

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Paula Botelho Ferreira

**Estudo citogenético de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca,
Gastropoda, Subulinidae)**

Juiz de fora

2014

Paula Botelho Ferreira

**Estudo citogenético de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca,
Gastropoda, Subulinidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

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

Co-orientador: Saulo Marçal de Sousa

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Botelho Ferreira, Paula.

Estudo citogenético de *Leptinaria unilamellata* (d`Orbigny, 1835) (Mollusca, Gastropoda, Subulinidae) / Paula Botelho Ferreira. -- 2014.

59 p.

Orientador: Sthefane D`ávila de Oliveira e Paula

Coorientador: Saulo Marçal de Sousa

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2014.

1. Estudo Citogenético de Moluscos Terrestres. 2. Moluscos *Leptinaria unilamellata*. 3. Padronização de protocolos citogenéticos. I. D`ávila de Oliveira e Paula, Sthefane , orient. II. Marçal de Sousa, Saulo, coorient. III. Título.

Paula Botelho Ferreira

**Estudo citogenético de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca,
Gastropoda, 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 Comportamento e Ecologia Animal).

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Saulo Marçal de Sousa

FESJF - Faculdade Estácio de Sá Juiz de Fora

Dr^a. Lidiane Cristina da Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora – Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira

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

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora

2014

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Darwin

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo e Isaura e, à minha irmã Jordana, que não mediram esforços para que eu galgasse mais um importante degrau na minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, força divina e poderosa, pelo dom da vida e toda a proteção, luz e força concedida durante esta jornada. Sem a fé depositada Nele, não conseguiria concluir esta etapa.

Aos **meus pais, Paulo e Isaura**, pela confiança, apoio, amor incondicional e por sempre acreditarem em mim, compartilhando de todos os momentos desta etapa.

À minha **irmã Jordana**, por toda torcida, apoio e carinho em todos os momentos de minha vida.

A todos os **meus familiares** pela torcida e apoio nestes sete anos em que moro em Juiz de Fora.

À **Profa. Dra. Sthefane D'ávila**, pela orientação, apoio, confiança e amizade dedicada ao longo de toda minha Iniciação Científica e nestes dois anos de Mestrado, os meus sinceros agradecimentos. Obrigada pela possibilidade de estudar e conhecer uma nova área, na qual me identifiquei tanto. Acredito e espero que o vínculo que criamos ao longo destes anos não se finaliza com esta etapa.

Ao **Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa**, muito obrigada por toda ajuda, dedicação, paciência e todo o incentivo ao longo de toda a caminhada em busca de metáfases. Seus conhecimentos e experiência foram fundamentais.

À **Prof.^a Dr.^a Silvia Pompolo**, da Universidade Federal de Viçosa, por toda ajuda, colaboração e por todo o conhecimento transmitido, muito obrigada.

Ao **Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam dos Santos** do Laboratório Beagle da Universidade Federal de Viçosa, por toda confiança e ajuda com as técnicas de citogenética, obrigada pela oportunidade e aprendizado profissional e pessoal.

À **Prof.^a Dr.^a Elizabeth Cristina de Almeida Bessa**, coordenadora do Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira e a Maria Alice Allemand Carvalho, vice-coordenadora, por possibilitarem que parte desse trabalho fosse desenvolvida no Museu. Obrigada pelo carinho e dedicação.

À querida amiga, **Aryane Campos**, por toda a paciência, conhecimento, incentivo e ajuda diária. Sem você esse trabalho não teria a menor possibilidade de acontecer.

Às queridas meninas do Laboratório Beagle, da UFV, Nicole Ibagón, Natália Travenzoli e Silvana Melo, pela ajuda, pelas técnicas, pela prática e experiência e por todo o conhecimento transmitido. Muito obrigada por toda a dedicação dispensada à mim nessas duas semanas, foram essenciais.

À querida amiga, **Ana Carolina Lamego**, companheira de jornada, pela amizade e carinho diário. Por sempre ouvir minhas lamúrias e desabafos e me ajudar nas inúmeras repetições de técnicas até altas horas. Obrigada por toda a colaboração.

Ao amigo **Osmar**, por toda dedicação, atenção e prestatividade em todos estes anos de trabalho acadêmico, solucionando sempre assuntos burocráticos da Pós-Graduação.

À todos os **professores do curso de Pós-Graduação**, por compartilharem experiências e ensinamentos.

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** A. molusco adulto da espécie *Leptinaria unilamellata*. B. Embriões retirados do oviduto de um molusco grávido.....**25**
- Figura 2** Preparação evidenciando célula em metáfase de *Leptinaria unilamellata* $2x=56$ cromossomos.....**36**
- Figura 3** Núcleos de *L. unilamellata* corados com Nitrato de Prata.....**37**
- Figura 4** Cariograma de *Leptinaria unilamellata*, $2n=56$ cromossomos.....**38**
- Figura 5** Idiograma representando os 28 pares de cromossomos de *Leptinaria unilamellata*.....**38**

LISTA DE TABELAS

Tabela I- Resumo das metodologias empregadas e números cromossômicos descritos para gastrópodes marinhos.....	30
Tabela II- Números cromossômicos descritos para bivalves marinhos e de água doce.....	32
Tabela III- Número cromossômico de gastrópodes pulmonados.....	33
Tabela IV- Dados morfométricos dos cromossomos de <i>Leptinaria unilamellata</i> (2n=56).....	39
Tabela V- Médias dos dados morfométricos relativos das quatro metáfases de <i>Leptinaria unilamellata</i>	40
Tabela VI Média do somatório de Assimetria cariotípica (<i>A</i>); média do grau de heterogeneidade cromossômica (<i>A_i</i>) das quatro metáfases de <i>Leptinaria unilamellata</i> (2n=56).....	40

SUMÁRIO

Resumo.....	
Abstract.....	
Introdução Geral.....	14
Sessão 1: Estabelecimento de protocolos para estudos citogenéticos de moluscos terrestres: bioensaios utilizando <i>Leptinaria unilamellata</i> (Pulmonata: Achatinoidea: Subulinidae) como modelo experimental	
1.1.Introdução.....	19
Material e métodos.....	21
1.2.1 Pesquisa Bibliográfica.....	21
1.2.2 Animais.....	21
1.2.3 Protocolos testados.....	22
1.2.4 Técnica de coloração de Prata.....	25
1.2.5 Processamento dos animais.....	25
1.2.6 Captura e Análise de Imagens.....	26
1.2.7 Morfometria dos cromossomos.....	26
1.3Resultados.....	28
1.3.1 Pesquisa em base de dados.....	28
1.3.2 Resultados dos protocolos testados no presente estudo.....	36
1.3.3 Resultado da técnica de Nitrato de Prata.....	37
Discussão.....	42
Referências Bibliográficas.....	45

Resumo

Os moluscos pulmonados têm sido reconhecidos como modelos interessantes para o estudo de biodiversidade oculta em função de algumas características como a baixa vagilidade, capacidade de realizar auto-fecundação, além do histórico de identificações específicas baseadas somente nas conchas, caráter esse hoje sabidamente insuficiente para a distinção de espécies. A citogenética constitui uma abordagem que pode contribuir para a resolução taxonômica de grupos de moluscos terrestres, sendo, entretanto necessário o estabelecimento de protocolos experimentais. O objetivo do presente trabalho foi estabelecer protocolos para o estudo citogenético de moluscos terrestres, através da realização de bioensaios, visando testar diferentes tecidos, concentrações dos reagentes indicados e tempos de incubação. Para isso, foi realizada uma revisão prévia dos protocolos descritos para o filo Mollusca e delineados protocolos, posteriormente testados em bioensaios, utilizando-se a espécie *Leptinaria unilamellata* (Pulmonata, Subulinidae) como modelo experimental. O presente trabalho descreve o cariótipo da espécie *L. unilamellata*, com fórmula cariotípica $22m+6sm$. Os resultados obtidos estão de acordo com os números cromossômicos descritos na literatura para espécies de moluscos terrestres da superfamília Achatinoidea, variando de $2n=44$ a $2n=60$ cromossomos. Além disso, com a técnica de coloração de nitrato de prata, observamos a presença de duas marcações no nucléolos correspondente às regiões organizadores de nucléolos, ou seja, regiões ativas do DNA. O estabelecimento de protocolos de citogenética adequados para o estudo de moluscos terrestres permitirá o aumento do número de espécies cariomorfologicamente estudadas, contribuindo para a melhor resolução da taxonomia e evolução desse grupo.

Palavras-chave: citogenética, cromossomos, moluscos terrestres, protocolos, Subulinidae

Abstract

Pulmonate molluscs have been recognized as interesting models to study hidden biodiversity due to some biological characteristics as low vagility and self-fertilization capacity, besides the historic of species descriptions based solely on the shell. Cytogenetics is used to infer species relationships in several plant and animal taxa. This approach may contribute to the better resolution of the taxonomy within Pulmonata. The present study aimed to establish protocols to cytogenetic studies of terrestrial molluscs testing different target tissues, reagents concentrations and incubation times. We performed a review of the cytogenetic protocols described in the literature for phylum Mollusca and after that; we delineated protocols which were tested in bioassays, using the species *Leptinaria unilamellata* as experimental model. In the present study we found that *L. unilamellata* present diploid number of 56 chromosomes, 44 metacentrics e 12 submetacentrics. This result is in accordance with the chromosome numbers described to terrestrial snails from superfamily Achatinoidea, which varies from $2n=44$ to $2n=60$. Furthermore, with the technique of silver nitrate staining, we found the presence of two sites in the nucleus corresponding to nucleolus organizer regions, or active regions of DNA. The establishment of cytogenetic protocols adequate to terrestrial snails will allow increasing the number of land snail' species karyomorphologically studied, contributing to the better resolution of the taxonomy and evolution of this group.

Key-words: chromosomes; cytogenetics; land snails; protocols; Subulinidae

Introdução Geral

O grupo Mollusca compreende um filo animal altamente diverso com mais de 100.000 espécies reconhecidas (WILKE *et al.*, 2002). A maior parte das espécies apresenta uma concha com esqueleto externo distinto, caráter esse amplamente utilizado por naturalistas dos séculos XVII e XVIII para a descrição de espécies. Entretanto, atualmente, sabe-se que as características da concha são insuficientes para a distinção de espécies e um número cada vez maior de espécies crípticas vem sendo descoberto desde o advento e utilização da biologia molecular como uma ferramenta adicional aos estudos taxonômicos (SPENCER *et al.*, 2009; DELICADO & RAMOS, 2012; PRÉVOT *et al.*, 2013). Os gastrópodes pulmonados terrestres apresentam grande diversidade específica. Estima-se que existam mais de 30.000 espécies, as quais ocupam uma variedade de habitats terrestres. Esses gastrópodes são hermafroditas, ou seja, apresentam aparelhos reprodutores feminino e masculino. A biologia reprodutiva e a história de vida são igualmente diversas e provavelmente refletem a irradiação do grupo, sendo investigadas sob diferentes áreas do conhecimento (BAKER, 2001; GÓMEZ, 2001; HEALY, 2001; HELLER, 2001).

