0.17 . LC ^{0.88}	0.2157	0.0969	t=2.78 p=0.0097	alometria -
BM	CA= 0.03 . LC ^{0.63}	0.1476	0.0094	t=2.20 p=0.0360	alometria -
60 dias					
JF	CA= -0.16 . LC ^{0.76}	0.3019	0.0315	t=3.48 p=0.0016	alometria -
FLO	CA= -0.25 . LC ^{0.38}	0.28	0.0228	t=3.31 p=0.0026	alometria -
CR	CA= -0.03 . LC ^{1.12}	0.7218	0.024	t=8.52 p=0.0000	alometria +
BM	CA= 0.15 . LC ^{0.55}	0.1588	0.0268	t=2.30 p=0.0291	alometria -
90 dias					
JF	CA= -0.24 . LC ^{0.50}	0.1699	0.0217	t=2.39 p=0.0235	alometria -
FLO	CA= -0.44 . LC ^{0.68}	0.09	0.1086	t=1.67 p=0.1055	alometria -
CR	CA= -0.07 . LC ^{1.00}	0.6655	0.0348	t=7.33 p=0.0000	isometria
BM	CA= 0.37 . LC ^{0.04}	0.0007	0.0225	t=0.14 p=0.8911	alometria -
120 dias					
JF	CA= -0.09 . LC ^{0.92}	0.7196	0.0182	t=8.48 p=0.0000	alometria -
FLO	CA= -0.11 . LC ^{0.89}	0.1059	0.0666	t=1.82 p=0.0792	alometria -
CR	CA= -0.26 . LC ^{0.21}	0.0392	0.0255	t=1.07 p=0.2945	alometria -
BM	CA= 0.21 . LC ^{0.39}	0.0589	0.0289	t=1.32 p=0.1960	alometria -
150 dias					
JF	CA= -0.08 . LC ^{0.99}	0.6645	0.0328	t=7.45 p=0.0000	isometria
FLO	CA= 0.07 . LC ^{1.54}	0.4383	0.0343	t=4.67 p=0.0000	alometria +
CR	CA= -0.14 . LC ^{0.72}	0.3349	0.0363	t=3.76 p=0.0008	alometria -
BM	CA= -0.01 . LC ^{0.83}	0.1595	0.0338	t=2.18 p=0.0390	alometria -
180 dias					
JF	CA= -0.14 . LC ^{0.73}	0.5026	0.0279	t=5.32 p=0.0000	alometria -
FLO	CA= -0.21 . LC ^{0.56}	0.1708	0.013	t=2.40 p=0.0231	alometria -
CR	CA= -0.11 . LC ^{0.74}	0.2735	0.0612	t=3.25 p=0.0030	alometria -
BM	CA= 0.28 . LC ^{0.32}	0.0508	0.028	t=1.22 p=0.2312	alometria -

Legenda: JF- moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – Moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM – Moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO – Moluscos provenientes da localidade de Floriano.

Tabela 18. Relações conquiliomorfológicas entre as variáveis comprimento da espira da concha (CE) e largura total da concha (LC) de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

População	Equação alométrica	Coefficiente de determinação	Erro padrão	Teste-t	Relação alométrica
30 dias					
JF	CE= -0.04 . LC ^{1.59}	0.6359	0.0557	t=6.99 p=0.0000	alometria +
FLO	CE= -0.91 . LC ^{0.08}	0.0013	0.0756	t=0.19 p=0.8502	alometria -
CR	CE= -0.33 . LC ^{1.17}	0.3092	0.1054	t=3.54 p=0.0014	alometria +
BM	CE= -0.01 . LC ^{0.53}	0.3426	0.0022	t=3.82 p=0.0007	alometria -
60 dias					
JF	CE= -0.18 . LC ^{1.24}	0.4832	0.0384	5.11 p=0.000	alometria +
FLO	CE= 0.15 . LC ^{1.42}	0.6964	0.0541	8.02 p=0.0000	alometria +
CR	CE= -0.07 . LC ^{1.40}	0.6811	0.0453	7.73 p=0.0000	alometria +
BM	CE= 0.20 . LC ^{0.42}	0.0865	0.0314	1.63 p=0.1145	alometria -
90 dias					
JF	CE= 0.01 . LC ^{1.32}	0.5114	0.0296	5.41 p=0.0000	alometria +
FLO	CE= -0.29 . LC ^{0.29}	0.0476	0.0404	1.18 p=0.2468	alometria -
CR	CE= -0.05 . LC ^{1.35}	0.7293	0.0468	8.53 p=0.0000	alometria +
BM	CE= -0.11 . LC ^{1.09}	0.4158	0.0147	4.46 p=0.0001	alometria +
120 dias					
JF	CE= -0.03 . LC ^{1.11}	0.7415	0.0239	8.96 p=0.0000	alometria -
FLO	CE= -0.40 . LC ^{1.6}	0.4608	0.0179	4.89 p=0.0000	alometria -
CR	CE= -0.23 . LC ^{0.64}	0.2801	0.0252	3.30 p=0.0026	alometria -
BM	CE= -0.23 . LC ^{1.39}	0.4007	0.0345	4.33 p=0.0001	alometria -
150 dias					
JF	CE= -0.04 . LC ^{1.04}	0.7097	0.0291	8.27 p=0.0000	Isometria
FLO	CE= -0.24 . LC ^{0.29}	0.0611	0.0147	1.35 p=0.1879	alometria -
CR	CE= -0.01 . LC ^{1.6}	0.4836	0.0963	5.12 p=0.0000	alometria +
BM	CE= 0.31 . LC ^{0.38}	0.0746	0.0168	1.42 p=0.1680	alometria -
180 dias					
JF	CE= -0.03 . LC ^{1.10}	0.5936	0.0442	6.40 p=0.0000	alometria +
FLO	CE= -0.09 . LC ^{0.80}	0.1904	0.0229	2.57 p=0.0159	alometria -
CR	CE= -0.18 . LC ^{0.34}	0.1716	0.0229	2.41 p=0.0228	alometria -
BM	CE= 0.18 . LC ^{0.58}	0.0708	0.0665	1.46 p=0.1553	alometria -

Legenda: JF- moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – Moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM – Moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO – Moluscos provenientes da localidade de Floriano.

Tabela 19. Relações conchiliomorfológicas entre as variáveis comprimento total da concha (CC) e largura total da concha (LC) de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

População	Equação alométrica	Coefficiente de determinação	Erro padrão	Teste-t	Relação alométrica
30 dias					
JF	CC= 0.11 . LC ^{0.84}	0.6663	0.0137	7.48 p=0.0000	alometria -
FLO	CC= -0.09 . LC ^{0.50}	0.1808	0.0193	2.49 p=0.0191	alometria -
CR	CC= 0.15 . LC ^{0.94}	0.6653	0.0156	7.46 p=0.0000	alometria -
BM	CC= 0.19 . LC ^{0.92}	0.2113	0.013	2.74 p=0.0106	alometria -
60 dias					
JF	CC= 0.23 . LC ^{0.96}	0.7216	0.0084	8.52 p=0.0000	isometria
FLO	CC= 0.39 . LC ^{1.00}	0.7137	0.0247	8.35 p=0.0000	isometria
CR	CC= 0.78 . LC ^{2.71}	0.7916	0.0961	10.31 p=0.0000	alometria +
BM	CC= 0.34 . LC ^{1.46}	0.3996	0.0532	4.32 p=0.0001	alometria +
90 dias					
JF	CC= 0.35 . LC ^{1.11}	0.5975	0.0147	6.45 p=0.0000	alometria +
FLO	CC= 0.11 . LC ^{0.29}	0.152	0.0108	2.24 p=0.0331	alometria -
CR	CC= 0.38 . LC ^{1.27}	0.9531	0.0055	23.43 p=0.0000	alometria +
BM	CC= 0.40 . LC ^{1.47}	0.3571	0.034	3.94 p=0.0001	alometria +
120 dias					
JF	CC= -0.44 . LC ^{0.50}	0.1901	0.0593	2.56 p=0.0160	alometria -
FLO	CC= 0.19 . LC ^{0.47}	0.3691	0.0037	4.05 p=0.0000	alometria -
CR	CC= 0.22 . LC ^{0.59}	0.4622	0.0099	4.91 p=0.0000	alometria -
BM	CC= -0.04 . LC ^{2.46}	0.5475	0.06	5.82 p=0.0001	alometria -
150 dias					
JF	CC= -0.32 . LC ^{0.93}	0.7644	0.0177	9.53 p=0.0000	alometria -
FLO	CC= 0.19 . LC ^{0.45}	0.2467	0.007	3.03 p=0.0052	alometria -
CR	CC= 0.33 . LC ^{1.10}	0.8453	0.0078	12.37 p=0.0000	alometria +
BM	CC= 0.82 . LC ^{0.80}	0.1459	0.0353	2.07 p=0.0492	alometria -
180 dias					
JF	CC= 0.29 . LC ^{0.82}	0.6763	0.0171	7.65 p=0.0000	alometria -
FLO	CC= 0.26 . LC ^{0.69}	0.2909	0.0098	3.39 p=0.0021	alometria -
CR	CC= 0.23 . LC ^{0.36}	0.3421	0.0102	3.82 p=0.0007	alometria -
BM	CC= 0.78 . LC ^{0.79}	0.1037	0.0806	1.80 p=0.0825	alometria -

Legenda: JF- moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – Moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM – Moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO – Moluscos provenientes da localidade de Floriano.

Tabela 20. Relações conquiliomorfológicas entre as variáveis comprimento da espira da concha (CE) e comprimento total da concha (CC) de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

População	Equação alométrica	Coefficiente de determinação	Erro padrão	Teste-t	Relação alométrica
30 dias					
JF	$CE = -0.45 \cdot CC^{1.32}$	0.4697	0.0811	4.98 p=0.0000	alometria +
FLO	$CE = -0.64 \cdot CC^{0.78}$	0.02547	0.0614	2.55 p=0.0166	alometria -
CR	$CE = -0.69 \cdot CC^{0.87}$	0.2307	0.1174	2.90 p=0.0072	alometria -
BM	$CE = 0.04 \cdot CC^{0.20}$	0.196	0.0027	2.61 p=0.0142	alometria -
60 dias					
JF	$CE = -0.47 \cdot CC^{1.32}$	0.7017	0.0222	8.11 p=0.0000	alometria +
FLO	$CE = -0.40 \cdot CC^{1.41}$	0.9664	0.006	28.38 p=0.0000	alometria +
CR	$CE = -0.47 \cdot CC^{1.14}$	0.8018	0.0281	10.64 p=0.0000	alometria +
BM	$CE = 0.04 \cdot CC^{0.35}$	0.3216	0.0233	3.64 p=0.0011	alometria -
90 dias					
JF	$CE = -0.41 \cdot CC^{1.18}$	0.8445	0.0094	12.33 p=0.0000	alometria +
FLO	$CE = -0.41 \cdot CC^{1.03}$	0.319	0.0289	3.62 p=0.0011	alometria +
CR	$CE = -0.46 \cdot CC^{1.11}$	0.8444	0.0269	1.21 p=0.0000	alometria +
BM	$CE = -0.28 \cdot CC^{0.63}$	0.8259	0.0044	11.53 p=0.0001	alometria -
120 dias					
JF	$CE = -0.41 \cdot CC^{1.17}$	0.8923	0.0099	15.23 p=0.0000	alometria +
FLO	$CE = -0.40 \cdot CC^{1.61}$	0.4608	0.0179	4.89 p=0.0000	alometria +
CR	$CE = -0.47 \cdot CC^{1.13}$	0.6749	0.0114	7.62 p=0.0000	alometria +
BM	$CE = -0.13 \cdot CC^{0.50}$	0.585	0.0239	6.28 p=0.0001	alometria -
150 dias					
JF	$CE = -0.39 \cdot CC^{1.09}$	0.89	0.011	15.05 p=0.0000	alometria +
FLO	$CE = -0.37 \cdot CC^{0.80}$	0.375	0.0098	4.10 p=0.0000	alometria -
CR	$CE = -0.51 \cdot CC^{1.51}$	0.6095	0.0729	6.61 p=0.0000	alometria +
BM	$CE = -0.06 \cdot CC^{0.46}$	0.4844	0.0094	4.85 p=0.0001	alometria -
180 dias					
JF	$CE = -0.39 \cdot CC^{1.11}$	0.6034	0.0432	6.53 p=0.0000	alometria +
FLO	$CE = -0.40 \cdot CC^{1.27}$	0.7935	0.0059	10.37 p=0.0000	alometria +
CR	$CE = -0.42 \cdot CC^{1.05}$	0.6195	0.0105	6.75 p=0.0000	alometria +
BM	$CE = -0.32 \cdot CC^{0.68}$	0.5775	0.0302	6.19 p=0.0001	alometria -

Legenda: JF- moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – Moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM – Moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO – Moluscos provenientes da localidade de Floriano.