As descrições feitas para as espécies do gênero *Leptinaria* Beck, 1839 foram baseadas principalmente na morfologia da concha e local de ocorrência (TRYON & PILSBRY, 1906). As espécies deste gênero, apresentam conchas com grande variedade de formas, podendo apresentar-se oval, variando de cônica à turrificada, fina, na maioria dos casos transparente, lisa ou ornamentada, apresentando uma abertura ocasionalmente com uma lamela parietal, a columela coberta com um “callus”, torcido para baixo, e mais ou menos truncado (TRYON & PILSBRY, 1906). As espécies desse gênero são de difícil diagnose, por apresentarem grande variação intraespecífica na forma da concha. O histórico de descrições específicas pobremente detalhadas e baseadas somente nas conchas (TRYON & PILSBRY, 1906), na baixa vagilidade e na capacidade de realizar autofecundação (ALMEIDA & BESSA, 2001; CARVALHO *et al.*, 2009), tornam evidente a necessidade da revisão taxonômica do gênero, incluindo redescrições de espécies utilizando uma abordagem integrativa (NAGGS, 1994; BACKELJAU *et al.*, 2001; MEDEIROS *et al.*, 2013).

Leptinaria unilamellata (d’Orbigny, 1835) é um molusco pulmonado terrestre com aproximadamente 11mm de comprimento e 5 mm de largura, que pode ser encontrado no Brasil e na Bolívia (SIMONE, 2006). No Brasil, populações dessa

espécie são encontradas no Amazonas, Pará, Rondônia, Pernambuco, Bahia, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (ARAÚJO, 1982). ORBIGNY (1835) descreveu a espécie *L. unilamellata* baseando-se apenas nos caracteres conchiliológicos. Características da anatomia interna foram posteriormente fornecidas por SCHILEYKO (1997), CARVALHO *et al.* (2009) e MEDEIROS *et al.* (2013).

A maioria das espécies de subulinídeos é conhecida exclusivamente pelas características da concha (NAGGS, 1994). SCHILEYKO (1997) realizou o trabalho de revisão mais recente sobre a família, disponibilizando informações sobre a morfologia interna de uma espécie de cada gênero listado. MEDEIROS *et al.* (2013) descreveram a morfo-anatomia do sistema reprodutor e histologia de *Leptinaria unilamellata* e disponibilizaram uma comparativa da morfologia de algumas espécies de subulinídeos. Entretanto, as informações fornecidas por esses autores ainda são insuficientes para a distinção das espécies do gênero *Leptinaria*.

O conhecimento do polimorfismo da concha sempre foi utilizado como uma ferramenta complementar nos estudos de variabilidade populacional (BACKELJAU *et al.*, 2001). Em espécies de gastrópodes pulmonados terrestres, a cor, a forma e o sentido da espiralização da concha, têm sido objeto de numerosas investigações evolutivas. Essa análise morfológica da concha é uma importante contribuição para a compreensão dos papéis da história, seleção, adaptação e especiação (CAIM & SHEPPARD 1954; CLARKE, 1978; DAVISON, 2002; SCHILTHUIZEM & DAVISON, 2005). Em geral, a forma da concha e a cor muitas vezes podem estar relacionadas com certos habitats ou pressões seletivas (CAMERON, 1981; SOLEM & CLIMO 1985; GOODFRIEND, 1986; HELLER, 1987; CHIBA & DAVISON, 2007). Estas características são conhecidas por natureza altamente adaptativa (GOODFRIEND, 1986; CHIBA, 2005; CHIBA & DAVISON, 2007) e isto pode resultar numa incongruência entre a taxonomia das espécies e relações filogenéticas (PARMAKELIS *et al.*, 2003; ALONSO *et al.*, 2006). Sendo assim, a discriminação entre espécies de gastrópodes terrestres através de características apenas morfológicas, nem sempre é suficiente devido as similaridades entre espécies (CHOH *et al.*, 2006) e pelas variações morfológicas existentes entre populações de uma mesma espécie (CALDEIRA *et al.*, 2000). Essa variação morfológica é maior em populações geograficamente separadas, bem como indivíduos que ocupem diferentes habitats dentro das populações (JONES *et al.*, 1977; HELLER,

1981). A plasticidade fenotípica, seja morfológica ou comportamental, é uma resposta adaptativa à heterogeneidade ambiental (THODAY, 1953; HENWOOD, 1975).

O uso de métodos moleculares em associação com métodos morfológicos tem se mostrado muito útil, ajudando a esclarecer se diferentes populações pertencem ou não a uma mesma espécie (RAAHAUGE & 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).

Os estudos morfológicos podem ser corroborados por estudos moleculares e citogenéticos, e estes potencialmente fornecem caracteres para análise filogenética. Essa análise integrativa pode fornecer “insights” valiosos sobre os processos de especiação. Moluscos terrestres, particularmente, são modelos interessantes para a avaliação de cenários de especiações adaptativas e não adaptativas (JORDAENS *et al.*, 2009).

O advento de novas visões conceituais sobre o significado biológico das espécies, assim como de novas metodologias, particularmente aquelas oriundas das disciplinas genética e biologia molecular, trouxe a necessidade da adaptação da abordagem taxonômica na tarefa de descrever e diferenciar espécies (PADIAL *et al.*, 2010). Dessa forma, surgiu o conceito de taxonomia integrativa, como uma abordagem plural para a tarefa da descrição e conhecimento da biodiversidade (DAYRAT, 2005; PADIAL *et al.*, 2010; PIRES & MARINONI, 2010; SCHILICK-STEINER *et al.*, 2010). SCHILICK-STEINER, *et al.* (2010), realizaram uma revisão sobre as disciplinas utilizadas para delimitar espécies de artrópodes. Os autores listaram 11 abordagens metodológicas: ¹morfologia, ²DNA mitocondrial, ³DNA nuclear, ⁴ecologia, ⁵enzimas, ⁶comportamento, ⁷compatibilidade reprodutiva, ⁸história de vida, ⁹química, ¹⁰análise do genoma total e a ¹¹citogenética.

A citogenética foi estabelecida como uma importante ferramenta que fornece dados relevantes que podem ser utilizados na taxonomia, identificação de espécies, e para a compreensão dos mecanismos de especiação e evolução (BURCH, 1968; THIRIOT-QUIÈVREUX, 2002; VITTURI *et al.*, 2005; AWODIRAN *et al.*, 2012; POONAM *et al.*, 2013). Várias mudanças da sistemática de gastrópodes pulmonados provaram que suas relações evolutivas não são bem estabelecidas (BABRAKZAI *et al.*, 1974, SOLEM, 1984, WADE *et al.*, 2007, COLOMBA *et al.*, 2009). Dessa forma estudos citogenéticos podem contribuir para a resolução de alguns problemas

taxonômicos no grupo, e em última instância para a melhor definição das relações dentro do filo (BABRAKZAI & MILLER, 1975; REEDER & MILLER, 1975; LEITÃO *et al.*, 2002; COLOMBA *et al.*, 2009).

Os estudos citogenéticos de moluscos pulmonados terrestres são restritos a poucas famílias (BURCH & PATTERSON, 1965; NATARAJAN & BURCH, 1966; NATARAJAN *et al.*, 1966; BURCH *et al.*, 1966; BURCH, 1967; BURCH & NATARAJAN, 1967; WU, 1973; BABRAKZAI & MILLER, 1974; BABRAKZAI & MILLER, 1975; AWODIRAN *et al.*, 2012). A maior parte desses estudos foi realizada nas décadas de 1960 e 1970 e as informações fornecidas restringem-se ao número cromossômico das espécies. Ainda nas décadas de 1960 e 1970, eram conhecidos os números cromossômicos de aproximadamente 0,5% das espécies descritas de moluscos (PATTERSON, 1969), sendo a maior parte gastrópodes. Atualmente, são conhecidas aproximadamente 60.000 espécies de gastrópodes e, dentre estas, 332 espécies foram estudadas com abordagem citogenética até o momento (305 foram cariotipadas e 27 incluem técnicas de bandeamento), mostrando o aumento do conhecimento da morfologia dos cromossomos durante as últimas três décadas (THIRIOT-QUIÈVREUX, 2003). Porém, o aumento de técnicas mais avançadas ainda é restrito a poucas famílias, sendo a maioria de moluscos aquáticos.

É provável que a literatura sobre análise do cariótipo de moluscos não seja abundante devido às dificuldades de obtenção de células em mitose, com qualidade suficiente para se realizar estudos cromossômicos (PARK *et al.*, 1999). Várias técnicas foram descritas para obter melhores preparações cromossômicas (BURCH, 1968; PATTERSON, 1971; BABRAKZAI & MILLER, 1974; THIRIOT-QUIÈVREUX & AYRAUD, 1982; AWODIRAN, *et al.*, 2012, POONAM, *et al.*, 2013). Entretanto, existem muitas dificuldades de obter preparações adequadas, uma vez que podem ser utilizadas várias partes do animal como gônadas, intestino, embriões e brânquias e para cada tecido é necessário um protocolo específico, com diferentes concentrações dos reagentes e tempos de incubação.

A maioria dos estudos sobre os cromossomos de moluscos que utilizam técnicas histológicas ou “squash techniques” têm abordado exclusivamente, os números cromossômicos das espécies (BURCH & NATARAJAN, 1967; PATTERSON, 1969; PATTERSON & BURCH, 1978). Análises de cariótipos são úteis para discernir

relações sistemáticas, entretanto, a maioria dos cariótipos de moluscos descritos refere-se a uma única espécie de um gênero ou, no melhor cenário, algumas espécies relacionadas (BURCH, 1968; AWODIRAN *et al.*, 2012). O potencial da utilização de caracteres citogenéticos para reconstrução filogenética pode ser esclarecido, se mais representantes de cada família forem incluídas nas análises e, acima de tudo, se sinapomorfias confiáveis forem descobertas (COLOMBA *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de metodologias, tais como o tratamento prévio com colchicina e tratamento hipotônico, combinados com técnicas de secagem ao ar, permitiu a melhor avaliação da morfologia cromossômica. A construção do cariótipo, ou seja, o emparelhamento dos cromossomos de acordo com seu tamanho e morfologia se tornou viável e com as medições cromossômicas foi possível uma identificação mais precisa dos cromossomos (STERN, 1975; THIRIOT-QUIÈVREUX, 2002). A nomenclatura de posição centromérica delineada por LEVAN, FREDGA & SANDBERG (1964) é utilizada até hoje para a classificação centromérica.

Com o desenvolvimento das técnicas de coloração pela prata, bandeamento C e G e DAPI-CMA₃, outras formas de comparação além do número cromossômico puderam ser aplicados a espécies de moluscos (THIRIOT-QUIÈVREUX, 1994; LEITÃO *et al.*, 2002; VITTURI *et al.*, 2002, WOZNICKI & JANKUN, 2004; VITTURI *et al.*, 2005). As técnicas mais avançadas, tais como a utilização de fluorescência *in situ* (FISH) com sondas de DNAr para visualizar as regiões organizadoras de nucléolo (RONs) foram iniciadas em gastrópodes principalmente a partir dos anos 1990 (PASCOE *et al.*, 1996; COLOMBA *et al.*, 2002; VITTURI *et al.*, 2002; VITTURI *et al.*, 2005).

O presente estudo objetivou estabelecer protocolos para o estudo citogenético de moluscos terrestres através da realização de bioensaios visando testar diferentes tecidos, concentrações dos reagentes e tempos de incubação. Para isso, foi realizada uma revisão prévia dos protocolos descritos para Mollusca e estabelecidos protocolos que foram testados, utilizando-se a espécie *Leptinaria unilamellata* (Pulmonata, Subulinidae) como modelo experimental.

Seção 1

Estabelecimento de protocolos para estudos citogenéticos de moluscos terrestres: bioensaios utilizando *Leptinaria unilamellata* (Pulmonata: Achatinoidea: Subulinidae) como modelo experimental

1.1 Introdução

Leptinaria unilamellata (d'Orbigny, 1835) é um pequeno estilomatóforo terrestre com aproximadamente 11 mm de comprimento e 5 mm de largura (SIMONE, 2006). Os Stylommatophora incluem de 20.000 a 30.000 espécies de caracóis terrestres e lesmas pertencentes a 30-40 famílias (COLOMBA *et al.*, 2009).

A citogenética foi estabelecida como uma importante ferramenta que fornece dados relevantes que são utilizados em taxonomia, identificação de espécie e em compreender os mecanismos de especiação e evolução (BURCH, 1968). A importância do conhecimento sobre os cromossomos é cada vez mais reconhecida (SKUZA *et al.*, 2009). Estudos citogenéticos abrangem diferentes níveis de organização biológica que vão desde o morfológico ao molecular, dependendo das técnicas. O estudo dos cromossomos pode ser aplicado como uma manifestação morfológica do genoma em termos de tamanho, forma, número e comportamento durante a meiose e a mitose (THIRIOT-QUIÈVREUX, 2002). O estudo cromossômico de moluscos é de especial interesse para citologistas devido à extrema diversidade na morfologia, anatomia e número de espécies (BURCH, 1965).

Os moluscos apresentam notáveis variações interespecíficas como a pigmentação, morfologia da concha, padrão de bandas e ornamentação (SCHILTHUIZEN, 2003), os quais podem têm sido tradicionalmente utilizados para fins taxonômicos. No entanto, inúmeros estudos têm documentado alta variação intra-específica na forma e na coloração das conchas (GOODFRIEND, 1986). Tais variações limitam o uso de caracteres da concha como marcadores taxonômicos. Da mesma forma, vários estudos (DAVIS, CHEN & YU, 1994; WILKE, PFENNINGER &

DAVIS, 2002) demonstraram elevada variabilidade intraespecífica nos caracteres anatômicos, indicando uma má resolução taxonômica, embora caracteres dos órgãos genitais sejam usados extensivamente para estudos de taxonomia e sistemática (FIORENTINO, MANGANELLI & GIUSTI, 2008).

Vários rearranjos da sistemática de gastrópodes pulmonados provaram que suas relações evolutivas são em grande parte mal resolvida (SOLEM, 1984), e acredita-se que estudos citogenéticos podem contribuir com valiosos caracteres sistemáticos que podem ser usados para resolver alguns problemas taxonômicos no grupo (PARK *et al.*, 1999).

Os estudos citogenéticos disponíveis para Stylommatophora são extremamente escassos (PATTERSON, 1969; THIRIOT-QUIÈVREUX, 2003) e concentrados principalmente no número haplóide (n) e/ou diplóide ($2n$) de cromossomos e sua morfologia. Estudos moleculares são igualmente escassos. VINOGRADOV (2000) determinou o tamanho do genoma e a composição de bases do genoma de 15 espécies de pulmonados, sendo apenas 5 estilomatóforos.

Técnicas de bandeamento, tais como impregnação por prata (bandas Ag-NORs), bandas C e coloração por fluorocromos têm sido utilizados com sucesso para obter conhecimento sobre a complexidade do DNA genômico e a organização em animais e plantas (SUMNER, 1990, VITTURI *et al.*, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi estabelecer protocolos para o estudo citogenético de moluscos terrestres através da realização de bioensaios visando testar diferentes tecidos, concentrações dos reagentes e tempos de incubação. Para isso, foi realizada uma revisão prévia dos protocolos descritos para Mollusca e estabelecidos protocolos que foram testados, utilizando-se a espécie *Leptinaria unilamellata* (Pulmonata, Subulinidae) como modelo experimental.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 Pesquisa Bibliográfica

A pesquisa bibliográfica foi realizada em bases de dados eletrônicas e na biblioteca especializada em malacologia do Museu de Malacologia Prof. Maury Pinto de Oliveira, da UFJF.

Palavras-chaves

Para a busca em bases de dados eletrônicas utilizamos as seguintes palavras-chaves: Bivalvia, chromosome, citotaxonomy, Clams, complex, cytogenetics, cryptic species, freshwater snails, FISH, Gastropoda, Gastropods, hidden biodiversity, karyological analysis, karyotype, land snails, Mollusca, Molluscs, Mollusks, Mollusques, NORs, Pulmonata, pulmonates, silver technique, snails.

Base de dados

As bases de dados utilizadas foram o Google scholar, Scientific Electronic Library Online – Scielo, Periódicos Capes e Pubmed.

1.2.2 Animais

Os moluscos da espécie *L. unilamellata* foram coletados no município Belo Horizonte, Minas Gerais. Posteriormente eles foram trazidos para o laboratório do Museu de Malacologia Professor Maury Pinto de Oliveira e mantidos em caixas plásticas transparentes (14 cm em diâmetro, 9 cm em altura), recobertas com terra vegetal, umedecida a intervalos de dois dias, com 10mL de água de torneira. Os moluscos foram alimentados *ad libitum* com ração de aves para corte suplementada com carbonato de cálcio (na proporção de 3:1) (BESSA & ARAÚJO, 1995) e mantidos sob temperatura ambiente e condições naturais de luz e temperatura. A partir dos moluscos do campo, foram formadas criações matrizes de laboratório, das quais foram obtidos os moluscos utilizados nos experimentos.

1.2.3 Protocolos testados

Foram testados nove protocolos com diferentes concentrações e tempo de atuação dos reagentes e do bloqueador mitótico. O primeiro protocolo foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética e Evolução da UFV e denominado *Protocolo Base*. A partir desse protocolo foram feitas adaptações e estabelecidos outros protocolos.

Protocolo Base

O Protocolo Base foi realizado com embriões em fase inicial do desenvolvimento (poucas células), retirados diretamente do oviduto de moluscos da espécie *L. unilamellata* (Figura 1). Os embriões foram incubados em colchicina 0,01% por duas horas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução de citrato de sódio 0,8% por 20 minutos ao abrigo de luz, fixados em solução de etanol:ácido acético na proporção de 3:1, em 3 banhos de 20 minutos, transferidos para lâminas de vidro escavadas e sobre eles gotejada uma solução de ácido acético 60% para a dissociação das células. Em seguida, o conteúdo foi pipetado e transferido para outra lâmina limpa (previamente lavada e seca em estufa). As lâminas foram submetidas à secagem parcial em placa aquecedora à 40°C até a evaporação do ácido acético. Depois, as lâminas foram retiradas e secas à temperatura ambiente por 12h. As lâminas foram coradas com GIEMSA 4% em tampão Sorence p.h. 6.8 por 30 minutos e, em seguida, enxaguadas em água de torneira corrente.

A partir desse Protocolo Base, foram estabelecidos os protocolos de I a V, utilizando-se além dos embriões, o intestino dos moluscos.

Protocolo I

Para o estabelecimento do *Protocolo I*, foi alterada a concentração de colchicina de 0,01% para 0,1% e o tempo de incubação de duas horas para duas horas e trinta minutos, sendo todo o procedimento restante foi mantido segundo o Protocolo Base.

Protocolo II

Para o estabelecimento do *protocolo II*, mantivemos a concentração da colchicina de 0,1% e aumentamos o tempo de incubação para quatro horas. O tempo de incubação do citrato de sódio foi modificado de 20 minutos para uma hora e todo o procedimento restante foi mantido.

Protocolo III

Para o estabelecimento do *Protocolo III*, a modificação consistiu em incubar os embriões por oito horas em colchicina a 0,1%, o tempo de incubação em citrato de sódio 0,8% e a fixação dos embriões em solução de etanol:ácido acético foram realizados como no protocolo anterior (1h). Um embrião por vez foi transferido para uma lâmina limpa e, na própria lâmina, fez-se a dissociação do embrião juntamente com duas gotas de ácido acético 60%. As lâminas foram secas *overnight* à temperatura ambiente. Posteriormente as lâminas foram coradas com Giemsa 100% em um banho rápido e único, por volta de 5 segundos, lavadas sob um fio de água corrente de torneira e secas à temperatura ambiente.

Protocolos IV e V

Para o estabelecimento dos *Protocolos IV e V*, foram feitas adaptações no *protocolo III*, aumentando-se apenas o tempo de incubação em colchicina 0,1% para 12h no *protocolo IV* e 24h no *protocolo V*, assim como o tempo de incubação do citrato de sódio 0,8% para 2h e 4h, respectivamente. Todas as etapas seguintes foram mantidas como descrito no protocolo III.

Protocolos VI, VII e VIII

Os *Protocolos VI, VII e VIII* foram desenvolvidos no Laboratório de Sistemática molecular *Beagle*, da Universidade Federal de Viçosa, que consiste em uma adaptação do protocolo de citogenética para peixes BERTOLLO *et al.* (1978). Nos *protocolos VI e VII*, ao invés de embriões foram utilizados o molusco inteiro, com exceção da concha e massa cefalopodal e no *protocolo VIII* foi utilizado todo o animal, apenas sem a concha.

O *protocolo VI* seguiu as seguintes etapas: as duas primeiras voltas da concha do molusco foram quebradas, a colchicina 1% injetada no animal, e tempo de incubação foi de 1h. Em seguida, o molusco foi dissecado sob microscópio estereoscópico Olympus SZX7. Os embriões e o corpo do molusco foram macerados com uma seringa de vidro e incubados em solução hipotônica de citrato de sódio 0,8%, em quantidade suficiente para cobrir o corpo do animal, por 20 minutos em estufa a 37°C. Em seguida,

a fração líquida foi separada dos fragmentos de tecido e transferida para tubos falcon. Para cada 1ml de líquido foi adicionada uma gota de fixador (metanol:ácido acético, na proporção de 3:1). A solução foi centrifugada a 1.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, a fração líquida foi descartada e ao *pellet* foi adicionado fixador até completar 5ml. Essa solução foi novamente centrifugada por 10 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes. Em seguida, a fração líquida foi retirada dos tubos deixando-se apenas 0,5 ml de líquido. O volume foi completado com 1ml de fixador e a solução foi homogeneizada e transferida para tubos plásticos de 1 ml de capacidade. Para confeccionar as lâminas, lâminas de vidro foram colocadas num Becker com água destilada sob uma chama até atingir a temperatura de 45°C. O conteúdo dos tubos plásticos foi gotejado nas lâminas a uma distância de um metro. As lâminas foram coradas com Giemsa 5%, por 5 minutos e secas à temperatura ambiente ou em estufa à 37°C graus.