Tabela 21. Relações conchiliomorfológicas entre as variáveis comprimento da abertura da concha (CA) e comprimento total da concha (CC) de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ, nas idades de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

População	Equação alométrica	Coefficiente de determinação	Erro padrão	Teste-t	Relação alométrica
30 dias					
JF	$Ca = -0.24 \cdot Cc^{1.26}$	0.6444	0.0358	7.12 p=0.0000	alometria +
FLO	$Ca = -0.70 \cdot Cc^{0.19}$	0.0119	0.071	0.58 p=0.5656	alometria -
CR	$Ca = -0.50 \cdot Cc^{0.52}$	0.1022	0.1109	1.79 p=0.0850	alometria -
BM	$Ca = 0.06 \cdot Cc^{0.30}$	0.1383	0.0095	2.12 p=0.0429	alometria -
60 dias					
JF	$Ca = -0.34 \cdot Cc^{0.80}$	0.4249	0.026	4.55 p=0.0000	alometria -
FLO	$Ca = -0.41 \cdot Cc^{0.35}$	0.3399	0.0209	3.80 p=0.0007	alometria -
CR	$Ca = -0.35 \cdot Cc^{0.83}$	0.6976	0.0261	8.04 p=0.0000	alometria -
BM	$Ca = 0.33 \cdot Cc^{0.07}$	0.0154	0.0313	0.66 p=0.5139	alometria -
90 dias					
JF	$Ca = -0.40 \cdot Cc^{0.50}$	0.354	0.0169	3.92 p=0.0005	alometria -
FLO	$Ca = -0.40 \cdot Cc^{-0.04}$	0.0002	0.0873	0.07 p=0.9438	alometria -
CR	$Ca = -0.36 \cdot Cc^{0.75}$	0.643	0.0371	6.97 p=0.0000	alometria -
BM	$Ca = 0.28 \cdot Cc^{0.09}$	0.0202	0.022	0.76 p=0.4536	alometria -
120 dias					
JF	$Ca = -0.40 \cdot Cc^{0.90}$	0.7509	0.0162	9.19 p=0.0000	alometria -
FLO	$Ca = -0.40 \cdot Cc^{0.29}$	0.0068	0.074	0.44 p=0.6659	alometria -
CR	$Ca = -0.36 \cdot Cc^{0.62}$	0.2666	0.0194	3.19 p=0.0035	alometria -
BM	$Ca = 0.18 \cdot Cc^{0.19}$	0.153	0.026	2.25 p=0.0325	alometria -
150 dias					
JF	$Ca = -0.38 \cdot Cc^{0.77}$	0.4567	0.0531	4.85 p=0.0000	alometria -
FLO	$Ca = -0.44 \cdot Cc^{0.82}$	0.1015	0.0549	1.78 p=0.0806	alometria -
CR	$Ca = -0.36 \cdot Cc^{0.64}$	0.3786	0.0339	4.13 p=0.0000	alometria -
BM	$Ca = -0.07 \cdot Cc^{0.41}$	0.1741	0.0332	2.30 p=0.0303	alometria -
180 dias					
JF	$Ca = -0.37 \cdot Cc^{0.65}$	0.3886	0.0338	4.31 p=0.0000	alometria -
FLO	$Ca = -0.41 \cdot Cc^{0.45}$	0.1765	0.0129	2.45 p=0.0208	alometria -
CR	$Ca = -0.47 \cdot Cc^{1.34}$	0.3309	0.0564	3.72 p=0.0009	alometria +
BM	$Ca = 0.44 \cdot Cc^{0.01}$	0	0.0295	0.03 p=0.9754	alometria -

Legenda: JF- moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – Moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BM – Moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO – Moluscos provenientes da localidade de Floriano.

4.4 DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível detectar a presença de variabilidade morfológica da concha de *L. unilamellata* proveniente de diferentes localidades.

Os moluscos terrestres possuem características peculiares, tais como baixa mobilidade, capacidade de autofecundação, presença de polimorfismos, dentre outras. Devido à baixa mobilidade, o fluxo gênico entre as populações é baixo, criando o isolamento e, potencialmente, levando à aquisição de adaptações morfológicas e de história de vida altamente relacionadas às condições locais (PFENNINGER e POSADA, 2002). Esses mecanismos podem favorecer o isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, a diferenciação genética e morfológica das populações isoladas. Nesse contexto, o estudo da morfometria da concha pode resultar na constatação de diferentes padrões morfológicos, possibilitando a distinção de morfotipos, e da existência de variabilidade em diferentes populações isoladas geograficamente.

Os morfotipos de Barra Mansa e Floriano apresentaram valores de distância euclidiana progressivamente menores, ao longo do desenvolvimento dos moluscos, evidenciando padrões morfométricos ainda mais similares. Na fase adulta as relações entre as medidas lineares da concha estão estabelecidas, diferentemente do que se observa na fase jovem, onde os padrões não são consistentes. Assim, morfotipos que são similares na fase jovem, podem não apresentar similaridade na fase adulta. As localidades de Cruzília e Juiz de Fora apresentaram semelhança morfológica, exceto na fase jovem com a idade de 30 dias. Isso se deve ao fato de que entre algumas espécies de moluscos, na fase jovem dificilmente é possível a distinção de espécies, devido à grande similaridade dos padrões morfométricos da concha. O presente estudo demonstra que a aplicação de métodos morfométricos, em estudos de distinção e variabilidade de espécies, utilizando-se moluscos jovens, com padrões morfológicos ainda não estabelecidos, pode levar ao erro. Uma solução seria aplicar estes métodos apenas em moluscos reconhecidamente maduros, por exemplo, algumas espécies apresentam o bordo externo da abertura da concha, o perístoma, refletido.

Como resultado de estudos comparativos envolvendo populações da mesma espécie de áreas geográficas diferentes, ou ainda, espécies de um mesmo gênero ocupando habitats distintos, diversos autores encontraram relação entre a morfologia da concha e características físicas do ambiente. Neste contexto, as diferenças morfológicas encontradas parecem ser adaptações à diferentes pressões ambientais. Entretanto, alguns estudos mostram a ausência de relação entre as características ambientais e as diferenças morfológicas entre populações. Quando não existem

evidências de relação entre restrições ambientais e variação morfológica, os autores atribuem tal variação a fatores que atuaram no passado, tais como processos neutros ou pressões seletivas que deixaram de agir (CHIBA e DAVISON, 2007; FIORENTINO et al., 2008). O tipo de ambiente pode influenciar na morfologia da concha. Em geral, moluscos que habitam áreas de florestas primárias pouco alteradas com maior umidade e menores temperaturas, apresentam um maior crescimento da abertura da concha. Já os que habitam áreas de maior alteração antrópica, apresentam menor largura da abertura, isso pode estar relacionado à uma menor retenção de umidade e temperaturas maiores apresentadas nessas áreas, já que a serrapilheira é mais escassa (SANTOS e MONTEIRO, 2001). A menor área da abertura da concha tem sido interpretada como uma adaptação para reduzir a perda de água em espécimes em estivação, ou para baixar o centro de gravidade, impedindo que o molusco seja deslocado durante o período de inatividade (FIORENTINO et al., 2008).

No presente estudo, a relação de alometria entre a largura da abertura e a largura total da concha, assim como a relação entre o comprimento da abertura e a largura total da concha, indica que, ao longo do desenvolvimento dos moluscos, o crescimento da largura total da concha não é proporcional ao crescimento da largura e comprimento da abertura da concha. Portanto, a abertura da concha do molusco jovem é maior em relação ao seu tamanho corporal, quando comparado ao adulto, o que aumenta o risco de dessecação dos jovens. Uma maior mortalidade é comumente verificada na fase jovem de moluscos terrestres. Entretanto ocorrem estratégias reprodutivas que favorecem a sobrevivência desses jovens, como exemplo a retenção dos filhotes no útero do molusco adulto, em resposta a condições ambientais adversas. Um concha mais globosa com uma menor abertura permite evitar condições de risco, como a dessecação e a predação (CARVAJAL-RODRÍGUEZ et al., 2005), esse tipo de concha é verificado nos moluscos da espécie *Leptinaria unilamellata*, provavelmente é um dos fatores que favorece a sobrevivência do adulto.

As relações morfométricas fornecem instrumentos que permitem inferir sobre a forma e o padrão de crescimento da concha, como a relação altura/diâmetro que indica a forma da concha, se trocóide ou globóide. Os padrões expressos pelas relações entre o comprimento da espira e largura total da concha, e entre o comprimento total e a largura total da concha, indicam que a taxa de crescimento da espira superior à taxa de crescimento da largura total da concha e a expansão progressiva em largura à medida que a concha cresce, determinam a forma cônica, com base larga, característica da concha de *L. unilamellata*. Esses padrões podem complementar estudos de autoecologia, estabelecendo relações entre a forma da concha e o tipo de ambiente em que as espécies se encontram. De maneira geral, os autores observam que espécies que vivem em sítios úmidos e protegidos tendem a ter conchas com espiras altas e aberturas relativamente grandes,

enquanto espécies de habitats secos e desprotegidos tendem a ter conchas com espira baixa e abertura estreita (CHIBA e DAVISON, 2007).

Com respeito à ontogenia da concha, a alometria do crescimento varia ao longo do desenvolvimento dos moluscos e, dessa forma, nas diferentes idades, a relação entre as variáveis pode mudar. Como consequência, a forma final da concha é o resultado da interação entre os padrões de crescimento das diferentes variáveis durante todo o processo de formação da concha. Quando a morfologia final da concha é atingida, durante a fase adulta, o crescimento não determina mudanças na forma da concha, mas apenas acompanha o aumento em tamanho do molusco. Em poucas idades foi observada semelhança na alometria do crescimento dos morfotipos de cada localidade. Isso pode indicar que o processo de formação da concha varia entre os morfotipos levando à variabilidade morfológica observada no presente estudo. Embora o presente trabalho não nos permita falar sobre a origem da variabilidade morfológica dos espécimes provenientes das diferentes populações, os resultados do estudo sobre a alometria do crescimento nos possibilitam discutir algumas questões interessantes. As diferenças na morfologia da concha são provavelmente determinadas geneticamente, uma vez que os moluscos das diferentes populações foram criados sob condições experimentais idênticas e sujeitos às mesmas condições de temperatura e umidade. É interessante observar que essas diferenças se manifestam também na ontogenia da concha, de maneira que não apenas a forma final da concha do adulto é diferente, mas também todo o processo de formação da concha, representado pelas relações entre as variáveis morfométricas estudadas.

O estudo da ontogenia da concha também nos permite compreender os mecanismos estruturais, ao longo do desenvolvimento dos moluscos, que dão origem à diversidade de formas observadas nas diferentes espécies. No presente estudo, foi possível o entendimento do padrão de formação da concha de *L. unilamellata*, especialmente que origina a sua forma cônico-alongada. Durante a formação da concha de *L. unilamellata*, há sobreposição parcial das sucessivas voltas da concha, ao longo do desenvolvimento do molusco. A direção do crescimento nesse tipo de concha é inclinada, devido a isso foi verificado que nas conchas dessa espécie, as suturas são levemente inclinadas, indicando essa direção. As conchas cônicas apresentam sobreposição parcial, e em alguns casos nem mesmo há sobreposição das voltas. Diferentemente, nas conchas plano-espírais, a sobreposição das sucessivas voltas é completa, ou na maior parte das vezes quase completa.

No presente estudo, a variabilidade morfológica permaneceu entre os moluscos das diferentes populações mantidos nas mesmas condições laboratoriais, o que sugere que tais características nos padrões morfológicos e de crescimento, estão ligadas principalmente a fatores genéticos. Em moluscos terrestres, a baixa mobilidade e o conseqüente baixo fluxo gênico fazem com que

populações geograficamente separadas apresentem uma constituição genética significativamente distinta e em muitos casos sejam geneticamente adaptadas às condições ambientais locais. Em última instância, diferentes morfotipos de uma espécie, provenientes de populações geograficamente distintas, podem estar sujeitos a um evento de especiação. A maior parte das espécies de subulinídeos foi descrita com base na morfologia da concha (NAGGS, 1994) e, portanto, não há uma definição da identidade dessas espécies, fundamentada em ferramentas genéticas e no conceito biológico de espécie. Esse é o caso do gênero *Leptinaria*, cujas espécies só poderão ser claramente definidas após a realização de estudos que associem a abordagem morfológica ao seqüenciamento genético e experimentos envolvendo o cruzamento entre morfotipos. Tais estudos seriam essenciais para verificar se a variabilidade observada entre morfotipos distintos relaciona-se, ou não, a um provável evento de especiação.

**VARIABILIDADE MORFOLÓGICA E MOLECULAR EM POPULAÇÕES DE *Leptinaria unilamellata*
(d'Orbigny, 1835) (MOLLUSCA, PULMONATA, SUBULINIDAE)**

INTRODUÇÃO

Os gastrópodes pulmonados terrestres se caracterizam por serem hermafroditas, ou seja, possuem ambos os órgãos reprodutivos masculinos e femininos. Apresentam grande diversidade, estima-se que existam mais de 30.000 espécies, as quais ocupam uma ampla variedade de habitats terrestres. A história de vida e a biologia reprodutiva desses animais são igualmente diversas e provavelmente refletem a irradiação do grupo, sendo investigadas sob a ótica de diferentes áreas de conhecimento (BARKER, 2001; GÓMEZ, 2001; HEALY, 2001; HELLER, 2001). Dentre os principais aspectos abordados nos estudos de biologia reprodutiva de moluscos terrestres, a informação acerca da morfologia do sistema reprodutor se destaca, por fornecer importantes dados para a distinção das diferentes linhagens dentro do grupo e nos estudos de filogenia.

O conhecimento da morfologia dos órgãos, ductos e glândulas do sistema reprodutor permite elucidar o papel de cada uma dessas estruturas (JOOSE e REITZ 1969; GÓMEZ, 2001), discriminar as variações funcionais entre espécies (GÓMEZ, 2001), compreender suas estratégias reprodutivas (MONTEIRO et al., 1984; MONTEIRO e DIAS, 1989), subsidiar estudos de sistemática (BARKER, 2001) e, em certos casos, diferenciar espécies de um mesmo gênero (RODRIGUES e MARTINS, 2003).

Pouco é conhecido sobre a variabilidade anatômica intra e interpopulacional de moluscos pulmonados terrestres, apesar de as características do aparelho reprodutor serem importantes caracteres taxonômicos (FIORENTINO et al., 2008). O pouco conhecimento da variabilidade morfológica entre populações geograficamente separadas pode levar à criação de espécies taxonômicas que na verdade correspondem a uma única espécie biológica. Por outro lado, o isolamento reprodutivo entre populações nem sempre é evidente com base na morfologia e a incompatibilidade reprodutiva que levaria ao isolamento pré-copulatório pode ser determinada por diferenças morfológicas sutis e até mesmo por diferenças nos padrões comportamentais durante o acasalamento. Em muitos casos, a variabilidade anatômica pode indicar uma resolução taxonômica incipiente e a investigação refinada das causas da variabilidade morfológica, utilizando abordagens da genética e ferramentas moleculares, resulta na descoberta de complexos de espécies, nos quais os diferentes morfotipos são na verdade espécies biológicas distintas.

A maioria das espécies de subulinídeos é conhecida somente pela concha (NAGGS, 1994). No século XVIII, quando à morfologia da concha era atribuído um grande valor taxonômico, as

espécies do gênero *Leptinaria* Beck, 1839 eram consideradas de difícil e crítica diagnose, por apresentarem uma extensa amplitude de variação da concha, com morfologias extremas que se unem por morfologias intermediárias (TRYON e PILSBRY, 1906). Como resultado da história taxonômica desse grupo, pouco se conhece sobre a morfologia do sistema reprodutor e ainda menos sobre a variabilidade morfológica interpopulacional. Se por um lado é provável que muitas espécies taxonômicas descritas nesse período correspondam a mesma espécie biológica, por outro lado podem existir complexos de espécies sob uma denominação comum. Neste sentido, o estudo morfológico e molecular de espécies desse gênero e o conhecimento da variabilidade intra-específica seriam de grande auxílio para o estabelecimento de uma melhor resolução taxonômica e para a compreensão dos processos subjacentes à variabilidade morfológica.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo é verificar a ocorrência de variabilidade morfológica do sistema reprodutor e a variabilidade molecular de espécimes de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) de diferentes populações.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Obtenção e manutenção dos moluscos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Moluscos e Helminhos - Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Criações-matrizes foram estabelecidas com espécimes de *L. unilamellata* coletados nas seguintes localidades: município de Juiz de Fora, MG (21°44'29.65"S 43°21'19.65"O); município de Cruzília, MG (21° 50' 20" S, 44° 48' 28" W); município de Belo Horizonte, MG (19°55'57"S 46°56'320"O); município de Barra Mansa, RJ (22°31'59.14"S 44°9'54.21"O), e Floriano, distrito do município de Barra Mansa, RJ (22°31'59.14"S 44°9'54.20"O). Cada criação-matriz continha moluscos provenientes da mesma localidade, mantidos em caixas plásticas transparentes (14 cm em diâmetro, 9 cm em altura), fechadas com tecido de algodão e elástico. Cada caixa foi preenchida com três centímetros de terra vegetal, umedecida com 10 ml de água a intervalos de dois dias. Os moluscos foram alimentados *ad libitum* com alimento comercial para aves enriquecido com carbonato de cálcio (na proporção de 3:1) (BESSA e ARAÚJO, 1995a, b) e mantidos em condições naturais de luz e temperatura. Quando os moluscos trazidos do campo se reproduziram, filhotes recém-nascidos foram retirados das criações-matrizes e transferidos para novos terrários. Cada terrário continha aproximadamente 35 filhotes de moluscos da mesma localidade, os quais foram utilizados no estudo morfológico descrito a seguir.

5.2.2 Estudo morfométrico do sistema reprodutor

Das criações-matrizes das localidades anteriormente citadas, trinta moluscos de cada localidade com a idade de 80 dias, foram utilizados para o estudo da morfometria do sistema reprodutor. Os moluscos vivos foram colocados em pequenos vidros hermeticamente fechados completamente preenchidos com solução fisiológica, colocados a -20°C por aproximadamente 24 horas ou até que fosse verificada a morte dos animais. Após esse procedimento, a concha era retirada por quebra mecânica ao redor das suturas e os moluscos sem concha eram conservados em álcool 70%. Os indivíduos foram dissecados sob microscópio estereoscópico, utilizando pinças e tesoura microcirúrgicas, para que os órgãos do sistema reprodutor fossem evidenciados, sendo também conservados em álcool 70%. Foram tomadas medidas lineares utilizando ocular micrométrica adaptada ao microscópio. Para cada molusco das diferentes populações, foram realizadas as medidas: comprimento do ducto da bolsa copuladora (CdBC) e largura do ducto da bolsa copuladora (LdBC); comprimento da bolsa copuladora (CBC) e largura da bolsa copuladora (LBC); comprimento do epifalo (CE) e largura do epifalo (LE); comprimento do falo (CP) e largura do falo (LP); comprimento da bainha do pênis (CBP) e largura da bainha do pênis (LBP); comprimento do flagelo (CF) e largura do flagelo (LF); comprimento do oviduto (CO) e largura do oviduto (LO); comprimento parcial da vagina (CPV) e largura parcial da vagina (LPV), a qual compreendeu da junção do oviduto livre e ducto da espermateca ao ângulo peniano. Com as medidas dos órgãos mensurados, foram calculadas as seguintes razões: comprimento da bainha do pênis/largura da bainha do pênis (CBP/LBP); comprimento da bainha do pênis/comprimento do epifalo (CBP/CE); comprimento da bainha do pênis/comprimento do falo (CBP/CP); largura da bainha do pênis/largura do epifalo (LBP/LE); largura da bainha do pênis/largura do falo (LBP/LP); comprimento do epifalo/largura do epifalo (CE/LE); comprimento do epifalo/comprimento do falo (CE/CP); largura do epifalo/largura do falo (LE/LP) e comprimento do falo/largura do falo (CP/LP). Essas razões referem-se às relações morfométricas entre os órgãos da região proximal do aparelho reprodutor masculino.

5.2.3 Variabilidade morfológica interpopulacional

Para verificar a existência de variação na morfologia do sistema reprodutor dos moluscos das diferentes localidades, os valores de medidas lineares e razões dos órgãos do sistema reprodutor foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA, $p \leq 0,05$), seguido de teste-t, para identificar entre quais localidades as variáveis apresentaram diferenças significativas nas médias.

Para caracterizar as relações de similaridade entre os padrões morfométricos do sistema reprodutor dos moluscos de cada localidade foram calculados os valores da distância Euclidiana e realizada a análise de agrupamentos pelo método de agregação Ward, levando em conta a variância mínima entre os grupos, com a distância do tipo Euclidiana. Para verificar a possível separação dos moluscos das diferentes localidades, com base nas variáveis morfométricas, foi realizada a análise de função discriminante.

Previamente às análises, os valores das medidas lineares, bem como das razões, foram submetidos à transformação logarítmica (\log_{10}) para minimizar os desvios da normalidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Bioestat 5.0.

5.2.4 Estudo molecular

Extração do DNA

Este estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisas René-Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Foram utilizados espécimes das localidades de Juiz de Fora, Leopoldina, Barra Mansa e Floriano. O ácido desoxirribonucléico (DNA) genômico total foi extraído de fragmentos do pé dos moluscos utilizando o kit “Wizard Genomic DNA Purification kit” (Promega), de acordo com as instruções do fabricante e as modificações propostas por CALDEIRA et al. (2000). As amostras de tecido dos indivíduos de cada localidade foram rompidas mecanicamente em 200 μ l de solução de lise nuclear e incubadas a 37° C por 4 horas em 50 μ l de proteinase K; posteriormente, 80 μ l de solução de precipitação de proteína foram adicionados à mistura inicial. A solução foi agitada vigorosamente e centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um tubo limpo, contendo 200 μ l de isopropanol para precipitação do DNA. A mistura foi homogeneizada por inversão por 20 minutos e centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos. O DNA precipitado foi lavado com 300 μ l de etanol 70% e centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O “pellet” foi tratado com 25 μ l de solução de reidratação do DNA por 30 minutos a 65 ° C e armazenado a -20 ° C.

Amplificação da região espaçadora transcrita interna (ITS) pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A região espaçadora transcrita interna (ITS) do ácido desoxirribonucléico ribossomal (rDNA), que inclui o gene 5.8S e as regiões flanqueadoras ITS1 e ITS2 foi amplificada utilizando os *primers* ETTS2 (5`-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3`) e ETTS1 (5` - TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3`) ancorados respectivamente nas extremidades conservadas dos genes ribossomais 18S e 28S

(KANE & ROLLINSON, 1994). A amplificação pela cadeia da polimerase (PCR) foi realizada, segundo o protocolo proposto por CALDEIRA *et al.* (2000), em um volume de 10 μ l, consistindo de 1-10 ng de DNA, 10mM de Tris-HCl, pH 8,5, 200 μ M de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,8 U de Taq DNA polimerase, 50 mM de KCl e 1 pMol de cada primer. As reações foram cobertas com uma gota de óleo mineral e submetidas ao seguinte ciclo: desnaturação inicial por 5 minutos a 95°C, seguida por 32 ciclos com anelamento a 54 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 2 minutos, desnaturação a 95 °C por 45 segundos e extensão final a 72 °C por 5 minutos. Um controle negativo foi incluído em todas as amplificações. Três microlitros dos produtos de amplificação foram visualizados em géis de agarose com brometo de etídio a 0.8% para verificar a qualidade da amplificação. Os 7 μ l restantes foram misturados com 43 μ l de água para a digestão com as enzimas de restrição.

Análise pela técnica de polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)

Foram utilizadas doze enzimas de restrição (Amersham Life Science) *AluI*, *DdeI*, *HaeIII*, *RsaI*, *HapII*, *HpaII*, *NdeI*, *ClaI*, *SmaI*, *TaqI*, *SspI* e *NheI*. Um microlitro (10 a 12 unidades) de cada enzima foi utilizado para cada digestão, juntamente com 1,2 μ l dos respectivos tampões das enzimas e 10 μ l do produto de amplificação diluído, em um volume final de 12,2 μ l. A digestão foi realizada por 3,5 horas a 37 °C e foram avaliadas em géis de poliacrilamida 6%, corados pela prata. O perfil molecular dos espécimes de cada localidade foi comparado.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Variação morfológica interpopulacional de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano

Foram escolhidos espécimes de cada localidade com 80 dias de vida, devido à proximidade da fase de vida adulta, ou seja, com o completo desenvolvimento do sistema reprodutor. Foi possível definir padrões morfométricos característicos para os moluscos das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano. As medidas lineares e razões entre essas medidas do sistema reprodutor dos moluscos de cada localidade estão descritas nas tabelas 1 e 2 e figura 2. O teste ANOVA demonstrou que todas as variáveis utilizadas, exceto a largura da bolsa copuladora, diferiram significativamente entre as localidades (Tabela 3).

Tabela 22. Média, desvio Padrão e amplitude (mínimo e máximo) das razões entre medidas lineares do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Belo Horizonte, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ (medidas em micrômetros).

Órgãos mensurados (µm)	Juiz de Fora	Cruzília	Belo Horizonte	Barra Mansa	Floriano
CdBC	824 ± 164 (560-1280)	855 ± 154 (630-1155)	795 ± 110 (544-960)	1010 ± 140 (752-1280)	1097 ± 193 (800-1575)
LdBC	211 ± 25 (272-80)	149 ± 27 (80-189)	141 ± 23 (80-192)	161 ± 15 (128-192)	148 ± 24 (80-192)
CBC	660 ± 129 (448-960)	631 ± 102 (480-880)	553 ± 128 (320-960)	831 ± 113 (608-992)	730 ± 109 (480-960)
LBC	298 ± 64 (160-441)	302 ± 72 (160-464)	198 ± 43 (144-320)	292 ± 50 (192-368)	305 ± 68 (192-448)
CE	493 ± 101 (304-640)	729 ± 93 (560-882)	558 ± 103 (352-720)	518 ± 92 (320-640)	541 ± 124 (304-800)
LE	217 ± 54 (120-320)	174 ± 25 (144-240)	182 ± 34 (112-288)	147 ± 27 (96-208)	148 ± 55 (80-320)
CP	387 ± 78 (288-560)	375 ± 72 (192-496)	411 ± 83 (320-560)	572 ± 99 (320-800)	517 ± 127 (320-840)
LP	248 ± 72 (96-400)	338 ± 86 (96-512)	242 ± 51 (160-336)	269 ± 41 (176-320)	233 ± 54 (128-399)
CBP	1366 ± 238 (960-2100)	1582 ± 160 (1120-1890)	1384 ± 146 (1120-1600)	1536 ± 154 (1280-1840)	1540 ± 237 (960-2100)
LBP	221 ± 57 (120-320)	179 ± 39 (144-336)	176 ± 31 (96-256)	161 ± 18 (128-208)	160 ± 39 (80-256)
CF	581 ± 149 (240-960)	694 ± 126 (480-882)	619 ± 70 (480-768)	654 ± 109 (480-960)	722 ± 104 (480-960)
LF	124 ± 28 (80-160)	114 ± 23 (64-147)	100 ± 18 (64-144)	147 ± 24 (96-176)	153 ± 24 (112-210)
CO	1991 ± 354 (1440-2940)	2109 ± 220 (1760-2520)	1504 ± 191 (1120-2080)	1599 ± 219 (1120-1920)	1887 ± 342 (1280-2520)
LO	386 ± 71 (240-544)	387 ± 58 (240-464)	325 ± 60 (176-464)	510 ± 82 (320-640)	459 ± 59 (320-560)
CPV	267 ± 101 (160-480)	315 ± 64 (208-483)	410 ± 121 (160-640)	346 ± 102 (176-560)	358 ± 140 (160-640)
LPV	367 ± 97 (96-512)	380 ± 62 (176-480)	307 ± 56 (192-480)	386 ± 83 (160-640)	408 ± 71 (320-560)

Legenda = CdBC = comprimento do ducto da bolsa copuladora; LdBC = largura do ducto da bolsa copuladora; CBC = comprimento da bolsa copuladora; LBC = largura da bolsa copuladora; CE = comprimento do epifalo; LE = largura do epifalo; CP = comprimento do falo; LP = largura do falo; CBP = comprimento da bainha do pênis; LBP = largura da bainha do pênis; CF = comprimento do flagelo; LF = largura do flagelo; CO = comprimento do oviduto; LO = largura do oviduto; CPV = comprimento parcial da vagina; LPV = largura parcial da vagina.

Tabela 23. Média, desvio padrão e amplitude (mínimo e máximo) das razões entre medidas lineares do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, MG; Cruzília, MG; Belo Horizonte, MG; Barra Mansa, RJ e Floriano, RJ (medidas em micrômetros).