No *protocolo VII*, foram utilizados 5 indivíduos sexualmente maduros, que foram processados juntos e no *protocolo VIII* foram utilizados três indivíduos maduros que foram processados individualmente. Nos dois protocolos o ápice da concha foi quebrado, porém, no *protocolo VIII* os animais foram retornados para o terrário, onde foram deixados para acomodação por aproximadamente 14-15 horas anteriormente à injeção de colchicina, enquanto no *protocolo VII*, foi injetada colchicina, 0,0125% no animal logo em seguida à quebra do ápice da concha e no *protocolo VIII* após 15h de acomodação. O tempo de incubação da colchicina foi de 1h, ao abrigo de luz. Todos os procedimentos posteriores à incubação em colchicina foram de acordo com o *protocolo VI*, sendo alterada apenas a velocidade de rotação da centrífuga de 1.000 rpm para 1.500 rpm. Os experimentos foram realizados nos períodos de Setembro de 2012 à Dezembro de 2013, sendo o protocolo base feito em setembro de 2012, os protocolos I, II, III, IV e V no período de abril à junho de 2013, o protocolo VII no período de junho à julho de 2013 e o protocolo VIII em dezembro de 2013.

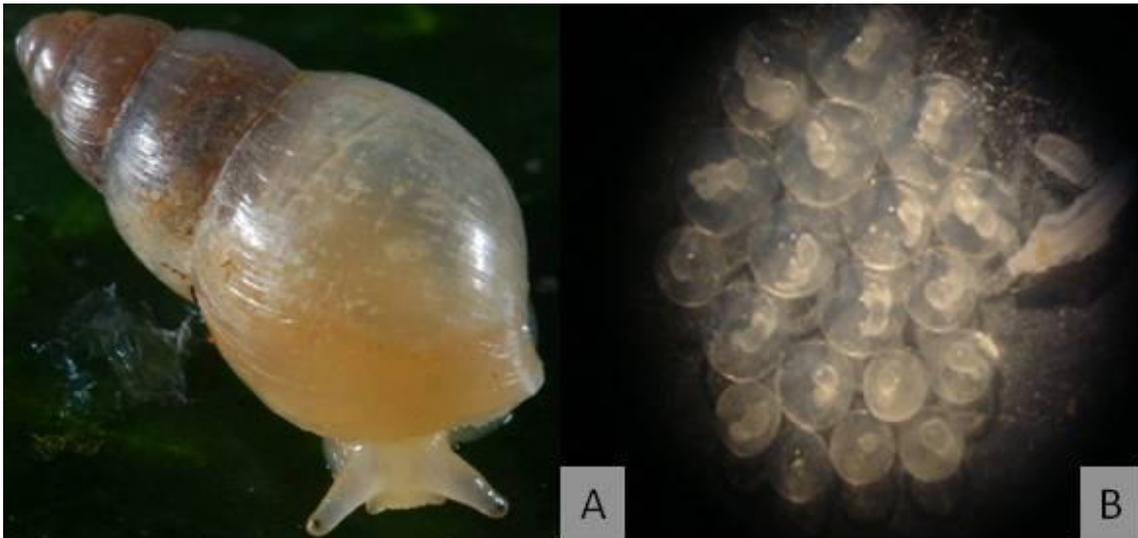


Figura 1. A. Molusco adulto da espécie *Leptinaria unilamellata*. B. Embriões retirados do oviduto de um molusco grávido.

1.2.4 Técnica de coloração de prata

Para a realização da técnica de coloração com nitrato de prata utilizamos as lâminas com maiores quantidades de núcleos. Essa técnica foi baseada em HOWEELL & BLACK (1980). Fizemos o nitrato de prata à 50%, gotejamos essa solução nas lâminas e colocamos em banho maria à 60°C, por duas horas. Em seguida, retiramos a lamínula plástica e lavamos as lâminas em água corrente de torneira e colocamos para secar em estufa à 37°C. Em seguida, as lâminas foram analisadas sob microscópio Olympus BX41 e fotografadas em microscópio BX41 com câmera Cool Snap P-Pro acoplada.

1.2.5 Processamento dos animais

O material destinado ao estudo citogenético foi obtido usando-se embriões (*protocolo base*), embriões e intestino (*protocolos I a V*), o corpo inteiro do animal, com exceção da concha e massa cefalopodal (*protocolos VI e VII*) e o corpo inteiro do animal, apenas sem a concha (*protocolo VIII*). Os embriões em estágio inicial do desenvolvimento embrionário (poucas células) foram retirados diretamente do oviduto

de moluscos sexualmente maduros, e em seguida incubados em colchicina. O intestino foi retirado dos mesmos animais dos quais foram obtidos os embriões, através da dissecação destes. Nos *protocolos VI e VII* foi utilizado todo o corpo do animal, retirando-se apenas a concha e massa cefalopodal. E no *protocolo VIII* utilizou-se o animal inteiro, sem retirar a massa cefalopodal. Para estes três últimos protocolos utilizamos indivíduos jovens, com até 120 dias de vida.

1.2.6 Captura e Análise de Imagens

As lâminas foram analisadas sob microscópio Olympus BX41 e quando detectada a presença de células em metáfase, a posição dessas foi marcada com a ajuda de uma lâmina branca ou lâmina-guia. Posteriormente as lâminas foram fotografadas em microscópio BX41 com câmera Cool Snap P-Pro acoplada. As imagens foram capturadas com a ajuda do programa Image-ProPlus e posteriormente editadas no Adobe Photoshop CS6. A partir dessas imagens, foi feito um idiograma no programa Microsoft Office Excel 2007, utilizando-se as médias dos braços curtos e braços longos dos pares cromossômicos.

1.2.7 Morfometria dos cromossomos

O idiograma e cariograma de *L. unilamellata* foram confeccionados segundo o critério de disposição dos cromossomos em ordem decrescente do braço curto. Após a digitalização das imagens obtidas, os cromossomos foram medidos com o auxílio do software Image Pro-Plus 4.5 (Media Cybernetics). Foram calculados os comprimentos do braço curto (bc); braço longo (bl); comprimento total (ct); razão entre as médias dos braços ($r=bl/bc$); o índice centromérico (ic). A classificação morfológica dos cromossomos foi feita com base na relação de braços, de acordo com Levan *et al.* (1964), em que cromossomos com r entre 1,0 e 1,7 são metacêntricos (m); cromossomos com r entre 1,7 e 3,0 são submetacêntricos (sm) e cromossomos com r entre 3,0 e 7,0 são subtelocêntricos (st). Adicionalmente, foram calculadas a assimetria de cada cromossomo (A_i) e o grau de assimetria do cariótipo (A), de acordo com a expressão proposta por WATANABE *et al.* (1999) em que A varia de 0 (completamente simétrico) a 1 (completamente assimétrico).

$$A_i = (b_l - b_c) / (b_c + b_l) \quad e \quad A = (1/n) \sum A_i$$

1.3 Resultados

1.3.1 Pesquisa em base de dados

A pesquisa em bases de dados resultou no encontro de 27 artigos, sendo 17 referentes à gastrópodes marinhos e bivalves marinhos e de água doce e 10, referentes à gastrópodes pulmonados terrestres. Dentre os 17 artigos sobre citogenética de gastrópodes e bivalves marinhos, 41% não apresentam descrição da técnica utilizada e 6% apresentam descrições incompletas. E 53% dos artigos apresentam a descrição completa dos protocolos utilizados, incluindo todas as etapas necessárias para a obtenção de metáfases (Tabelas I e II). Dentre os 10 artigos referentes a gastrópodes pulmonados, 70% não apresentam descrição da técnica utilizada e 20% apresentam descrições incompletas. Apenas 10% dos artigos apresentam a descrição completa dos protocolos utilizados, incluindo todas as etapas necessárias para a obtenção de metáfases (Tabela III). Em alguns desses protocolos, antes de injetar o bloqueador mitótico (colchicina) utilizou-se cobalto clorídrico 0,4%, com tempo de ação de até 60 horas. As concentrações de colchicina variaram de 0,005% a 0,1% de acordo com o tecido usado e o tempo de incubação variou de 30 minutos a 20 horas. Segundo os protocolos, após o uso da colchicina, as células ou o fragmento de tecido são deixados em contato com água destilada ou solução hipotônica. Quando utilizada a água destilada, o tempo de ação varia de 30 à 60 minutos. Nos protocolos em que são utilizadas soluções hipotônicas, estas podem ser de citrato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio ou solução de citrato de sódio e solução de KCl, com as concentrações e tempos de ação variando de 0,8% ou 0,9%, de 30 à 40 min; 0,01% por 1h; 0,075M de 20 à 30 minutos e 0,35% (citrato de sódio) e 0,28% (solução de KCl) por 30 minutos, respectivamente. A próxima etapa é a fixação, que pode ser feita por metanol:ácido acético 3:1, etanol:ácido acético 3:1 ou etanol absoluto:ácido acético 3:1, geralmente dá-se três banhos que podem ser de 5 à 30 minutos, cada. Em alguns protocolos, a troca de fixador vem juntamente com a centrifugação à 1000 rpm. O material é centrifugado por três vezes, trocando-se o fixador após cada centrifugação. Em seguida, naqueles protocolos onde é realizada a dissociação das células, estas são dissociadas em ácido acético 50 ou 60%. A coloração pode ser feita por orceína-acética (LA COUR, 1941), pingando a suspensão em lâminas aquecida à 46°C por 30 minutos ou por Giemsa. Com Giemsa, as concentrações variam de 1 à 5% com p.H. de 6.8 à 7.0,

o tempo de ação pode variar de 10 à 30 min. e as lâminas quando aquecidas, a temperatura varia de 45 à 60°C.

Tabela I. Resumo das metodologias empregadas e números cromossômicos descritos para gastrópodes marinhos.