Razões (μm)	Barra Mansa	Floriano	Belo Horizonte	Cruzília	Juiz de Fora
CBP/LBP	9.67 ± 1.60 (7.27 - 13.13)	10.13 ± 2.80 (4.38 - 20)	8.14 ± 1.99 (5.63 - 10.83)	9.11 ± 1.73 (5 - 12.2)	8.33 ± 1.40 (4.5 - 11)
CBP/CE	3.03 ± 0.45 (2.5 - 4.2)	2.95 ± 0.69 (2 - 4.6)	2.55 ± 0.49 (2 - 4.31)	2.20 ± 0.29 (1.43 - 2.86)	3.77 ± 1.04 (1.91 - 6.02)
CBP/CP	2.76 ± 0.51 (2 - 4)	3.13 ± 0.84 (1.63 - 5.75)	3.52 ± 0.85 (2.29 - 4.75)	4.42 ± 1.13 (2.33 - 7.92)	4.89 ± 1.63 (2.5 - 8.5)
LBP/LP	0.62 ± 0.14 (0.4 - 1)	0.73 ± 0.25 (0.26 - 1.44)	0.75 ± 0.14 (0.52 - 1.07)	0.60 ± 0.34 (0.28 - 2)	0.98 ± 0.41 (0.39 - 2.5)
LBP/LE	1.12 ± 0.19 (0.83 - 1.57)	1.19 ± 0.48 (0.4 - 3)	0.98 ± 0.13 (0.33 - 1.2)	1.03 ± 0.18 (1 - 2)	1.24 ± 0.36 (0.75 - 2)
CE/LE	3.66 ± 1.02 (2.5 - 6.7)	4.07 ± 1.74 (1.75 - 10)	3.15 ± 0.78 (1.22 - 6)	4.27 ± 0.78 (3 - 5.78)	2.39 ± 0.71 (1.24 - 4.44)
CE/CP	0.92 ± 0.18 (0.6 - 1.33)	1.09 ± 0.29 (0.5 - 1.82)	1.42 ± 0.43 (0.76 - 2.25)	2.02 ± 0.5 (1.23 - 3.58)	1.29 ± 0.26 (0.95 - 2)
LE/LP	0.55 ± 0.15 (0.35 - 1)	0.70 ± 0.42 (0.26 - 2.5)	0.78 ± 0.24 (0.52 - 1.8)	0.56 ± 0.23 (0.28 - 1.5)	0.95 ± 0.40 (0.39 - 2.5)
CP/LP	2.16 ± 0.47 (1 - 3.45)	2.33 ± 0.79 (1.11 - 4.44)	1.77 ± 0.53 (1.05 - 3.2)	1.26 ± 0.80 (0.48 - 5)	1.70 ± 0.61 (0.8 - 3.1)

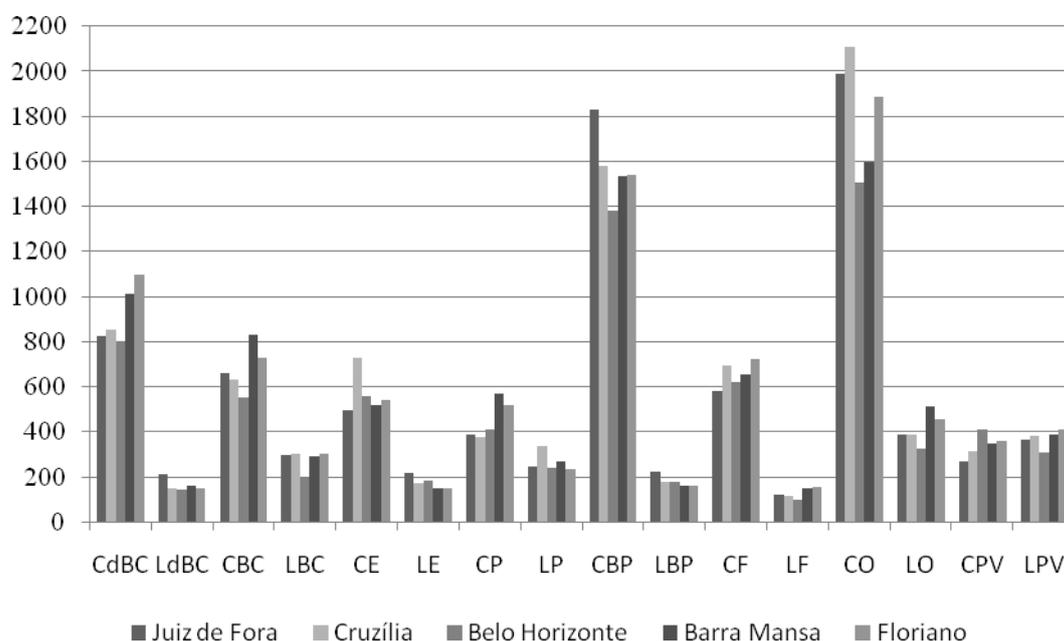


Gráfico 7. Valores médios das medidas do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano, na idade de 80 dias (medidas em micrômetros). CdBC = comprimento do ducto da bolsa copuladora; LdBC = largura do ducto da bolsa copuladora; CBC = comprimento da bolsa copuladora; LBC = largura da bolsa copuladora; CE = comprimento do epifalo; LE = largura do epifalo; CP = comprimento do falo; LP = largura do falo; CBP = comprimento da bainha do pênis; LBP = largura da bainha do pênis; CF = comprimento do flagelo; LF = largura do flagelo; CO = comprimento do oviduto; LO = largura do oviduto; CPV = comprimento parcial da vagina; LPV = largura parcial da vagina.

Tabela 24. Resultado do ANOVA para as variáveis da morfometria do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano, nas idades de 80 dias.

Resultado ANOVA		
Morfometria do sistema reprodutor		
	F	p
CdBC	21.4	0*
LdBC	ns	ns
CBC	24.39	0*
LBC	16.9	0*
CE	24.5	0*
LE	14.8	0*
CP	25.89	0*
LP	13.59	0*
CBP	9.69	0*
LBP	12.31	0*
CF	7.33	0.0001*
LF	26.61	0*
CO	26.6	0*
LO	35.12	0*
CPV	7.09	0.0001*
LPV	7.76	0.0001*

CdBC = comprimento do ducto da bolsa copuladora; LdBC = largura do ducto da bolsa copuladora; CBC = comprimento da bolsa copuladora; LBC = largura da bolsa copuladora; CE = comprimento do epifalo; LE = largura do epifalo; CP = comprimento do falo; LP = largura do falo; CBP = comprimento da bainha do pênis; LBP = largura da bainha do pênis; CF = comprimento do flagelo; LF = largura do flagelo; CO = comprimento do oviduto; LO = largura do oviduto; CPV = comprimento parcial da vagina; LPV = largura parcial da vagina. *: diferença significativa entre as médias. ns: diferença não significativa entre as médias.

O comprimento da bolsa copuladora, largura do epifalo, largura do flagelo e largura do oviduto foram as medidas lineares que mais diferiram entre os moluscos de todas as localidades e estas, portanto, são as variáveis com maior robustez para a distinção dos morfotipos observados. O complexo peniano apresentou entre os moluscos de cada localidade uma maior variabilidade, sendo, portanto a estrutura morfológica mais importante na distinção dos morfotipos (Tabela 4).

Tabela 25. Resultado do test-t das variáveis do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano, na idade de 80 dias.

	CdBC		LdBC		CBC		LBC		CE		LE		CP		LP	
	t	p	t	p	t	p	T	p	t	p	t	p	t	p	t	p
BM X FLO	2.16	0.03*	ns	ns	3.38	0.0009*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	2.24	0.0268*	2.22	0*
BM X BH	5.39	0*	ns	ns	9.24	0*	6.02	0*	ns	ns	3.31	0.0012*	6.63	0*	ns	ns
BM X JF	4.65	0*	ns	ns	5.70	0*	ns	ns	ns	ns	6.65	0*	7.62	0*	ns	ns
BM X CR	3.88	0.0002*	ns	ns	6.64	0*	ns	ns	7.90	0*	2.53	0.0124*	8.11	0*	4.23	0*
FLO X BH	7.55	0*	ns	ns	5.86	0*	6.81	0*	ns	ns	3.15	0.0019*	4.39	0*	ns	ns
FLO X JF	6.81	0*	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	6.49	0*	5.38	0*	ns	ns
FLO X CR	6.05	0*	ns	ns	3.26	0*	Ns	ns	7.04	0*	2.38	0.0187*	5.87	0*	6.45	0*
BH X JF	ns	ns	ns	ns	3.53	0.0005*	6.41	0*	6.42	0*	3.34	0.0011*	ns	ns	ns	ns
BH X CR	ns	ns	ns	ns	2.59	0*	6.62	0*	8.85	0*	ns	ns	ns	ns	5.90	0*
JF X CR	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	4.16	0.0001*	ns	ns	5.55	0*

	CBP		LBP		CF		LF		CO		LO		CPV		LPV	
	t	p	t	p	t	p	T	p	t	p	t	P	t	p	t	p
BM X FLO	ns	ns	ns	ns	2.29	0.02*	ns	ns	4.07	0.0001*	3	0.0032*	ns	ns	ns	ns
BM X BH	2.06	0.0406*	ns	ns	ns	ns	7.75	0*	ns	ns	10.78	0*	2.28	0.024*	4.09	0.0001
BM X JF	4.01	0.0001*	6.01	0*	2.47	0.0144*	3.88	0.0002*	5.54	0*	7.28	0*	2.80	0.0057*	ns	ns
BM X CR	ns	ns	ns	ns	ns	ns	5.37	0*	7.21	0*	7.16	0*	ns	ns	ns	ns
FLO X BH	2.12	0.0359*	ns	ns	3.48	0.0007*	8.69	0*	ns	ns	7.78	0*	ns	ns	5.23	0*
FLO X JF	3.96	0.0001*	6.10	0*	4.77	0*	4.81	0*	ns	ns	4.28	0*	3.26	0.0014*	2.13	0.0351
FLO X CR	ns	ns	ns	ns	ns	ns	6.31	0*	3.14	0.002*	4.16	0.0001*	ns	ns	ns	ns
BH X JF	6.07	0*	4.52	0*	ns	ns	3.87	0.0002*	6.49	0*	3.51	0.0006*	5.082	0*	3.11	0.022
BH X CR	2.69	0.0079*	ns	ns	2.56	0.0116*	2.38	0.0186*	8.56	0*	3.62	0.0004*	3.37	0.001*	3.78	0.002*
JF X CR	3.38	0.0009*	4.20	0*	3.84	0.0002*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

CdBC = comprimento do ducto da bolsa copuladora; LdBC = largura do ducto da bolsa copuladora; CBC = comprimento da bolsa copuladora; LBC = largura da bolsa copuladora; CE = comprimento do epifalo; LE = largura do epifalo; CP = comprimento do pênis; LP = largura do pênis; CBP = comprimento da bainha do pênis; LBP = largura da bainha do pênis; CF = comprimento do flagelo; LF = largura do flagelo; CO = comprimento do oviduto; LO = largura do oviduto; CPV = comprimento parcial da vagina; LPV = largura parcial da vagina. *: diferença entre as médias é significativa. ns: a diferença entre as médias não é significativa.

O sistema reprodutor dos moluscos provenientes das localidades de Barra Mansa e Floriano, bem como a dos moluscos provenientes das localidades de Juiz de Fora e Cruzília apresentaram morfometria mais próxima. Essa relação de semelhança morfológica não foi encontrada para o morfotipo de Belo Horizonte, que foi distinguido dos morfotipos de Barra Mansa, Floriano, Juiz de Fora e Cruzília pelo mesmo número de variáveis morfométricas.

Não foi possível distinguir os morfotipos de Barra Mansa e Floriano pela largura da bolsa copuladora, comprimento e largura do epifalo, comprimento e largura da bainha do pênis, comprimento e largura do flagelo e comprimento e largura parcial da vagina. Entretanto, os valores médios do comprimento da bolsa copuladora, comprimento e largura do falo e largura do oviduto, foram significativamente mais altos para o morfotipo de Barra Mansa, enquanto os sistemas reprodutores do morfotipo de Floriano apresentaram maior comprimento do ducto da bolsa copuladora e comprimento do oviduto. As diferenças entre essas medidas lineares se refletiram em diferenças significativas entre todas as razões calculadas para os dois morfotipos. Os sistemas reprodutores do morfotipo de Barra Mansa apresentaram valor mais alto apenas para a razão entre o comprimento da bainha do pênis e o comprimento do epifalo.

Os morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília não foram distinguidos pelo comprimento do ducto da bolsa copuladora, comprimento e largura da bainha do pênis, comprimento do epifalo e falo, largura do flagelo, comprimento e largura do oviduto e comprimento e largura parcial da vagina. Entretanto, os valores médios da largura do epifalo e largura da bainha do pênis, foram significativamente mais altos para o morfotipo de Juiz de Fora, enquanto os sistemas reprodutores do morfotipo de Cruzília apresentaram maior largura do falo, comprimento da bainha do pênis e comprimento do flagelo. As diferenças entre essas medidas lineares se refletiram em diferenças significativas entre todas as razões calculadas para os dois morfotipos. Os sistemas reprodutores do morfotipo de Juiz de Fora apresentaram valores mais altos para as razões entre o comprimento da bainha do pênis e comprimento do epifalo, comprimento da bainha do pênis e comprimento do falo, largura da bainha do pênis e largura do falo, largura da bainha do pênis e largura do epifalo, largura do epifalo e largura do falo e entre comprimento do falo e largura do falo.

O morfotipo de Belo Horizonte apresentou semelhança com os morfotipos de Barra Mansa e Floriano no comprimento do epifalo, largura do falo, largura da bainha do pênis, comprimento do oviduto, comprimento do flagelo e comprimento parcial da vagina. Entretanto, demonstrou valores significativamente maiores para a largura do epifalo. As diferenças entre essas medidas lineares se refletiram em diferenças significativas entre todas as razões calculadas para esses morfotipos. O sistema reprodutor do morfotipo de Belo Horizonte apresentou maiores valores para as razões entre

o comprimento da bainha do pênis e comprimento do falo, largura da bainha do pênis e largura do falo, comprimento do epifalo e comprimento do falo e entre a largura do epifalo e largura do falo.

Não foi possível distinguir o morfotipo de Belo Horizonte, em relação aos morfotipos das localidades de Juiz de Fora e Cruzília, no comprimento do ducto da bolsa copuladora, largura do epifalo, comprimento do falo, largura do falo, largura da bainha do pênis e comprimento do flagelo. Entretanto, o morfotipo de Belo Horizonte apresentou valores significativamente maiores para o comprimento parcial da vagina. As diferenças entre essas medidas lineares se refletiram em diferenças significativas entre todas as razões calculadas para esses morfotipos. O morfotipo de Belo Horizonte apresentou maior valor para a razão entre o comprimento do falo e largura do falo e valores menores para todas as outras razões calculadas.

O sistema reprodutor dos moluscos das localidades de Juiz de Fora, Cruzília, Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano, apresentou uma morfologia pouco variável entre os morfotipos. A variabilidade morfológica foi verificada na forma da bolsa copuladora, tamanho da vagina, calibre do complexo peniano, e no ângulo de inclinação do epifalo em relação ao falo.

A morfologia do sistema reprodutor dos moluscos da localidade de Juiz de Fora apresentou a forma da bolsa copuladora variando de arredondada a ovalada, que se destaca em relação ao ducto da bolsa copuladora. A vagina é curta, sendo menor em comprimento em relação à sua largura. Foi verificado que o complexo peniano é uniforme, ou seja, o falo e o epifalo possuem o mesmo calibre, sendo que o último órgão possui uma curvatura no primeiro terço médio proximal. Em relação ao falo, o epifalo possui um ângulo de inclinação de aproximadamente 45° em relação ao restante do complexo peniano.

O morfotipo da localidade de Cruzília possui relativamente aos moluscos das outras localidades, um sistema reprodutor com maiores dimensões no complexo peniano, bem como um músculo retrator bem desenvolvido. A bolsa copuladora possui formato com variação de arredondada a ovalada alongada, e se destaca em relação a seu ducto, a vagina é curta com uma largura maior que o seu comprimento. O calibre do falo é maior do que em relação ao epifalo, porém este último apresenta um maior comprimento. A curvatura presente no epifalo é mais suave do que no sistema reprodutor dos moluscos da localidade de Juiz de Fora, entretanto, o epifalo em relação ao falo possui um ângulo de aproximadamente 90° em relação ao restante do complexo peniano.

Os moluscos da localidade de Belo Horizonte possuem bolsa copuladora ovalada, filiforme, que não se essa bolsa não se ressalta em relação ao ducto da bolsa copuladora, sendo quase contínua ao ducto. A vagina é alongada, com um maior comprimento em relação a sua largura. O complexo

peniano apresenta aproximadamente dimensões uniformes do falo em relação ao epifalo, o qual possui uma curvatura suave próxima da sua região mediana. Em alguns espécimes foi verificado um ângulo de inclinação do epifalo em relação ao falo de 45°, entretanto, esse ângulo pode não estar presente.

O sistema reprodutor dos moluscos da localidade de Barra Mansa e Floriano se caracterizou por possuir as menores dimensões no complexo peniano, entre os morfotipos das demais localidades. Esses morfotipos, igualmente apresentaram uma maior semelhança em com relação à morfologia do sistema reprodutor, tais como uma vagina curta de tamanho uniforme, ou seja, com o comprimento aproximadamente igual ao tamanho da largura; falo e epifalo de pequeno calibre, com o falo um pouco maior que o epifalo e não foi verificado um ângulo de inclinação do epifalo em relação ao falo. A variação entre esses morfotipos foi verificada no formato da bolsa copuladora que se destaca do duto. No morfotipo de Barra Mansa, a bolsa copuladora possui formato que varia de arredondada a ovalada alongada, enquanto que no morfotipo de Floriano a bolsa copuladora possui um formato ovalado alongado.

Pelos resultados da análise Euclidiana, foi possível observar que os morfotipos das localidades de Barra Mansa e Floriano apresentaram a menor distância e portanto, padrões morfométricos mais similares. O maior valor de distância Euclidiana encontrado para os morfotipos de Belo Horizonte e Juiz de Fora, indicam a menor semelhança entre a morfologia do sistema reprodutor dos moluscos dessas duas localidades (Tabela 5).

Tabela 26. Distância Euclidiana da morfometria do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 80 dias.

	BM	FLO	BH	JF	CR
80 dias					
Barra Mansa (BM)	0	---	---	---	---
Floriano (FLO)	2.8443	0	---	---	---
Belo Horizonte (BH)	6.9506	7.1234	0	---	---
Juiz de Fora (JF)	6.9309	7.1248	7.1352	0	---
Cruzília (CR)	6.07	5.569	6.2827	5.9845	0
Menor distância (BM e FLO)	2.8443	---	---	---	---
Maior distância (BH e JF)	7.1352	---	---	---	---

Na análise de agrupamentos para as variáveis das medidas do sistema reprodutor entre as localidades, foram encontrados dois agrupamentos similares, com 45% de distância entre eles. No

primeiro grupo os morfotipos das localidades de Juiz de Fora, Cruzília e Belo Horizonte são relacionados, sendo que Juiz de Fora e Cruzília demonstraram padrões morfométricos mais similares entre si com 66% de distância, enquanto que o morfotipo da localidade de Belo Horizonte se apresentou como grupo externo, com 77% de distância. No segundo agrupamento, foi encontrada uma alta similaridade entre os morfotipos de Barra Mansa e Floriano, com somente 31% de distância entre os dois morfotipos (Figura 3).

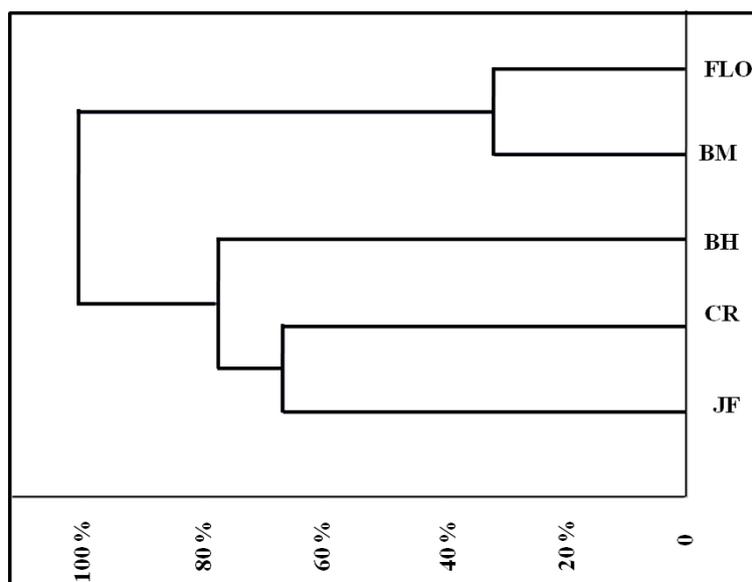


Gráfico 8. Análise de agrupamentos da morfometria do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 80 dias. JF – moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; CR – moluscos provenientes da localidade de Cruzília; BH – moluscos provenientes da localidade de Belo Horizonte; BM – moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; FLO - moluscos provenientes da localidade de Floriano.

A análise discriminante foi aplicada às todas as medidas lineares tomadas dos seguintes órgãos: bolsa copuladora (Figura 4A); complexo peniano (Figura 4B); oviduto e vagina (Figura 4C), com o objetivo de separar diferentes grupos definidos pela similaridade entre as variáveis. Esses órgãos foram escolhidos devido às análises discriminantes aplicadas a cada órgão separadamente não terem sido significativas. Além disso, foram as regiões que demonstraram maior variabilidade morfológica entre os morfotipos, mas com algumas morfometrias relacionadas às demais localidades.

Nos resultados da análise discriminante aplicada às medidas lineares da bolsa copuladora, complexo peniano e oviduto e vagina, a distribuição dos dados nos gráficos, em relação ao eixo y, indica a maior semelhança morfológica entre os morfotipos de Barra Mansa e Floriano, bem como entre os morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília.

A análise discriminante aplicada à bolsa copuladora demonstrou que a morfologia dessa região se apresenta similar entre os morfotipos de Barra Mansa e Floriano, bem como entre os morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília. O morfotipo de Belo Horizonte demonstrou ser um grupo mais próximo desses dois últimos morfotipos. Entretanto, os dados referentes à todos os morfotipos se apresentam relativamente dispersos e se sobrepõem em alguns pontos. Essa distribuição dos dados no gráfico indica que a separação dos morfotipos não é robusta.

Diferentemente, a análise aplicada ao complexo peniano, evidenciou a distinção mais significativa de dois agrupamentos de morfotipos similares, um reunindo os morfotipos de Cruzília e Juiz de Fora, e o outro os morfotipos de Belo Horizonte, Barra Mansa e Floriano. A sobreposição dos dados referentes aos morfotipos de Barra Mansa e Floriano indica que dentro do segundo agrupamento citado, esses apresentam maior proximidade morfológica entre si do que ao morfotipo de Belo Horizonte.

A análise discriminante aplicada conjuntamente ao oviduto e a vagina demonstrou separação de grupos similares, entretanto, não muito bem definidos. Os moluscos provenientes de Barra Mansa e de Floriano apresentaram morfologias similares. Os moluscos de Juiz de Fora e Cruzília igualmente demonstraram morfologias próximas. A morfologia do oviduto e vagina dos moluscos da localidade de Belo Horizonte está relacionada tanto aos moluscos de Juiz de Fora, quanto aos de Barra Mansa e Floriano.

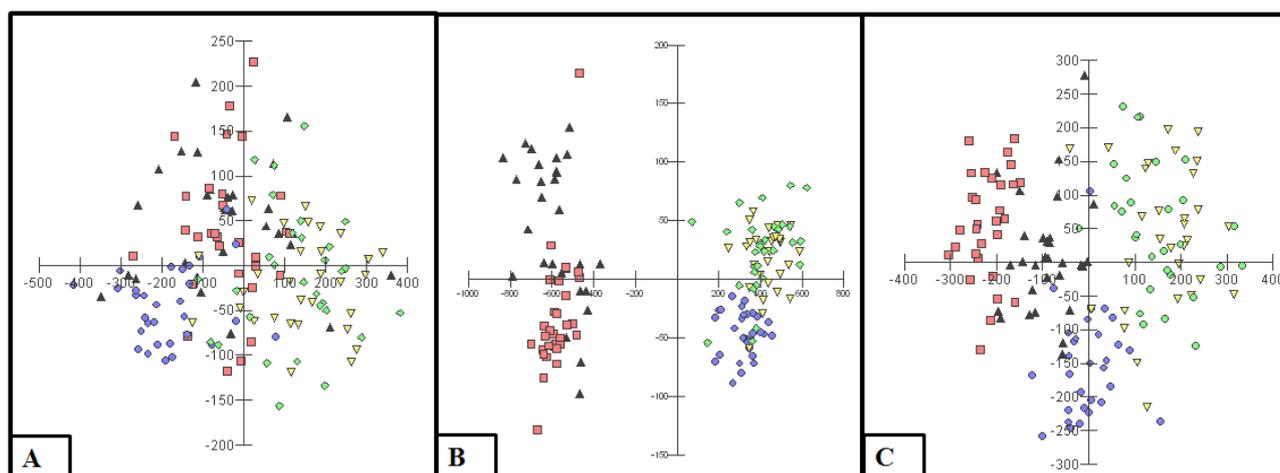
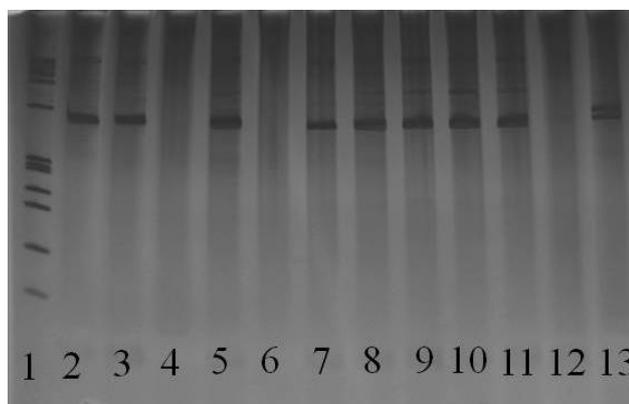


Gráfico 9. Análise discriminante da morfometria do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* de diferentes localidades na idade de 80 dias, Bolsa copuladora (A), Complexo peniano (B) e Oviduto e vagina (C). ▲ – moluscos provenientes da localidade de Juiz de Fora; ■ – moluscos provenientes da localidade de Cruzília; ● – moluscos provenientes da localidade de Belo Horizonte; ▼ - moluscos provenientes da localidade de Barra Mansa; ◆ - moluscos provenientes da localidade de Floriano.

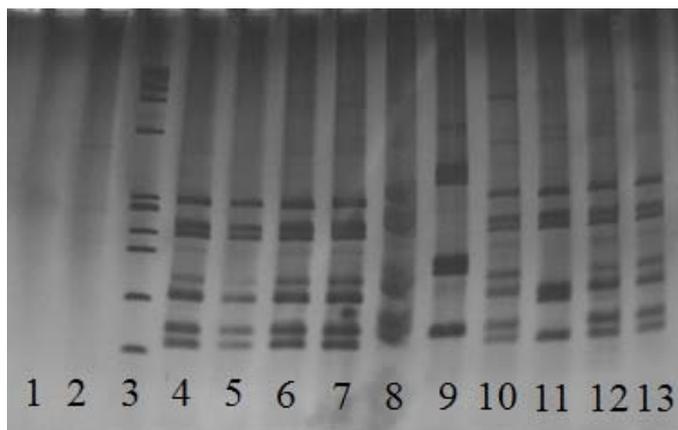
5.3.2 Estudo molecular

A região espaçadora transcrita interna (ITS) do rDNA dos espécimes de *L. unilamellata* das localidades de Juiz de Fora, Barra Mansa, Leopoldina foi amplificada com sucesso. Na figura 5, estão representados os produtos amplificados por PCR.



Fotografia 11. Produtos de amplificação por PCR, correspondentes à região ITS do rDNA de *Leptinaria unilamellata*. Canaletas: 1. Padrão de peso molecular; 2 e 3. Moluscos da localidade de Juiz de Fora, MG; 4. Resultado negativo, DNA de moluscos da localidade de Juiz de Fora não amplificado; 5. Molusco da localidade de Juiz de Fora, MG; 6. Resultado negativo, DNA de moluscos da localidade de Floriano não amplificado; 7, 8, 9, 10 e 11. Moluscos da localidade de Floriano, RJ; 12. Resultado negativo, DNA de moluscos da localidade de Leopoldina não amplificado; 13. Molusco da localidade de Leopoldina, MG.

As enzimas *HpaII*, *NdeI*, *ClaI*, *SmaI*, *SspI* e *NheI*, não encontraram sítios de restrição em nenhum dos espécimes analisados de *L. unilamellata*. Para todos os moluscos das localidades utilizadas foram encontrados sítios de restrição, com a utilização das enzimas *AluI*, *DdeI*, *RsaI*, *TaqI*, *HapII*, *HaeIII*, entretanto, não ocorreram polimorfismos entre os sítios, resultando em perfis moleculares similares. Na figura 6, estão apresentados os perfis de restrição obtidos pela digestão dos fragmentos da região ITS do rDNA de *L. unilamellata*, com a enzima e restrição *HapII*.



Fotografia 12. Gel de poliacrilamida com os perfis de restrição obtidos pela digestão dos fragmentos da região ITS do rDNA de *Leptinaria unilamellata*. Canaletas: 1. Controle negativo; 2. Controle positivo; 3. Padrão; 4 e 5. Moluscos da localidade de Barra Mansa, RJ; 6. Molusco da localidade de Leopoldina, MG; 7, 8, 9 e 10. Moluscos da localidade de Juiz de Fora; 11. Molusco da localidade de Barra Mansa, RJ; 12 e 13. Moluscos da localidade de Floriano, RJ.

5.4 DISCUSSÃO

Os gastrópodes pulmonados possuem um sistema reprodutor morfológica e funcionalmente complexo (DUNCAN, 1975; GÓMEZ, 2001). Suas funções primárias são a produção de espermatozoides e oócitos; armazenamento e transporte de gametas maduros em um meio adequado; exercer papéis estruturais e fisiológicos nos processos de corte e cópula; transferência de esperma endógeno aos dutos reprodutivos do parceiro; recepção de esperma exógeno; oferecer um sítio e microambiente próprios para a fertilização do oócito; recobrir os zigotos com camadas nutritivas e protetoras; reabsorção de produtos reprodutivos remanescentes e, finalmente, a ovipostura (GÓMEZ, 2001). A complexidade morfológica permite a diferenciação de espécies, enquanto a complexidade funcional reflete nos sistemas elaborados de comportamento sexual, originados pelo conflito sexual entre a função feminina e masculina (LEONARD, 1991).