	Resumo da Metodologia empregada	NC	Referência
1	Gastropoda Patellogastropoda Patellidae <i>Patella caerulea</i>	Injetou-se 1mg/ml de colchicina (0.1 ml/10g do peso corporal) por indivíduo. Depois de 12h, as gônadas foram removidas e incubadas em solução hipotônica (0.35% citrato de sódio + 0.28% de solução de KCl) por 30 minutos. Fixador: metil:ácido acético 3:1 por 30min. A suspensão de células gonadais foi preservada a -20°C até a sua utilização. As lâminas foram secas ao ar. Coloração: Giemsa 5% e ph7.	2n=18 Petraccioli <i>et al.</i> (2010)
	<i>P. rústica</i>	2n=18	
	<i>P. ulysiponensis</i>	2n=16	
2	Caenogastropoda Calyptraeidae <i>Crepidula unguiformis</i>	Foram utilizados indivíduos maduros, nos quais foi injetado 0.01% de colchicina por 2h. Tecido: gônadas. As lâminas foram secas ao ar. Coloração: Giemsa.	Libertini <i>et al.</i> (2009)
		2n=34	
3	Naticidae <i>Naticarius stercusmuscarum</i>	A técnica não foi descrita	Inaba, 1959 <i>a</i> Inaba, 1959 <i>a</i>
4	Heterobranchia Pleurobranchaeidae <i>Pleurobranchaea novaezealandiae</i>		n=12
5	Dorididae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba and Hirota, 1958
6	Dendrodorididae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba and Hirota, 1958
7	Triophidae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba and Hirota, 1958
8	Goniodorididae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba and Hirota, 1958
9	Fimbriidae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba, 1959 <i>a</i>
10	Dotonidae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba, 1961
11	Arminidae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba and Hirota, 1958
12	Cuthonidae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba, 1961
13	Facelinidae	A técnica não foi descrita	n=13 Inaba and Hirota, 1958
14	Favorinidae	A técnica não foi descrita	n=13 Burch and Natarajan, 1967
15	Notaspidae	A técnica não foi descrita	n=12 Burch and Natarajan, 1967
16	Pyramidellidae	A técnica não foi descrita	n=17 Inaba, pers. Comm.
17	Aplysiidae	A técnica não foi descrita	n=17 Inaba, 1959 <i>a</i>
18	Acteonidae	A técnica não foi descrita	n=17 Inaba, 1959 <i>a</i>
19	Philinidae	A técnica não foi descrita	n=17 Inaba, 1959 <i>a</i>
20	Aglajidae	A técnica não foi descrita	n=17 Inaba, 1959 <i>a</i>
21	Atyidae	A técnica não foi descrita	n=17 Inaba, 1959 <i>a</i>
22	Smaragdinellidae	A técnica não foi descrita	n=18 Burch and Natarajan, 1967
23	Eysiidae	A técnica não foi descrita	n=17 Inaba, 1959 <i>a</i>
24	Stiligeridae	A técnica não foi descrita	n=17 Mancino and Sordi, 1964 <i>b</i>
25	Jutiidae	A técnica não foi descrita	n=17 Mancino and Sordi, 1964 <i>b</i>

Tabela I. Continuação.

		Resumo da metodologia empregada	NC	Referência
26	Polybranchiidae	A técnica não foi descrita	n=7	Mancino and Sordi, 1964b
27	Favorinidae	Tecido: ovotestis. Fixador: Newcomer`s (1953) ou Carnoy`s (1887) ou Sanfelice (1918). Coloração: técnica de La Cour (1941).	n=13	Natarajan & Burch (1966)
	<i>Dendrodoris nigra</i>			
	<i>Herviella mietta</i>		n=13	
28	Aplysiidae	Tecido: ovotestis Fixador: Newcomer`s (1953) ou Carnoy`s (1887) ou Sanfelice (1918). Coloração: técnica de La Cour (1941)	n=17	Natarajan & Burch (1966)
	<i>Dolabrifera dolabrifera</i> e			
	<i>Stylocheilus longicauda</i>		n=17	
29	Atyidae	Tecido: ovotestis Fixador: Newcomer`s (1953) ou Carnoy`s (1887) ou Sanfelice (1918). Coloração: técnica de La Cour (1941)	n=17	Natarajan & Burch (1966)
	<i>Haminoea linda</i>			
	<i>H. musetta</i>			
30	Smaragdinellidae	Tecido: ovotestis Fixador: Newcomer`s (1953) ou Carnoy`s (1887) ou Sanfelice (1918). Coloração: técnica de La Cour (1941).	n=18	Burch & Natarajan (1967)
	<i>Lathophthalmus smaragdinus</i> e			
	<i>Smaragdinella calyculata</i>			
31	Assimineidae	Não houve descrição da técnica	n=15	Burch (1967)
	<i>Assiminea sp.</i>			
	<i>Adelomorpha sp.</i>		n=17	
32	Oxynoidae	Tecido: Ovotestis. Os animais foram dissecados e tratados com solução hipotônica de KCl 0.075M por 20 min. Fixador: metanol:ácido acético 3:1 por 15 minutos. Pedacos pequenos de folículos foram esmagado com agulhas de dissecação e colocados em 1 a 2ml de ácido acético 50%. Coloração: Giemsa 5% (pH6.8) por 10 a 15 minutos.	2n=30	Vitturi <i>et al.</i> (2000)
	<i>Oxynoe olivacea</i>			
33	Patellogastropoda	Em cada espécime foi injetada 1mg/ml de colchicina (0.1 ml/10g do peso corporal). Depois de 12h, as gônadas foram removidas e incubadas em solução hipotônica (0.35% citrato de sódio + 0.28% de solução de KCl) por 30 minutos. As gônadas foram dissecadas e fixadas em metil:ácido acético 3:1 por 30min.. A suspensão de células gonodais foi preservada a -20°C até a sua utilização. As lâminas foram secas ao ar. Coloração: Giemsa 5% ph7.	2n=18	Petraccioli <i>et al.</i> (2010)
	Patellidae			
	<i>Patella caerulea</i> ,			
	<i>P. rústica</i>		2n=18	
	<i>P. ulyssiponensis</i>		2n=16	

Legenda: NC – número cromossômico.

Tabela II. Números cromossômicos descritos para bivalves marinhos e de água doce.

		Técnica	NC	Referência
1	Bivalvia Unionidae <i>Anodonta anatine</i>	A divisão celular foi estimulada através da injeção <i>in vivo</i> de solução de Cobalto clorídrico 0.4% (0.05 ml por espécime). Depois de 60h, a solução de colchicina 0.1% foi injetada no animal <i>in vivo</i> por 6h. As brânquias foram hipotonizadas por 60 min em água destilada. Fixador: metanol:ácido acético 3:1. Após a fixação, a solução foi centrifugada três vezes a 1000 rpm. As lâminas foram secas ao ar. Coloração: Giemsa 5% por 20 minutos.	2n=28	Woznicki & Jankun (2004)
2	Sphaeriidae <i>Sphaerium corneum</i>	Colchicina a 0,01% foi injetada no animal por um período de 12-14 h à temperatura ambiente; em seguida, utilizou-se água destilada por 30-40 min para hipotonia. Fixador: solução de Carnoy (ácido acético: etanol, 1:3) em três banhos de 20 min. As lâminas foram secas ao ar. Coloração: Giemsa 4%, pH 6,8, por 30 min.	2n=30 2n=36	Petkeviciut <i>et al.</i> (2005)
3	Cardiidae <i>Ruditapes decussatus</i>	Indivíduos jovens foram incubados em colchicina 0,005% por 7h. As brânquias foram tratadas com citrato de sódio 0,9% por 30min. Fixador: álcool absoluto e ácido acético 3:1, em três banhos de 20 min. As lâminas foram preparadas secas ao ar. Coloração: Giemsa 1%.	2n=38	Leitão <i>et al.</i> (2006)
4	Veneridae <i>Cerastoderma edule</i>		2n=38	
5	Pectinidae <i>Argopecten irradians irradians</i>	As larvas foram tratadas com colchicina (10 Mgml ⁻¹) por 2h e kCl (0,075 M) por 30 min. Fixador: solução de Carnoy (metanol:ácido acético 3:1), em três banhos de 15 min. As larvas fixadas foram dissociadas numa suspensão de células em ácido acético 50% e logo após a suspensão foi pingada em lâminas aquecidas a 56°C. as lâminas foram secas ao ar.	2n=32	Huang <i>et al.</i> (2007)
6	Donacidae <i>Donax trunculus</i>	As brânquias foram incubadas em colchicina 0,005% durante 12 h. Fixador: etanol: ácido acético. pequenos pedaços de tecido foram dissociados em solução de ácido acético 60%. A suspensão de células foi gotejada em lâminas aquecidas à 50 °C. As lâminas foram secas ao ar.	2n=38	Petrović <i>et al.</i> (2008)
7	Corbiculidae <i>Corbicula fluminalis</i>	A divisão celular foi estimuladas <i>in vivo</i> com uma solução de Cobalto clorídrico 0,4% e incubação por 60h. Solução de colchicina 0,01% injetada <i>in vivo</i> e incubação por 6h. Slução hipotônica: NaCl 0,01% por 1h. Fixador: Solução de metanol:ácido acético 3:1. Coloração: solução de orceína à 46°C por 30 min.	3n=54	Skuza <i>et al.</i> (2009)

Legenda: NC – número cromossômico.

Tabela III - Número cromossômico de gastrópodes pulmonados.

	Técnica	NC	Referências
Gastropoda Soleolífera	A técnica não foi descrita	n= 16—18	Burch, 1967
Eupumonata			
Polygridae			
1 <i>Triodopsis fraudulenta</i>	A técnica não foi descrita	n=29-31	Babrazai & Miller (1974)
<i>Triodopsis germane</i>		n=32	
<i>Vespericola Columbiana</i>		n=29-31	
<i>Ashmunella chiricahuana</i>		n=29	
<i>Praticolella berlandieriana</i>		n=29	
2 Helminthoglyptidae	A técnica não foi descrita		Babrazai & Miller (1975)
<i>Sonorelix borregoensis</i>		2n=58	
<i>Greggelix indígena</i>		2n=58	
<i>Helminthoglypta cf. lowei</i>		2n=60	
3 Succineidae			
<i>Succinea (Novisuccinea) concordialis,</i>		2n=18	Babrazai & Miller (1975)
<i>S. (N.) greeri,</i>		2n=18	
<i>S.(N.) urbana</i>		2n=18	
<i>S.(Calcisuccinea) luteola</i>		2n=18	
<i>S.(C.?) grosvenori</i>		2n=19	
<i>Oxyloma salleana</i>		2n=19	
<i>Catinella rotundata;</i>	A técnica não foi descrita	2n=10	Burch <i>et al.</i> (1966)
<i>C. vermeta</i>		2n=12	
<i>C. cf. gabbi</i>		2n=12	
<i>Succinella oblonga</i>		2n=24	
<i>Oxyloma hirasei;</i>		2n=34	
<i>O.kwansae;</i>		2n=34	
<i>O. elegans;</i>		2n=34	
<i>O.sarsi;</i>		2n=34	
<i>O. retusa</i>		2n=38	
<i>Calcisuccinea campestris</i>		n=18	
<i>Novisuccinea hortícola</i>		2n=34	
<i>N. ovalis</i>		2n=40	
<i>N. ovalis</i>		2n=42	
<i>N. ovalis</i>		2n=42	
<i>Succinea putris</i>		2n=44	
<i>S. lauta</i>		2n=44	
<i>S. l. sphaerica</i>		2n=44	
<i>Catinella rotundata</i>	A técnica não foi descrita	n=5	Burch (1967)
<i>Oxyloma japonica</i>		n=15	
<i>Oxyloma hirasei</i>		n=17	
<i>Oxyloma h. kwansae</i>		n=17	
<i>Succinea hortícola</i>		n=17	
<i>Succinea kuntziana</i>		n=18	
<i>Succinea strubelli</i>		n=18	
<i>Succinea lauta</i>		n=22	
<i>Succinea l. sphaerica</i>		n=22	
4 Pupinidae	A técnica não foi descrita		Burch (1967)
<i>Pupina sp.</i>		n=13	
5 Achatinellidae	A técnica não foi descrita		Burch (1967)
<i>Achatinella mustelina;</i>		n=20	
<i>Achatinella bellula;</i>		n=20	
<i>Achatinella producta stewartii;</i>		n=21	
<i>Auriculella auricula</i>		n= 23	
6 Athoracophoridae	A técnica não foi descrita		Burch (1967)
<i>Aneitea sp.</i>		n=44	
7 Philomycidae(lesma)	A técnica não foi descrita		Burch (1967)
<i>Incilaria confusum</i>		n=24	
<i>Incilaria fruhstorferi</i>		n=24	
8 Zonitidae	A técnica não foi descrita		Burch (1967)
<i>Vitrinopsis sp.</i>		n=28	
<i>Trochomorpha sp.</i>		n=28	
<i>Trocomorpha sp.</i>		n=30	
<i>Dyakia striata</i>		n=29	