O conhecimento gerado por estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor de gastrópodes pulmonados tem contribuído significativamente para a compreensão da história evolutiva desse grupo. Além disso, tais estudos fornecem as informações necessárias para a resolução de questões de natureza prática, como a correta identificação de espécies, além do controle e manejo de populações. A morfologia corrobora estudos comportamentais e ecológicos no aspecto da biologia reprodutiva e história de vida, como os processos envolvidos no acasalamento, digestão e armazenamento de gametas, seleção copulatória, entre outros aspectos.

Devido à ampla distribuição da família Subulinidae, torna-se necessário definir o correto limite entre as espécies, entretanto há dificuldades, como o estabelecimento de algumas sinonímias (NAGGS, 1994). No caso dos Subulinidae, muitas espécies são citadas para o Brasil, nos gêneros *Leptinaria*, *Subulina*, *Opeas*, *Megaspira*, *Obeliscus*, dentre outros. As espécies desses gêneros apresentam morfologia e habitat semelhantes. Os estudos acerca da morfologia interna de espécies dessa família podem levar a uma delimitação mais segura na sistemática (ARAÚJO, 1982).

A discriminação entre espécies de gastrópodes terrestres através de características morfológicas, nem sempre é suficiente devido as similaridades morfológicas entre espécies (CHOH et al., 2006) e pelas variações morfológicas existentes entre populações de uma mesma espécie (CALDEIRA et al., 2000). Nestes casos, o uso de métodos moleculares em associação com os aspectos morfológicos tem se mostrado muito útil ajudando a esclarecer se diferentes populações pertencem ou não a uma mesma espécie (RAAHAUGE e KRISTENSEN, 2000; CHOH et al., 2006), bem como separar espécies que são indistinguíveis, quando a identificação é baseada somente na morfologia da concha (SPATZ et al., 1999). Além disso, os estudos morfológicos podem ser corroborados por estudos moleculares, e estes potencialmente fornecem caracteres para análise filogenética. Devido ao desenvolvimento dos órgãos do sistema reprodutivo ser considerado intraespecífico, sazonal e variável fisiologicamente em Stylommatophora, e de difícil identificação em indivíduos imaturos, a identificação molecular pode ser aplicada na diferenciação de linhagens dentro do grupo (JORDAENS, 2006). Sobretudo, estudos que envolvam métodos anatômicos conjuntamente com moleculares e morfométricos têm sido utilizados para examinar as relações interespecíficas em moluscos (KAMEDA et al., 2007).

As características do sistema reprodutor dos moluscos pulmonados apresentam grande variação quanto à forma e função das estruturas que o compõem, especialmente no que diz respeito às estruturas masculinas envolvidas no processo de cópula. Os resultados do presente estudo evidenciam a existência de variação significativa entre as medidas lineares do sistema reprodutor de *L. unilamellata* de diferentes populações, resultando em diferenças morfométricas significativas. Também foram verificadas diferenças significativas entre as razões estabelecidas a partir de medidas lineares dos órgãos do complexo peniano. É possível que essas diferenças morfológicas levem à incompatibilidade mecânica durante o acasalamento, levando ao isolamento pré-copulatório. Outros estudos, envolvendo experimentos de acasalamento de indivíduos de populações distintas, deverão ser conduzidos para responder a essa questão.

Entre os Stylommatophora, a morfologia do complexo peniano é muitas vezes espécie-específica e essa variação é interpretada como uma forma de reforço das barreiras reprodutivas

entre espécies (HEALY, 2001). A genitália terminal desses pulmonados geralmente apresenta um conjunto elaborado de estruturas relacionadas à cópula, assim como estruturas para a produção e recepção de espermatozoides e órgãos estimuladores auxiliares (BARKER, 2001). A morfologia do aparelho genital masculino integra o conjunto de critérios utilizados na sistemática de vários pulmonados (ARAÚJO, 1982; ARAÚJO e BESSA, 1993; NAGGS, 1994; SALGADO et al., 1995).

A morfologia do sistema reprodutor dos moluscos da localidade de Cruzília foi o que mais diferiu dentre os demais morfotipos, principalmente no que diz respeito ao complexo peniano. O morfotipo da localidade de Belo Horizonte apresentou-se como um grupo externo relacionado aos morfotipos de Cruzília e Juiz de Fora, este fato confirmou os padrões morfométricos encontrados. A morfologia dos moluscos da localidade de Belo Horizonte foi mais relacionada a morfologia dos moluscos das localidades de Cruzília e Juiz de Fora, do que aos morfotipos de Barra Mansa e Floriano. É provável que a distância geográfica entre as localidades se reflita na distância morfológica. Estudos prévios mostram a diminuição da similaridade morfológica entre populações dentro de uma amplitude de variação geográfica (FIORENTINO et al., 2008).

Confirmando os padrões encontrados pelas análises morfológicas e padrões morfométricos encontrados pelo testes ANOVA e teste-t, pelos resultados da análise Euclidiana e da análise de agrupamentos foi possível observar que os morfotipos das localidades de Barra Mansa e Floriano apresentaram maior semelhança. Na última análise citada, também foi confirmado que os morfotipos das localidades de Juiz de Fora e Cruzília apresentaram padrões morfométricos similares, enquanto que os moluscos da localidade de Belo Horizonte demonstraram estar mais relacionados a estas localidades. A análise discriminante foi aplicada às medidas lineares da bolsa copuladora, complexo peniano e oviduto e vagina, esses órgãos foram escolhidos devido às análises discriminantes aplicadas a cada órgão separadamente não terem sido significativas. Além disso, demonstraram maior variabilidade morfológica entre os morfotipos, em relação às demais variáveis utilizadas. Os padrões de similaridade entre os morfotipos também foram confirmados através desta análise, a distribuição dos dados nos gráficos, em relação ao eixo y, indicou uma maior semelhança morfológica entre os morfotipos de Barra Mansa e Floriano, bem como entre os morfotipos de Juiz de Fora e Cruzília. Entretanto, a variabilidade morfológica não foi corroborada pelo perfil molecular dos moluscos das localidades de Juiz de Fora, Barra Mansa, Leopoldina e Floriano, gerado através da técnica de PCR-RFLP. Novos estudos utilizando outras regiões-alvo do DNA de *L. unilamellata* deverão ser conduzidos para se verificar a existência de variabilidade molecular entre os espécimes das diferentes populações observadas no presente trabalho.

O hermafroditismo nos moluscos terrestres leva a mecanismos de seleção e conflito sexual, diferente dos animais gonocoristas (BEESE et al., 2005, EVANNO et al., 2005). Esses mecanismos podem favorecer o isolamento reprodutivo e, conseqüentemente, a diferenciação genética e morfológica das populações isoladas. Nesse contexto, o estudo da morfometria do sistema reprodutor pode resultar na constatação de diferentes padrões morfológicos, possibilitando a distinção de morfotipos, e da existência de variabilidade em diferentes populações isoladas geograficamente.

Devido a morfologia do sistema reprodutor hermafrodita, estar fortemente associada com o sucesso de acasalamento em moluscos terrestres (GÓMEZ, 2001), a adoção de diferentes padrões visa a otimização do sucesso reprodutivo, caracterizando a história de vida adotada pelo organismo (BEESE et al., 2006). As características morfológicas do sistema reprodutor permitem que esses animais exerçam a seleção pós-copulatória, como por exemplo, uma espermateca subdividida em túbulos (EVANNO e MADEC, 2007). A seleção sexual tem um papel fundamental como mecanismo que favorece a seleção a favor de comportamentos associados ao sucesso de acasalamento, escolha do parceiro e uma maior fecundidade.

As variações existentes entre os morfotipos foram verificadas principalmente no que diz respeito aos órgãos da porção proximal do sistema reprodutor dessa espécie. Isso indica que os órgãos do sistema reprodutor envolvidos no sucesso do acasalamento sofrem maiores pressões seletivas.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos durante a presente dissertação, pode-se concluir que:

No presente estudo, foi encontrada uma relação entre as características de história de vida de *L. unilamellata* devido à alocação diferencial de energia. A distribuição do esforço reprodutivo em muitos eventos, nos quais um pequeno número de filhotes de tamanho relativamente grande são produzidos, associada à retenção de ovos, caracteriza um investimento em longo prazo no sucesso reprodutivo.

Leptinaria unilamellata é uma espécie *K*-estrategista, por apresentar características tais como: um longo tempo de vida, atingindo a maturidade cedo na vida. Os moluscos recém nascidos são grandes, a fase jovem é curta e a alta sobrevivência dos filhotes permite que a maior parte dos indivíduos atinja a maturidade sexual. Os adultos apresentam um longo tempo de vida, baixa mortalidade e crescimento continuado. A reprodução é caracterizada pela realização de numerosos eventos reprodutivos, com pequeno investimento no número de filhotes por evento e baixa mortalidade dos adultos após o primeiro evento reprodutivo. A reprodução não é limitada a uma estação reprodutiva, mas é contínua através de todo o período do ano.

A espécie do presente estudo pode ser classificada como ovovivípara, de acordo com os resultados obtidos. Em *L. unilamellata*, o molusco parental retém jovens no útero que apresentam tamanho relativamente grande, em comparação ao tamanho corporal do adulto. Isso limita a produção de um grande número de filhotes, restringindo o investimento reprodutivo à um pequeno número de filhotes, os quais, entretanto, exibem uma alta taxa de sobrevivência.

As análises do ovotestis indicam que esta espécie é um hermafrodita simultâneo, produzindo gametas masculinos e femininos no mesmo ácido folicular, com a possibilidade de se reproduzir por autofecundação.

No presente estudo foi possível detectar a presença de variabilidade morfológica da concha, bem como do sistema reprodutor de *L. unilamellata* proveniente de diferentes localidades. As variações da morfologia do sistema reprodutor foram verificadas principalmente nos órgãos da região proximal, os quais, provavelmente por estarem envolvidos no sucesso do acasalamento, sofrem maiores pressões seletivas.

O comprimento da bolsa copuladora, largura do epifalo, largura do flagelo e largura do oviduto foram as medidas lineares que mais diferiram entre os moluscos de diferentes localidades e estas, portanto, são as variáveis com maior robustez para a distinção dos morfotipos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.N.; E.C.A. BESSA. Estudo do crescimento e da população de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835). Revista Brasileira de Zoologia, v. 18, n. 4, p. 1107-1113, 2001.
- _____. Estudo do crescimento e da reprodução de *Leptinaria unilamellata* (D'orbigny) (Mollusca, Subulinidae) em laboratório. Revista Brasileira de Zoologia, v. 18, n. 4, p. 1107-1113, 2001.
- AMATO, S.B.; J.C.B. BEZERRA. Parasitismo natural de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) por *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1983. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, n. 1, p. 75-79, 1989.
- ANDERSON, T.K.; WEAVER, K.F.; R. P. GURALNICK. Variation in adult shell morphology and life-history traits in the land snail *Oreohelix cooperi* in relation to biotic and abiotic factors. Journal of Molluscan Studies, v. 73, n. 2, p. 129-137, 2007.
- ANTKOWIAK, T.; R. CHASE. Sensory innervation of the ovotestis in the snail *Helix aspersa*. Journal of Experimental Biology, v. 206, p. 3913-3921, 2003.
- ARAÚJO, J.L.B.; H.E.B. REZENDE; P.A.F. RODRIGUES. Sobre *Bulimulus tenuissimus* (Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata). Revista Brasileira de Biologia, v. 20, n. 1, p. 33-42, 1960.
- _____; A.S.H. BREURE. Notes on Bulimulidae (Gastropoda, Euthyneura), anatomy and histology of *Simpulopsis (simpulopsis) miersi* Pfeiffer, 1856. Zoologische Mededelingen, v. 52, n. 3, p. 19-25, 1977.
- _____. Alguns moluscos terrestres como hospedeiros intermediários de parasitos de animais domésticos, no Brasil: estudos sobre a anatomia, sistemática e participação em helmintoses. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Juiz de Fora. Itaguaí. 103p. 1982.
- _____; E.C.A. BESSA. Moluscos de importância econômica do Brasil I. Xanthonychidae: *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821). (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). Revista Brasileira de Zoologia, v. 6, n. 4, p. 583-592, 1993.
- _____; E.C.A. BESSA. Moluscos de importância econômica no Brasil. II. Subulinidae, *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). Revista Brasileira de Zoologia, v. 10, n. 3, p. 489-497, 1993.

- _____; D.G. KELLER. Moluscos de importância econômica no Brasil. III. Subulinidae, *Leptinaria unilamellata* (Orbigny) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). Revista Brasileira de Zoologia, v. 10, n. 3, p. 499-507, 1993.
- BACKELJAU, T.; BAUR, A.; B. BAUR. Population and conservation genetics. In: G.M. BARKER (Ed). The biology of terrestrial molluscs. London, CABI Publishing, XI+552p. p. 383 – 412.2001.
- BAKER, H.B. Puerto Rican Holopodopes. Nautilus, v. 75 p. 116-121. 1962
- BARKER, G. M. 2001. Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptative morphology. In: BARKER, G. M. (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. CAB International, 552p.
- BAYNE, C.J. Studies on the composition of extracts of the reproductive glands of *Agriolimax reticulatus*, the grey field slug (Pulmonata, Stylommatophora). Comp. Biochem. Physiol., v. 23, p. 761-773, 1967.
- BESSA, E.C.A.; J.L.B. ARAÚJO. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Brugüière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. Revista Brasileira de Zoologia, v. 12, n. 3, p. 647-654, 1995.
- _____; J.L.B. ARAÚJO. Ocorrência de autofecundação em *Subulina octona* (Brugüière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. Revista Brasileira de Zoologia, v. 12, n. 3, p. 719-723, 1995.
- BEESE, K.; BEIER, K.; B. BAUR. Coevolution of male and female reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. Journal of Evolutionary Biology, v. 19, p. 410-418, 2006.
- BAUR, B.; A. BAUR. Social facilitation affects longevity and lifetime reproductive success in a self-fertilizing land snail. Oikos, v. 88, p. 612-620, 2000.
- _____; SCHILEYKO, A.; A. BAUR. Ecological observations on *Arianta aethiops* (Helicidae), a land snail endemic to the South Carpatians mountains, Romania. Journal of Molluscan Studies, v. 66, p. 285-289, 2000.
- BOJAT, N.C.; DÜRRENBARGER, M.; M. HAASE. The spermatheca in the land snail, *Arianta arbustorum* (Pulmonata: Stylommatophora): muscle system and potential role in sexual selection. Invertebrate Biology, v. 120, n. 3, p. 217-226, 2001.
- _____; SAUDER, U.; M. HAASE. The spermathecal epithelium, sperm and their interactions in the hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Pulmonata, Stylommatophora). Zoomorphology, v. 120, p. 149-157, 2001.

- BRANDOLINI, S.V.P.B.; A.P.S. GOMES. Influência de diferentes dietas sobre o crescimento, sobrevivência e reprodução de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae) em laboratório. *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 4, p. 169-177, 2002.
- BROWN, D. 1988. Components of lifetime reproductive success. p. 439-453. In: T.H. CLUTTON-BROCK (Ed.). *Reproductive success*. Chicago, Chicago University Press, +538p .
- CALDEIRA, R.L.; VIDIGAL, T.H.D.A.; MATINELLA, L.; SIMPSON, A.J.G.; O.S. CARVALHO. Identification of Planorbids from Venezuela by Polymerase Chain Reaction Amplification and Restriction Fragment Length Polymorphism of Internal Transcriber Spacer of the RNA Ribosomal Gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 2, p. 171-177, 2000.
- CARSON, F.L.; MARTIN, J.H.; J.A. LYINN. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 59, p. 365-375, 1973.
- CARVAJAL-RODRÍGUEZ, A.; CONDE-PADÍN, P.; E. ROLÁN-ALVAREZ. Decomposing shell form into size and shape by geometric morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis*. *Journal of Molluscan Studies*, v. 71, n. 313-318, 2005.
- CARVALHO, C.M.; BESSA, E.C.A.; S. D'ÁVILA. Life history strategy of *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Pulmonata, Bradybaenidae). *Molluscan Research*, v. 28, n. 3, p. 171-174, 2008.
- CATALÁN, N.M.Y.; FERNÁNDEZ, S.N.; B.C. WINIK. Oviductal structure and provision of egg envelopes in the apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Prosobranchia, Ampullariidae). *Biocell*, v. 26, n. 1, p. 91-100, 2006.
- CHIBA, S.; A. DAVISON. Shell shape and habitat use in the north-west pacific land snail *Mandarina polita* from Hahajima, Ogasawara: current adaptation or ghost of species past? *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 91, p. 149-159, 2007.
- CHIUH, YUH-WEN; HON-CHENG, C.; SIN-CHE, L.; C.A. CHEN. Morphometric analysis of shell and operculum variations in the viviparid snail, *Cipangopaludina chinensis* (Mollusca: Gastropoda), in Taiwan. *Zoological Studies*, v. 41, n. 3, p. 321-331, 2002.
- CHOH, M. S.; YAP, C.K.; TAN, S.G; H.A. JAMBARI. Morphological and allozyme studies of small terrestrial snails (*Opeas* sp., *Subulina* sp., and *Huttonella bicolor*) collected from Peninsular Malaysia*. *Russian Journal of Genetics*, v. 42, n. 1, p. 40-48, 2006.
- CICHÓN, M. Growth after maturity as a suboptimal strategy. *Acta Oecologica*, v. 20, p. 25-28, 1999.

- CLARKE, B.; ARTHUR, W.; HORSLEY, D.T.; D.T. PARKIN. Genetic variation and natural selection in pulmonate molluscs. p. 215-267. In: V. FRETTER & J. PEAK (Ed.). Pulmonates. V. 1. London, Academic Press, VII+417 p. 215-267. 1975.
- COOKSON, E.A. The comparative morphology and histology of the penial apparatus in three pulmonate gastropod species. *Bios*, v. 3, n. 2, 1982.
- CUEZZO, M.G. Spermatogenesis and sperm structure in neotropical pulmonate snail *Scutalus tupacci* (d'Orbigny). *The Veliger*, v. 38, n. 3, p. 212-222, 1995.
- DAVISON, A. Land snails as a model to understand the role of history and selection in the origins of biodiversity. *Population Ecology*, v. 44, p. 129-136, 2002.
- DUNCAN, C.J. Reproduction. In: V. FRETTER & J. PEAK (Ed.). Pulmonates. V. 1. London, Academic Press, VII+417, p. 309-365. 1975.
- DUTRA, A.V.C. Aspectos da ecologia e da reprodução de *Leptinaria unilamellata* (Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 5, n. 4, p. 581-591, 1988.
- D'ÁVILA, S.; DIAS, R.J.P.; BESSA, E.C.A.; E. DAEMON. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 6, p. 115-127, 2004.
- _____; E.C.A. BESSA. Influência do substrato sobre o crescimento de *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, n. 2, p. 205-211, 2005.
- D'ORBIGNY, A. *Magasin de Zoologie*. Publié par F.-E. Guérin, A. Paris. v. 44, 1835.
- D'ORBIGNY, A. 1837-1840. *Voyage dans L'amerique Méridionale Mollusques*. Éditeur P. Bertrand, Paris. V. Levriult, Strasbourg: 185-376 (1837); 377-424 (1840).
- EGONMWAN, R.I. Light and electron microscopy study of late embryonic development in the land snail *Limicolaria flammea* (Muller) (Pulmonata, Achatinidae). *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 24, n. 2, p. 436-441, 2007.
- ELEUTHERIADIS, N.; LAZARIDOU-DIMITRIADOU. The life cycle, population dynamics, growth and secondary production of *Bithynia graeca* (Westerlund, 1879) (Gastropoda) in lake Kerkini Northern Greece. *Journal of Molluscan Studies*, v. 67, p. 319-328, 2001.
- EVANNO, G.; MADEC, L. & J.F. ARNAUD. Multiple paternity and postcopulatory sexual selection in a hermaphrodite: what influences sperm precedence in the garden snail *Helix aspersa*? *Molecular Ecology*, v. 14, p. 805-812. 2005.

- _____ & L. MADEC. 2007. Variation morphologique de la spermathèque chez l'escargot terrestre *Cantareus aspersus*. C. R. Biologies, v. 330, p. 722-727. 2007.
- FARALE, S.B. DNA. Segredos & Mistérios. São Paulo, Sarvier. 1997
- FIorentino, V.; MANGANELLI, G. & F. GIUSTI. Multiple scale patterns of Shell and anatomy variability in land snails: the case of the Sicilian *Marmorana* (Gastropoda: Pulmonata: Helicidae). Biological Journal of the Linnean Society, v. 93, p.359-370. 2008.
- FRETTER, V. & J. PEAK. 1975. Pulmonates. Volume 1 Academic Press London. 417 p. 1975.
- FURTADO, M.C.V.; E.C.A. BESSA & M.C.M.N. CASTAÑON. Ovoteste de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae): histologia e produção de gametas. Revista Brasileira Zoociências, 6, n. 1, p. 7-17. 2004.
- GÓMEZ, B. J.; E. ÂNGULO & A.M. ZUBIAGA. Ultrastructural analysis of the morphology and function of the spermatheca of the pulmonate slug *Arion subfuscus*. Tissue and cell, v. 23, n. 3, p. 357-365. 1991.
- _____. Structure and functioning of the reproductive system. In: G.M. BARKER (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. London, CABI Publishing, VIII+552p, p. 307-330. 2001.
- GRIFFOND, B.; Z. DADKHAH-TEHERANI; A. MEDINA & M. BRIDE. Ultrastructure of *Helix aspersa* spermatogenesis: scanning and transmission electron microscopical contributions. Journal of Molluscan Studies, v. 57, p. 227-287. 1991.
- GRYPTA, P.K. & B.P. OLI. The life cycle and growth of the slug, *Anadenus altivagus* (Theobald) from Kumaon Himalayan forests, India. Journal of Molluscan Studies, v. 64, p. 250-253. 1998.
- GUTIERREZ, A., G. PERERA, M. YONG & L. WONG. The effect of isolation on the life-history traits of *Pseudosuccinea columella* (Pulmonata: Lymnaeidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 96, n. 4, p. 577-581. 2001.
- HEALY, J.M. Spermatogenesis and oogenesis. In: BARKER, G. M. (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. London, CABI Publishing, X+552p, p. 357-382. 2001
- HAASE, M. & A. KARLSSON. 2004. Mate choice in a hermaphrodite: you won't score with a spermatophore. Animal Behaviour, v. 67, p. 287-291. 2004.
- HAASE, M. & B. BAUR. Variation in spermathecal morphology and storage of spermatozoa in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora). Invertebrate reproduction and development v. 28, n. 1, p. 33-41. 1995.

- HELLER, J. Life History Strategies. In: G.M. BARKER (Ed). The biology of terrestrial molluscs. London, CABI Publishing, XII+552p, p. 413-445. 2001.
- HILL, R.S. Studies on the ovotestis of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller). 2. The epithelia. Cell Tissue and Research, v. 183, p. 131-141. 1977.
- HODASI, J.K.M. Life story studies of *Achatina (Achatina) achatina* (Linné). Journal of Molluscan Studies v. 45, p. 328 – 339. 1979.
- HOGG, N.A.S. & J. WIJDENES. A study of gonadal organogenesis, and the factors influencing regeneration following surgical castration in *Deroceras reticulatum* (Pulmonata: Limacidae). Cell Tissue and Research, v. 198, p. 295-307. 1979.
- HOLM, L.W. Histological and functional studies on the genital tract of *Lymnaea stagnalis appressa* Say. Trans. Amer. Micr. Soc., v. 65, p. 45-68. 1946.
- HOMMAY, G.; KIENLEN, J.C.; GERTZ, C.; & A. HILL. Growth and reproduction of the slug *Limax valentianus* Férrusac in experimental conditions. Journal of Molluscan Studies, v. 67, p. 191-207. 2001
- HORN, A.C.M; ACHAVAL, M. & D. M. ZANCAN. The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948) (Gastropoda, Pulmonata). Brazilian Journal of Biology, v. 65, n. 3, p. 459-467. 2005
- HURD, H. Host fecundity reduction: a strategy for damage limitation? Trends in Parasitology, v. 17, n. 8, p. 363-368. 2001
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Divisão Territorial do Brasil e Limites Territoriais. Página visitada em 20 de janeiro de 2008. www.ibge.br. 2008.
- ILANO, A.S.; FUJINAGA, K. & S. NAKAO. Mating, development and effects of female size on offspring number and size in the neogastropod *Buccinum isaotakii* (Kira, 1959). Journal of Molluscan Studies, v. 70, p. 277-282. 2004.
- JONG-BRINK, M.; A. WIT; G. KRAAL & H.H. BOER. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. Cell Tissue and Research, v. 171, n. 2, p. 195-219. 1976.
- _____; H.H. BOER; T.G. HOMMES & A. KODDE. Spermatogenesis and the role of Sertoli cells in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. Cell Tissue and Research, v. 181, p. 37-58. 1977.
- JOOSE, J. & D. REITZ. Functional anatomical aspects of the ovotestis of *Lymnaea stagnalis*. Malacologia, v. 9, n. 1, p. 101-109. 1969.

- JORDAENS, K.; PINCEEL, J.; KRIECKEMANS, H. & T. BACKELJAU. 2006. Accurate identification of cryptic slug taxa of the *Arion subfuscus/fuscus* complex by PCR-RFLP (Pulmonata: Arionidae). *Advanced Access Publication*, v.6, p. 323-325.
- JURBERG, P. Sobre *Auris labiata melanostoma* (Moricand, 1836) (Gastropoda, Pulmonata, Bulimidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 62, p.81-94. 1964.
- KAMEDA, Y.; KAWAKITA, A. & M. KATO. Cryptic genetic divergence and associated morphological differentiation in the arboreal land snail *Satsuma (Luchuhadra) largillierti* (Camaenidae) endemic to the Kyukyu Archipelago, Japan. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 45, n. 2, p. 519-533. 2007.
- KHAN, H.R. & A.S.M. SALEUDDIN. Cell contacts between follicle cells and oocyte of *Helisoma* (Mollusca, Pulmonata). *Journal of Morphology*, v. 177 p. 319-328. 1983.
- KREBS, C.J. (Ed.). *Ecology: the experimental analysis of distribution and abundance*. British, Harper Collins College Publishers, 801 p. 1994.
- KOEMTZOPOULOS, E. & A. STAIKOU. Variation in spermathecal morphology is independent of sperm competition intensity in populations of the simultaneously hermaphroditic land snail *Cornu aspersum*. *Zoology*, v. 110, p. 139-146. 2007.
- LANZIERI, P.D. Sobre a cópula e a constituição do aparelho genital de *Succinea meridionalis* Orbigny, 1846 (Gastropoda, Pulmonata, Succineidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 63, p. 207-228. 1964.
- _____ & H. E. B. REZENDE. Estudos anatômicos e histológicos principalmente do aparelho genital de *Bulimulus corumbaensis* Pilsbry, 1897 (Gastropoda, Pulmonata, Bulimulidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 62, p. 81-94. 1965.
- LEONARD, J. L. Sexual conflict and the mating systems of simultaneously hermaphroditic gastropods. *American Malacological Bulletin*, 9, n 1, p. 45-48. 1991.
- LIMA, L. C., SOARES, D. M. & C. T. GUIMARÃES. *Biomphalaria occidentalis* Paraense, 1981 in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 88, n. 2, p. 289-292. 1993.
- MACKIE, G.L. Are Sphaeriid clams ovoviviparous or viviparous? *The Nautilus*, v.92, p.145-147. 1978.
- MENDONÇA, C.L.G.F.; CARVALHO, O.S.; MOTA, E.M.; PELAJO-MACHADO, M.; CAPUTO, L.F.G. & H.L. LENZI. *Angiostrongylus costaricensis* and Experimental infection of *Sarasinula marginata* – II. Elimination Routes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 7, p. 893-898. 2003.