Legenda: NC – número cromossômico.

Tabela III. Continuação.

		Técnica	NC	Referências
9	Achatinidae	A técnica não foi descrita	n=30	Awodiran <i>et al.</i> (2012)
	<i>Archachatina marginata</i>	Injeção de 0.5ml de 0.075M de solução hipotônica KCl <i>in vivo</i> e incubação por 2 horas. Injeção de 0.2ml de colchicina 0.02%. O ovotestis foi removido e fixado em metanol: ácido acético 3:1 por 24h. Fragmentos do ovotestis foram incubados em ácido acético 40%. A suspensão de células foi gotejada em lâminas pré-aquecidas e secas ao ar por 1h. Coloração: Orceína por 75 min.	2n=56	Awodiran <i>et al.</i> (2012)
	<i>Achatina achatina</i>		2n=56	
	<i>Achatina fulica</i>		2n=54	
	<i>Archachatina papyracea</i>		2n=44	
10	Subulinidae			Burch (1967)
	<i>Lamellaxis mauritianus</i>	A técnica não foi descrita	n=25	
	<i>Subulina octona</i>		n=31	
11	Helicarionidae	A técnica não foi descrita		Burch (1967)
	<i>Helicarion sp.</i>		n=28	
12	Bulimulidae	A técnica não foi descrita	n=29-30	Burch (1967)
	<i>Bulimulus nux</i>	A técnica não foi descrita	n=29	Burch (1967)
	<i>Placostylus miltocheilus</i>		n=30	
	<i>Diplomorpha sp.</i>		n=30	
13	Camaenidae	A técnica não foi descrita		Burch (1967)
	<i>?Draparnaudia singularis</i>		n=27	
	<i>Papuina sp.</i>		n=28	
	<i>Chloritobadi sp.</i>		n=29	
			n=29	
	<i>Hadra sp.</i>		n=29	
	<i>Meracomelon sp.</i>		n=29	
	<i>Pleuroxia sp.</i>		n=29	
	<i>Sinumelon sp.</i>		n=29	
	<i>Xanthomelon sp.</i>		n=29	
	<i>Satsuma myomphala</i>		n=29	
14	Bradybaenidae	A técnica não foi descrita	n=28-29	Babrazkai and Miller, 1975.
	<i>Bradybaena similaris</i>		n=28	Burch (1967)
	<i>Bradybaena gainesi</i>		n=29	
	<i>Euhadra callizona</i>		n=28	
	<i>E. congênita</i>		n=28	
	<i>E. eoa</i>		n=28	
	<i>E. grata</i>		n=28	
	<i>E. peliomphala</i>		n=28	
	<i>E. sadoensis</i>		n=28	
	<i>E. sandai</i>		n=28	
	<i>E. senckenbergiana</i>		n=28	
	<i>E. awaensis</i>		n=29	
	<i>E. idzumonis</i>		n=29	
	<i>E. quaesita</i>		n=29	
	<i>E. scaevola</i>		n=29	
	<i>Acuta despecta</i>		n=29	
	<i>Aegista vatheleti</i>		n=29	
	<i>Bradybaena similaris</i>	A técnica não foi descrita	2n=56	Babrazkai & Miller (1975)

Legenda: NC – número cromossômico.

Tabela III. Continuação.

		Técnica	NC	Referências
16	Smaragdinellidae <i>Lathophthalmus smaragdinus</i> <i>Smaragdinella calyculata</i> Onchidiidae <i>Onchidella evelinae</i>	Tecido: ovotestis Fixador: Newcomer`s (1953) ou Carnoy`s (1887). Coloração: técnica de La Cour (1941).	n=18	Burch & Natarajan, 1967
17	Helicinidae <i>Palaeohelicina sp.;</i> <i>Pleuropoma sp.</i>	A técnica não foi descrita	n=18	Burch (1967)
18	Partulidae <i>Partula turneri</i>	A técnica não foi descrita	n=29	Burch (1967)
19	Enidae <i>Ena andersoniana,</i> <i>Ena japônica</i>	A técnica não foi descrita	n=24	Burch (1967)
20	Clausiliidae <i>Megalophaedusa martensii;</i> <i>Phaedusa subaculus</i> <i>Euphaedusa tau;</i> <i>Euphaedusa pseudosheridani</i> <i>Hemiphaedusa similaris</i> <i>Stereophaedusa japônica</i>	A técnica não foi descrita	n=24 n=24 n=28 n=28 n=28 n=30	Burch (1967)
21	Lymnaeidae <i>Erinna newcombi</i> <i>E.aulacospira</i> <i>Pseudisidora producta</i>	A técnica não foi descrita	n=18 n=18 n=18	Burch & Patterson (1971)
22	Planorbidae <i>Bulinus tropicus,</i> <i>B. natalensis,</i> <i>B. truncatus,</i> <i>B. sericinus,</i> <i>B. hexaploidus,</i> <i>B. octoploidus</i>	A técnica não foi descrita	n=18 n=18 n=36 n=36 n=54 n=72	Wu, 1973
23	Chiliniidae <i>Chilina fluviatilis</i>	Tecido: ovotestis Fixador: Newcomer`s Coloração: técnica de La Cour (1941).	2n=36 n=18	Natarajan & Burch (1966)
24	Haplotrematidae	A técnica não foi descrita	n= 29-30	Natarajan, 1960
25	Panpulmonata Siphonariidae <i>Siphonaria japonica,</i> <i>S.guamensis</i> <i>S.laciniosa</i> <i>S.alternata</i> <i>S.pectinata</i>	Tecido: ovotestis Fixador: Newcomer`s Coloração: técnica de La Cour (1941).	2n=32 2n=32 2n=32 2n=32 2n=32	Natarajan & Burch, 1966
26	Ellobiidae <i>Cassidula vesperilionis</i> <i>Pythia scarabaens</i>	Tecido: ovotestis Fixador: Newcomer`s Coloração: técnica de La Cour (1941) Não houve descrição da técnica	2n=34 n=18	Natarajan & Burch (1966) Burch (1967)
27	<i>Melampus bidentatus lineatus,</i> <i>M. coffeus,</i> <i>M. ? coffeus</i>	Tecido: ovotestis Fixador: Newcomer`s Coloração: técnica de La Cour (1941)	2n=36 2n=38 2n=38	Natarajan & Burch (1966)

Legenda: NC – número cromossômico.

1.3.2 Resultados dos protocolos testados no presente estudo.

A partir dos testes dos protocolos, foi possível obter preparações que evidenciaram núcleos e células em prófase e metáfase. Nas lâminas obtidas a partir de todos os protocolos foi possível observar os núcleos e células em prófase, mas células em metáfase foram observadas com a realização do *protocolo base* e dos *protocolos VI, VII e VIII*.

Os melhores resultados para núcleos foram obtidos usando-se embriões em estágio inicial do desenvolvimento, entretanto, a colchicina não atuou bloqueando a divisão celular, dessa forma, não foram observados cromossomos. Nas preparações feitas a partir do intestino detectamos um volume pequeno de células nas lâminas e nenhuma metáfase.

A partir das análises das células em metáfase obtidas, foi possível construir o cariógrama da espécie *L. unilamellata*, que possui o número diploide de 56 cromossomos e o número haplóide de 28 cromossomos (Figuras 2 e 3).

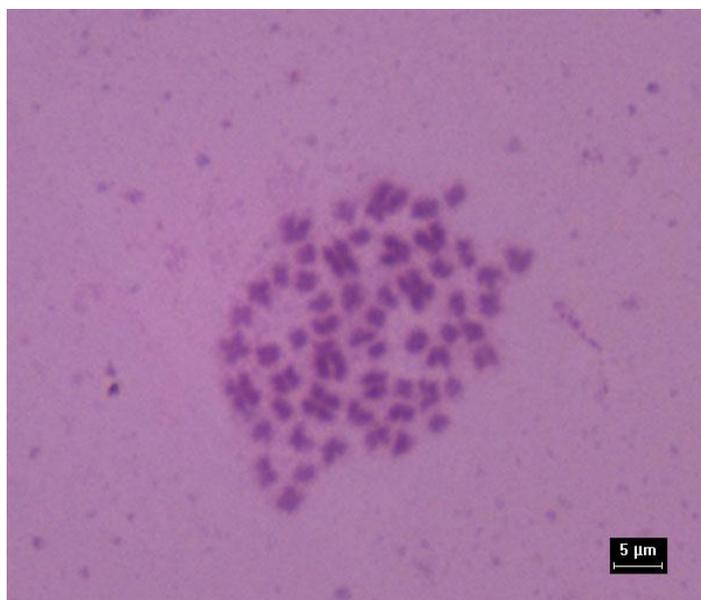


Figura 2. Preparação evidenciando célula em metáfase de *Leptinaria unilamellata* $2n=56$ cromossomos.

1.3.3 Resultado da técnica de Nitrato de Prata

A partir da técnica de coloração de Nitrato de Prata, podemos observar que no nucléolo temos duas marcações, ou seja, duas regiões ativas nos cromossomos. Porém, não sabemos em quais cromossomos essas regiões organizadoras de nucléolos (RONs) estão presentes e nem em qual posição, uma vez que não foi possível realizar essa técnica com metáfases.