- MONTEIRO, W.; ALMEIDA, J.R.; J.M.G. & B. F. S. DIAS. Sperm sharing in *Biomphalaria* snails: a new behavioral strategy in simultaneous hermaphroditism. *Nature*, v. 308, p. 727-729. 1984.
- _____ & B. F. S. DIAS. Estratégias reprodutivas em *Biomphalaria* (Mollusca, Planorbidae). *Ciência e Cultura*, v. 41, p. 1051-1054. 1989.
- _____ & T. KAWANO. Crescimento de órgãos do aparelho reprodutor durante o desenvolvimento de *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny) (Mollusca, Planorbidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 58, n. 4, p. 693-705. 1998.
- MONTEIRO, L.R. & S.F. REIS. Princípios de Morfometria Geométrica. Ribeirão Preto, HolosFapesp, 198p. 1999.
- NAGGS, F. The reproductive anatomy of *Paropeas achatinaceum* and a new concept of *Paropeas* (Pulmonata: Achatinoidea: Subulinidae). *Journal of Molluscan Studies*, v. 60, p. 175-191. 1994.
- NETO, I.S.A. Atividade moluscicida e repelente do latex de três espécies de *Euphorbia* (EUPHORBIACEA) sobre *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Subulinidae). Juiz de Fora, 54p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2003.
- NORTON, C.G. & J.M. BRONSON. The relationship of body size and growth to egg production in the hermaphroditic freshwater snail, *Helisoma trivolvis*. *Journal of Molluscan Studies*, v. 72, p. 143-147. 2005.
- OCAÑA, T.M.J. Growth, mortality and longevity in two populations of *Siphonaria pectinata* (Pulmonata) at Gibraltar. *Journal of Molluscan Studies*, v. 69, p. 162-164. 2003.
- _____ & R.H. EMSON. Maturation, spawning and development in *Siphonaria pectinata* Linnaeus (Gastropoda, Pulmonata) at Gibraltar. *Journal of Molluscan Studies*, v. 65, p. 185-193. 1999.
- OSSELAER, C.V. & B. TURSCH. Variability of the genital system of *Helix pomatia* L., 1758 and *Helix lucorum* L., 1758 (Gastropoda: Stylommatophora). *Journal of Molluscan Studies*, v. 66, p. 499-515. 2000.
- PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arquivos do Museu Nacional*, Rio de Janeiro v. 55, p. 105-128. 1975.

- _____. *Biomphalaria occidentalis* sp. n. from South America (Mollusca, Basommatophora, Pulmonata). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 76, n. 2, p. 199-211. 1981.
- _____. *Biomphalaria tenagophila guaibensis* sp. n. from southern Brazil and Uruguay (Pulmonata: Planorbidae). I. Morphology. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v. 79, p. 465-469. 1984.
- _____. *Physa cubensis* Pfeiffer, 1839 (Pulmonata: Physidae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v. 82, p. 15-20. 1987.
- _____. *Plesiophysa guadeloupensis* ("Fisher" Mazé, 1883). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 4, p. 519-521. 2003.
- _____. & N. DESLANDES. Observations on the morphology of *Australorbis nigricans*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 53, n. 1, p. 121-134. 1955.
- _____, POINTIER, J. P., DELAY, B., PERNOT, A.F., INCANI, R. N., BAIZAN, C. & CHROSCIECHOWSKI, P. *Biomphalaria prona* (Gastropoda: Planorbidae): a morphological and biochemical study. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.87, p. 171-179. 1992.
- PARIVAR, K. Differentiation of Sertoli cells and posterior-reproductive epithelial cells in the hermaphrodite gland of *Arion ater* (L.) (Mollusca, Pulmonata). Journal of Molluscan Studies, v. 46, p. 139-147. 1980.
- PARMAKELIS, A. & M. MYLONAS. Aspects of the reproduction and activity) of two sympatric *Mastus* (Beck, 1837) species in Crete (Gastropoda: Pulmonata: Buliminidae). Journal of Molluscan Studies, v. 68, p. 225-233. 2002.
- PENA, M. S.; N.C. SALGADO & A.C.S. COELHO. New species of *Thaumastus* from Lagoa Santa region, Minas Gerais State, Brazil (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Bulimuloidea). Iheringia, Série Zoológica, v. 95, n. 1, p. 21-24. 2005.
- PERES-NETO, P.R.; VALENTIN, J.L. & F.A.S. FERNANDEZ. Oecologia Brasiliensis, Tópicos em tratamento de dados biológicos, Volume II. Programa de Pós graduação em Ecologia, Instituto de Biologia-UFRJ, Rio de Janeiro, p. 57-89. 1995.
- PFEIFFER, L. Monographia Heliceorum Viventium. F. A. Brockhaus Lippiae; Volumen Secundum. V. 594, p. 1948.
- PFENNINGER, M. & D. POSADA. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration and secondary contact. Evolution, 56, n. 9, p. 1776-1778. 2002.

- PONDER W. F. & D. R. LINDBERG. Toward a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 119, p. 83-265. 1997.
- RAAHAUGE, P. & T. K. KRISTENSEN. A comparison of *Bulinus africanus* group species (Planorbidae; Gastropoda) by use of the internal transcribed spacer 1 region combined by morphological and anatomical characters. *Acta Tropica*, v. 75, p. 85-94. 2000.
- RAUT, S.K. & A. PANIGRAHI. Egg-nesting in the garden slug *Laevicaulis alte* (Férussac) (Gastropoda: Soleolifera). *Malacological Review*, v. 21, p. 101-107. 1988.
- REEVE, L. A. Monograph of genus *Achatina*. *Conchologia Iconica*, v. 5, 23p. 1849-1850
- REISE, H. Mating behaviour of *Deroceras rodnae* Grossu & Lupu, 1965 and *Deroceras praecox* Wiktor, 1966 (Pulmonata: Agriolimacidae). *Journal of Molluscan Studies*, v. 61, p. 325-330. 1995.
- RENDELL, R.J. & R.H. COWIE. Growth and reproduction in Hawaiian succineid land snails. *Journal of Molluscan Studies*, v. 69, p. 288-289. 2003.
- REZENDE, H.E.B. & P. D. LANZIERI. Uma nova espécie do gênero *Protoglyptus* Pilsbry, 1897, do Brasil (Gastropoda, Pulmonata). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 61, n. 1, p. 110-126. 1963.
- _____ & P. D. LANZIERI. Observações anatômicas e histológicas sobre o órgão copulador masculino de "*Bulimulus tenuissimus*" (Orbigny, 1835) (Gastropoda, Pulmonata, Bulimulidae). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 24, n. 4, p. 409-415. 1964.
- RODRIGUES, A. S. & R. J. MARTINS. Annual maturation of the perivaginal gland of *Oxychilus (Drouetia) atlanticus* (Pulmonata: Zonitidae): morphological and cytological approaches. *Journal of Molluscan Studies*, v. 69, p. 396-398. 2003.
- RUNHAM, N.W. Hermaphroditism in the Stylommatophora. *Malacologia*, v. 22, n. 1-2, p.121-123. 1982.
- SALGADO, N. C.; COELHO, A. C. S. & H. M. BARROS. Macroanatomia, microanatomia e histologia do sistema reprodutor de *Thaumastus (Thaumastus) taunaisii* (Férussac, 1822), *T. (T.) magnificus* (Grateloup, 1839) e *T. (T.) achilles* (Pfeiffer, 1852) (Mollusca, Gastropoda, Bulimulidae) *Boletim do Museu Nacional*, Rio de Janeiro, v. 358, p. 1-46. 1995.
- SANTOS, S.B. & D.P. MONTEIRO. Composição de gastrópodes terrestres em duas áreas do Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentado (CEADS), Vila Dois Rios, Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil – um estudo-piloto. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, n. 1, p. 181-190. 2001.

- SANTOS, P.F. Influência da cafeína e do timol sobre a sobrevivência, o crescimento e a reprodução de três espécies de moluscos terrestres, sob condições de laboratório. Dissertação de mestrado. 116p. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2005.
- SILVA, L.C.; MEIRELES, L.M.O; JUNQUEIRA, F.O. & E.C.A. BESSA. Development and reproduction of *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca: Bulimulidae) in laboratory. Revista Brasileira de Zoologia, 25, n. 2, p. 220-223. 2008.
- SIMONE, L.R.L. Land and freshwater molluscs of Brazil. São Paulo, EGB, Fapesp, +390p. 2006.
- SOUZA, H.E. Atividade moluscicida e fagoínibidora da cafeína e do timol sobre três espécies de moluscos gastrópodes terrestres em condições de laboratório. Juiz de Fora, 45p. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora. 2003.
- SOUZA, C.P. & K.G. MAGALHÃES. Rearing of *Lymnaea columella* (Say, 1917), intermediate host of *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v. 95, n.5, p. 739-741. 2000.
- SPATZ, L.; VIDIGAL, T. H. D. A.; CALDEIRA, R. L.; NETO, E. D.; CAPPA, S.M.G. & O.S. CARVALHO. Study of *Biomphalaria tenagophila tenagophila*, *B. t. guaibensis* and *Biomphalaria occidentalis* by polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA intergenic spacer regions. Journal of Molluscan Studies, v. 65, p. 143-149. 1999.
- STOTHARD, J. R.; BRÉMOND, P.; ANDRIAMARO, L.; LOXTON, N. J.; SELLIN, B. & D. ROLLINSON. Molecular characterization of the freshwater snail *Lymnaea natalensis* (Gastropoda: Lymnaeidae) on Madagascar with an observation of an unusual polymorphism in ribosomal small subunit genes. Journal of Zoology, v. 252, p. 303-315. 2000.
- TEIXEIRA, D. G.; M.F. MARTINS; J.L. GUERRA; F.J.H. BLAZQUEZ & I.L. SINHORINI. Descrição histológica da via genital masculina e hermafrodita de escargots das espécies *Achatina fulica* e *Achatina monochromatica*. Veterinária e Zootecnia, v. 13, n. 1, p. 44-53. 2006.
- THIELE, J. Handbook of systematic Malacology. Smithsonian Institution Libraries and The National Science Foundation, Washington, DC, 886-887 p. 1992.
- THOMÉ, J. W. *Phyllocaulis renschi*, eine neue Veronicellidae (Mollusca) aus Rio Grande do Sul/Brasilien. Zoologischer Anzeiger, v. 174, n. 3, p. 201-209. 1965.
- _____. A ocorrência de Veronicellidae na Amazônia brasileira, com descrição de duas espécies novas (Soleolifera, Gastropoda). Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica, v. 5, p. 521-532. 1967.

- _____. Redescricao dos tipos de Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) neotropicais. III. Espécies depositadas no “Zoologisches Institut und museum der Universität” de Göttingen, Alemanha. *Iheringia*, v. 38, p. 73-88. 1970.
- _____. Redescricao dos tipos de Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) neotropicais. V. Espécies depositadas no “Museo ed Instituto di Zoologia Sistemática della Università” de Turim, Itália. *Iheringia*, v. 39, p. 19-31. 1970.
- _____. Redescricao dos tipos de Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) neotropicais. VII. Espécies depositadas no “Muséum National d’Histoire Naturelle”, Paris, França. *Iheringia*, v. 40, p. 27-52. 1971.
- _____. Uma nova espécie de *Phyllocaullis* do Brasil – (Veronicellidae, Gastropoda). *Iheringia*, v.41, p.59-68. 1972.
- _____. Os gêneros da família Veronicellidae nas Américas (Mollusca, Veronicellidae). *Iheringia*, v. 48, p. 3-56. 1975.
- _____. Revisão do gênero *Phyllocaullis* Colosi, 1922 (Mollusca, Veronicellidae). *Iheringia. Série Zoológica*, v. 49, p. 67-90. 1976.
- _____. Contribuição ao estudo dos Veronicellidae (Gastropoda, Mollusca): nova espécie do gênero *Angustipes* Colosi, 1922. *Iheringia*, v. 60, p. 75-79. 1981.
- _____. Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) pantropicais: primeira ocorrência nas ilhas Christmas (Austrália) do Oceano Índico. *Iheringia*, v. 60, p. 75-79. 1983.
- _____. Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) pantropicais: III. Redescricao de 5 espécies, com base no exame dos tipos depositados no “Naturhistoriska Rikmuseet”, de Estocolmo, Suécia. *Iheringia Série Zoológica*, v. 64, p. 29-46. 1984.
- _____. Uma estranha anomalia em *Veronicella laevis* Blainville, 1817 (Gastropoda, Veronicellidae): bifalia aparentemente funcional. *Ciência e Cultura*, v. 38, n. 3, p. 517-522. 1986.
- TOMPA, A.S. Oviparity, egg retention and ovoviviparity in pulmonates. *Journal of Molluscan Studies*, v. 45, p. 155-160. 1979.
- TRYON, G.W. & H.A. PILSBRY. *Manual of Conchology*. Philadelphia, Conchology Dept. Academy Natural Sciences, v. XVIII, 357p. 1906.
- VAREILLE-MOREL, C.; ABROUS, M.; DREYFUSS, G. & D. RONDELAUD. Oviposition behaviour of *Lymnaea truncatula* in France. *Journal of Molluscan Studies*, v. 64, p. 387-391. 1998.

- VISSER, M.H.C. The reproductive system of *Oopelta polypunctata collinge* and *Oopelta nigropunctata* Mölich (Pulmonata, Arionidae), with reflections upon the systematic position of the subfamily Oopeltinae. *Zoologica Scripta*, v. 10, p. 293-314. 1981.
- WILKE, T.; PFENNINGER, M. & G. M. DAVIS. Anatomical variation in cryptic mudsnail species: Statistical discrimination and evolutionary significance. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, v. 152, p. 45-66. 2002.
- YONG, M.; GUTIERREZ, A.; PERERA, G.; DURAND, P. & J. P. POINTIER. The *Biomphalaria havanensis* complex (Gastropoda, Planorbidae) in Cuba: a morphological and genetic study. *Journal of Molluscan Studies*, v. 67, p. 103-111. 2001.
- ZERA A.J. & L.G. HARSHMAN. The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 32, p. 95-126. 2001.

APÊNDICES

Artigos e trabalhos publicados referentes a essa dissertação

A - CARVALHO, C. M.; BESSA, E. C. A.; D'ÁVILA, S. 2008. Life history strategy of *Bradybaena similaris* (Férrusac, 1821) (Mollusca, Pulmonata, Bradybaenidae). *Molluscan Research*. v. 28 (3): 171-174

B - CARVALHO, C. M. & S. D'ÁVILA. Relação entre crescimento e investimento reprodutivo de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata). XXXI Semana de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e XIV Mostra de Produção Científica, 2008

C - CARVALHO, C. M. & S. D'ÁVILA. Variabilidade morfométrica do sistema reprodutor de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata). XXXI Semana de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e XIV Mostra de Produção Científica, 2008

D - PILATE, V.; D'ÁVILA, S.; CARVALHO, C. M. Variabilidade morfométrica da concha de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata). XXXI Semana de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e XIV Mostra de Produção Científica, 2008

E - SANTOS, E.O.; DANIEL, P.A.; CARVALHO, C.M.; BESSA, E.C.A.; D'ÁVILA, S. Investimento reprodutivo e estratégias relacionadas à sobrevivência dos filhotes de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata, Subulinidae). XXXI Semana de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e XIV Mostra de Produção Científica, 2008

F – DANIEL, P.A.; SANTOS, E.O.; CARVALHO, C.M.; BESSA, E.C.A.; D'ÁVILA, S. Estratégia de história de vida de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata, Subulinidae). XXXI Semana de Biologia da Universidade Federal de Juiz de Fora e XIV Mostra de Produção Científica, 2008