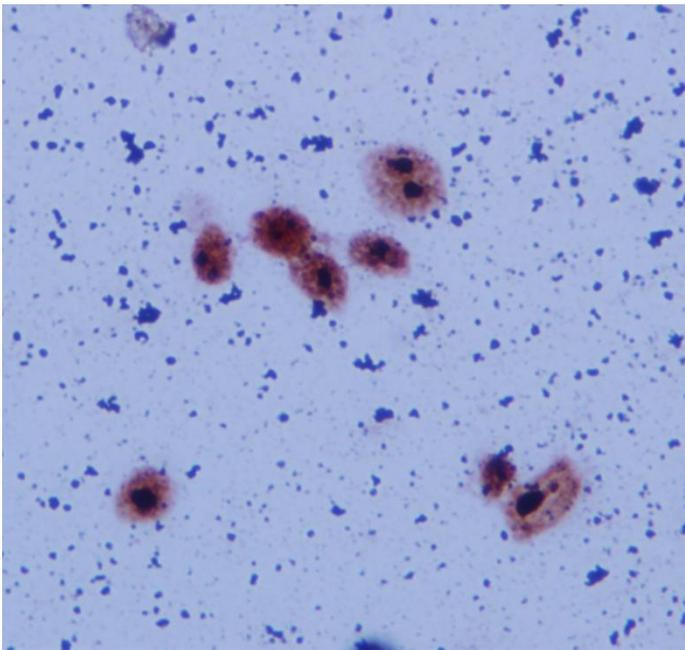


Figura 3 - Núcleos de *Leptinaria unilamellata* corados com Nitrato de Prata.

Morfometria cromossômica

As medidas cromossômicas realizadas revelaram que o cariótipo de *L. unilamellata* é constituído em maior parte por cromossomos metacêntricos e poucos submetacêntricos. Para a espécie em questão, encontramos $2n=56$ cromossomos, apresentando 44 cromossomos metacêntricos e 12 cromossomos submetacêntricos (pares 6, 7, 12, 13, 23 e 28). Fórmula $22m+6sm$.

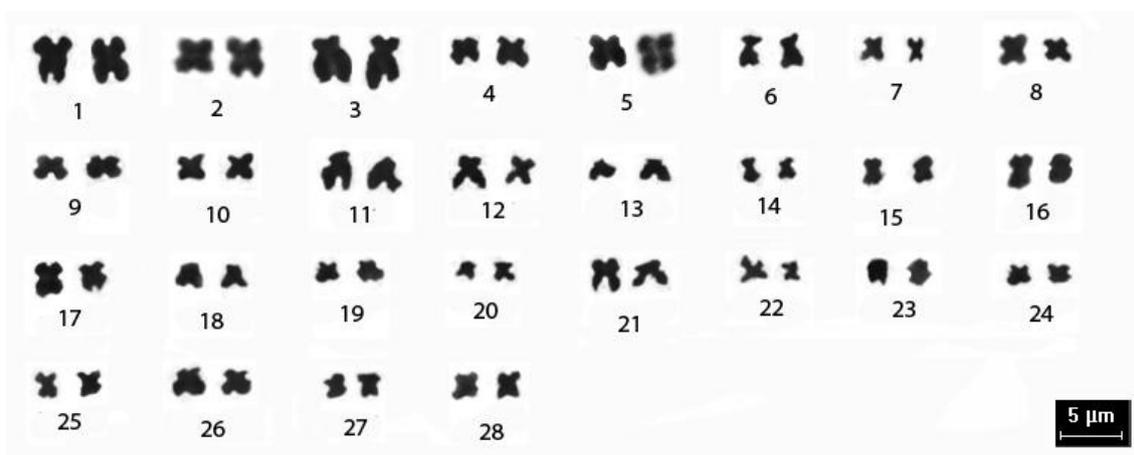


Figura 4 – Cariograma de *Leptinaria unilamellata*, $2n=56$ cromossomos.

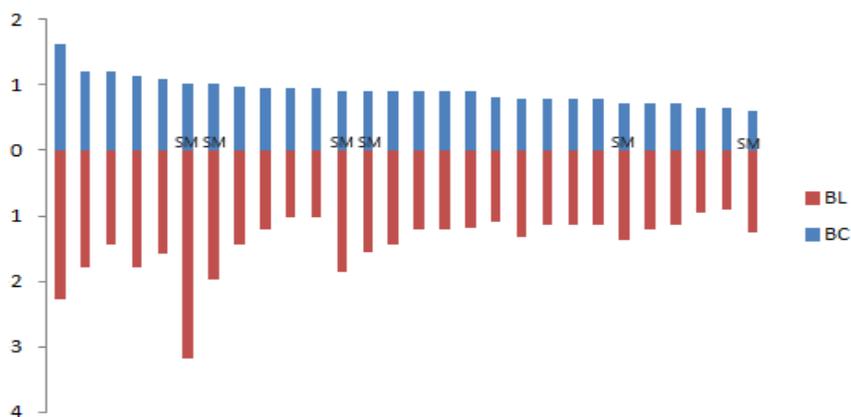


Figura 5. Idiograma representando os 28 pares de cromossomos de *Leptinaria unilamellata*.

Tabela IV - Dados morfométricos dos cromossomos de *Leptinaria unilamellata* (2x=56).

Cromos.	BC	BL	Total	Razão (bl/bc)	IC	Classificação
I	1,62	2,28	3,90	1,40	41,53	M
II	1,20	1,80	3	1,50	40	M
III	1,20	1,44	2,64	1,20	45,45	M
IV	1,14	1,80	2,94	1,57	38,77	M
V	1,08	1,57	2,65	1,45	40,75	M
VI	1,02	3,18	4,20	3,11	24,28	SM
VII	1,02	1,98	3	1,94	34	SM
VIII	0,97	1,44	2,41	1,48	40,24	M
IX	0,96	1,20	2,16	1,25	44,44	M
X	0,96	1,02	1,98	1,06	48,48	M
XI	0,96	1,02	1,98	1,06	48,48	M
XII	0,90	1,86	2,76	2,06	32,60	SM
XIII	0,90	1,56	2,46	1,73	36,58	SM
XIV	0,90	1,44	2,34	1,60	38,46	M
XV	0,90	1,20	2,10	1,33	42,85	M
XVI	0,90	1,20	2,10	1,33	42,85	M
XVII	0,90	1,10	2	1,32	43,06	M
XVIII	0,80	1,09	1,89	1,36	42,32	M
XIX	0,78	1,32	2,10	1,69	37,14	M
XX	0,78	1,15	1,93	1,47	40,41	M
XXI	0,78	1,14	1,92	1,46	40,62	M
XXII	0,78	1,14	1,92	1,46	40,62	M
XXIII	0,72	1,38	2,10	1,91	34,28	SM
XXIV	0,72	1,20	1,92	1,66	37,5	M
XXV	0,72	1,14	1,86	1,58	38,70	M
XXVI	0,66	0,96	1,62	1,45	40,74	M
XXVII	0,66	0,91	1,57	1,37	42,03	M
XXVIII	0,60	1,26	1,86	2,10	32,25	SM

BC= braço curto; BL= braço longo; IC= índice centromérico

Tabela V – Médias dos dados morfométricos relativos das quatro metáfases de *Leptinaria unilamellata*.

Cromos.	BC relativo	BL relativo	Tamanho relativo
I	1,93	2,60	4,53
II	1,72	2,71	4,43
III	1,40	2,02	3,42
IV	1,29	2,24	3,53
V	1,18	1,77	2,95
VI	1,09	1,88	2,97
VII	1,06	1,65	2,71
VIII	1,02	1,39	2,41
IX	0,98	1,44	2,42
X	0,97	1,28	2,25
XI	0,94	1,25	2,19
XII	0,92	1,35	2,27
XIII	0,91	1,39	2,3
XIV	0,89	1,36	2,25
XV	0,87	1,39	2,26
XVI	0,86	1,37	2,23
XVII	0,85	1,19	2,04
XVIII	0,80	1,16	1,96
XIX	0,78	1,33	2,11
XX	0,76	1,12	1,88
XXI	0,71	1,16	1,87
XXII	0,71	1,15	1,86
XXIII	0,68	1,15	1,83
XXIV	0,67	1,08	1,75
XXV	0,65	1,12	1,77
XXVI	0,60	0,99	1,59
XXVII	0,57	0,90	1,47
XXVIII	0,55	0,83	1,38

BC= braço curto; BL= braço longo

Utilizamos os dados morfométricos das quatro metáfases encontradas ao longo do estudo e fizemos a média desses dados, utilizando sempre valores relativos, uma vez que essas metáfases apresentam graus diferentes de condensação.

Tabela VI – Média do somatório de Assimetria cariotípica (A); média do grau de heterogeneidade cromossômica (A_i) das quatro metáfases de *L. unilamellata* ($2x=56$).

A	A_i
0,19	5,68

Com relação ao grau de assimetria (A), também fizemos uma média dos quatro graus de assimetria de cada metáfase e a média foi de $A=0,19$, de assimetria cariotípica, mostrando que todas as metafases são simétricas e 5,68 de heterogeneidade cromossômica.

Discussão

Com base nos resultados apresentados podemos observar que a maior parte dos estudos citogenéticos referentes ao Filo Mollusca têm como enfoque principal o estudo de gastrópodes marinhos e bivalves, devido a sua importância econômica. Para gastrópodes e bivalves marinhos, já foram descritos cariótipos para mais de 49 famílias, enquanto que para moluscos pulmonados temos um pouco mais de 14 famílias. Comparado a outros organismos as análises do cariótipo de moluscos são incipientes devido às dificuldades de obter preparações cromossômicas adequadas (BURCH, 1968). Além disso, muitos artigos encontrados não trazem informações detalhadas sobre as técnicas, o que dificulta ainda mais o avanço dos estudos citogenéticos.

As gônadas dos moluscos podem ser uma ótima fonte de cromossomos mitóticos e meióticos. Entretanto, em algumas espécies o ciclo celular pode ser lento, dificultando a obtenção de metáfases (BABRAKZAI *et al.*, 1976). Nesse caso, podem ser utilizados estimuladores, que aceleram a multiplicação celular *in vivo*, e com isso, o uso da colchicina é potencializado, obtendo-se metáfases de melhor qualidade e em maior número (WOZNICKI & JANKUN, 2004; SKUZA *et al.*, 2009).

Outra fonte de metáfases são os embriões, porém é importante saber em qual período do desenvolvimento embrionário o ciclo celular é mais ativo (BABRAKZAI *et al.*, 1975; 1976). A primeira técnica utilizando embriões de moluscos de água doce foi relatada por PATTERSON (1971).

A maior parte dos protocolos de citogenética utilizados para gastrópodes e bivalves marinhos utilizam fixadores como Newcomer's (1953) (que consiste em 6 partes de álcool isopropílico, 3 partes de ácido propiônico, 1 parte de éter de petróleo, uma parte de acetona, e uma parte de dioxano) ou Carnoy's (1887) (metanol : ácido acético, na proporção de 3:1). Poucos protocolos para moluscos pulmonados possuem descrição detalhada da técnica, a maioria apenas cita que o material foi fixado e preservado, não especificando os protocolos ou reagentes usados. Nos artigos em que há detalhamento da técnica, alguns citam a colchicina como bloqueador mitótico, os fixadores geralmente são Newcomer's (1953), Carnoy's (1887) ou metanol:ácido acético, na proporção de 3:1. O ácido acético é utilizado para a dissociação das células. O processo de coloração é realizado com os corantes orceína-acética (que consiste em 45% de ácido acético e 1% de orceína) (La Cour, 1941) e Giemsa 5%.

No presente estudo, foi possível estabelecer quatro protocolos para uma espécie de molusco pulmonado terrestre, através da adaptação de protocolos descritos na literatura. A dificuldade em se obter um grande número de metáfases parece indicar que *L. unilamellata* apresenta um ciclo celular lento. Entretanto, no presente estudo não foi possível encontrar uma substância que pudesse estimular a multiplicação celular sem matar o indivíduo. Mas, quando quebramos o ápice da concha de alguns moluscos e voltamos com eles para o terrário, deixando-os nessa condição por algumas horas, conseguimos um resultado satisfatório. Dessa forma, a colchicina foi aplicada diretamente no indivíduo vivo, para que as atividades celulares estivessem ativas a todo o momento e a colchicina pudesse atuar, bloqueando as metáfases. Esse protocolo foi adaptado do protocolo utilizado para peixes, baseado em BERTOLLO *et al.* (1978).

De acordo com BURCH & HEARD (1962) a maior parte das espécies de moluscos pulmonados estilomatóforos apresenta 20 ou mais pares de cromossomos. Geralmente, em moluscos pulmonados, os números cromossômicos variam de 5 pares (menor número cromossômico encontrado) no molusco terrestre *Catinella rotundata* (Gould, 1848) do Hawai à 60 pares no europeu *Ancylus fluviatilis* (Mull), mas 72 pares cromossômicos foram descritos para o planorbídeo *Bulinus octoploidus*, da Etiópia (BURCH, 1964). As espécies de Achatinoidea *Archachatina marginata* e *Achatina achatina* possuem o mesmo número diploide que *L. unilamellata*, $2n=56$.

As famílias Bulimulidae, Bradybaenidae, Achatinidae e Subulinidae apresentam números cromossômicos próximos, variando de $n=22$ à $n=31$ cromossomos. Para Bulimulidae, as espécies para as quais se tem informações apresentam de $n=29$ a $n=30$ cromossomos, para Bradybaenidae, de $n=28$ à $n=30$, Achatinidae de $n=22$ à $n=28$ e Subulinidae de $n=25$ a $n=31$ cromossomos (BURCH, 1968). Dentro da família de interesse, Subulinidae, apenas o cariótipo de duas espécies são descritos até o momento, *Subulina octona*, com $n=31$ cromossomos e *Lamellaxis mauritanus* com $n=25$ cromossomos BURCH (1968), porém não se tem registros da morfologia desses cromossomos.

Dentro da família Bradybaenidae, 11 espécies apresentam o mesmo número cromossômico que *L. unilamellata*, $2n=56$ cromossomos. E dentre essas, duas espécies *Euhadra dixonii* e *E. amaliae*, possuem apenas cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, assim como *L. unilamellata* (BURCH, 1969; TATEWAKI & KITADA, 1987).

Com base nos resultados obtidos com a coloração de prata, encontramos duas marcações nos nucléolos, o que evidencia as regiões ativas no DNA (Ag-NORs). Porém, como não foi possível realizar essa técnica em metáfases, não podemos dizer em quais cromossomos e nem a região dos cromossomos em que estão localizadas essas marcações, permitindo afirmar apenas que existem dois cromossomos com regiões ativas. Cromossomos Ag-NORs podem servir como caracteres para inferir relações filogenéticas (AMEMIYA & GOLD, 1990) e trabalhos posteriores tentarão preencher essa lacuna.

Em gastrópodes, a maioria das espécies apresentam duas NORs, enquanto que em *Nucella lapillus* (PASCOE *et al.*, 1996) e em *Fasciolaria lignaria* (VITTURI *et al.*, 2000a) observou-se um número máximo de quatro e oito NORs, respectivamente. Já em bivalves foram encontrados de dois a seis cromossomos NORs (THIRIOT-QUIÈVREUX, 2002). De acordo com vários autores, um único par de NORs por célula é um caráter primitivo (plesiomórfico) na maioria dos vertebrados (SCHMID, 1978) e invertebrados, incluindo moluscos (PASCOE *et al.*, 1996; THIRIOT - QUIÈVREUX, 2002). Segundo VITTURI *et al.*, 2005, dez cromossomos portadores de NORs foram encontrados em *Cantareus aspersus* e *Cantareus mazzullii*. Um valor semelhante nunca antes observado nos moluscos. Um aumento no número de NORs poderia ter ocorrido em um ancestral comum das duas espécies *Cantareus*. Para o mecanismo gerador de uma mudança numérica, a literatura sugere diferentes possibilidades, incluindo translocação de cistrons ribossomais por crossing-over. Em outras espécies com vários NORs (VITTURI *et al.*, 1996), tanto em *C. aspersus* e *C. mazzullii*, a posição terminal do cromossomo 18S DNAr sugere a possibilidade de envolvimento de seqüências teloméricas favorecendo esses rearranjos de RONS.

A análise do número cromossômico nas diferentes famílias para as quais se tem informações disponíveis evidencia que o número cromossômico em Stylommatophora é muito conservado, como assinalado por BURCH & PATTERSON (1965). Dessa forma, a análise morfológica dos cromossomos, assim como a utilização de outras técnicas citogenéticas é essencial para que essa abordagem possa ser utilizada como ferramenta para a taxonomia e inferências evolutivas desse grupo.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, M.N. & BESSA, E.C.A. Estudo do crescimento e da reprodução de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny) (Mollusca, Subulinidae) em laboratório. Revista Brasileira de Zoologia, v.18, pp.1107-1113. 2001.

AMEMIYA, C.T. & GOLD, J.R. Cytogenetic studies in North American minnows (Cyprinidae). XVII. Chromosomal NOR phenotypes of the 12 species, with comments on cytosystematic relationship among 50 species. Hereditas, v.112, pp.231-247. 1990.

ARAÚJO, J.L.B. 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 Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil. 1982.

AWODIRAN, M.O.; AWOPETU, J.I. E AKINTOYE, M.A. Cytogenetic study of four species of land snails of the family Achatinidae in South-Western Nigeria. Ife Journal of Science, v.14, nº 2. 2012.

BABRAKZAI N. & MILLER, W.B. A colchicine hypotonic squash technique for chromosome spreads of pulmonate land snails. Malacological Review, v. 7, pp. 37-38. 1974.

BABRAKZAI, N.; MILLER, W.B. Chromosome number of *Praticolella berlandieriana* (Moricand, 1833). Journal of the Arizona Academy of Science, v. 10, n. 3, pp. 126-127. 1975.

BABRAKZAI, N. & MILLER W.B. Karyotypic comparison between *Helminthoglyptidae* and *Bradybaenidae* (Gastropoda:Pulmonata). Bulletin of The American Malacological Society, pp.72.1975.

BABRAKZAI, N.; MILLER, W.B.; SAMSAM, N.S. Procedures and methods in molluscan cytology and cytogenetics. Bulletin of the American Malacological Union Inc, pp.57-62.1976. 1982.

BABRAKZAI, N.; MILLER, W.B. & WARD, O.G.Cytotaxonomy of some Arizona Oreohelicidae (Gastropoda: Pulmonata).Bulletin of the Americam Malacological Union, Inc.1974.

BABRAKZAI, N.; SAMSAM, S. & MILLER, W.B. Chromosomal aberrations in Southwestern pulmonate gastropods. Journal of the Arizona Academy of Science Suppl., v.1, pp.30.1975.

BABRAKZAI, N.; WARD, O.G.; MILLER, W.B. The introduction of Giemsa and centromeric banding techniques of chromosomes to molluscan cytotaxonomy. Bulletin of the American Malacological Union Inc, p.67.1975.

BACKELJAU, T., BAUR, A.; BAUR, B.Population and conservation genetics.The biology of terrestrial molluscs. CABI Publishing, pp. 383-412.2001.

BARKER, G.M.Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. In: BARKER, G.M. (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. CAB International, pp.552. 2001.

BERTOLLO, L.A.C.; TAKAHASHI, C.S. & MOREIRA-FILHO, O. Cytotaxonomic considerations on *Hoplais lacerdae* (PYSSES, ERYTHRINIDAE). Revista Brasileira de Genética, v.1, pp.103-120.1978.

BESSA, E.C. de A.; ARAÚJO, J.L. de B. Ocorrência de autofecundação em *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) sob condições de laboratório. Revista brasileira de Zoologia, v.12, n.3, pp. 719-723. 1995.

BURCH, J.B. Chromosomes of the succineid snail *Catinella rotundata*. Occasional Paper of the Museum of Zoology, University of Michigan, vol. 638, pp. 1-8. 1964.

BURCH, J.B. Chromosome number and systematics in Euthyneuran snails. Proc. 1st Eur. Malacological. Cong., pp. 215-241.1964.

BURCH, J. B. Cytological relationships of some Pacific gastropods. Venus, v. 25, pp. 118-135.1967.

BURCH, J.B. Cytotaxonomy of some Japanese *Semisulcospira* (Streptoneura: Pleuroceridea). Journal of Conchology v.107, pp.3-52. 1968.

BURCH, J.B. Cytological studies of Pacific land snails. In: Proc. Symposium on Molluscs, Cochin, India, v.5 pp.616-625.1969.

BURCH, J.B.; HEARD, W.H. Chromosome number of two species of *Vallonia* (Mollusca: Stylomatophora). Acta Biologica Academy of Science. Hungaricae, v. 12, pp.205-212.1962.

BURCH, J.B.; NATARAJAN, R. Chromosome of Some Opisthobranchiate Mollusks from Eniwetok Atoll, Western Pacific. *Pacific Science*, v.21, n° 2, pp.252-259. 1967.

BURCH, J.B.; PATTERSON, C.M. A Land Snail for Demonstrating Mitosis and Meiosis. *The American Biology Teacher*, v.27, n°3, pp. 203-207.1965.

BURCH, J.B.; PATTERSON, C.M.; NATARAJAN, R. Chromosomes of four species of North American *Succineidae*. *Venus, Japanese Journal of Malacology*, v. 24, n°4 (In press.).1966.

CAMERON, R.A.D.Functional aspects of shell geometry in some british land snails. *Biological Journal of the Linnean Society* 16, 157-167. 1981.

CARNOY, J. B. Les globules polaires de l'*Ascaris clavata*. *La Cellule*, v.3, pp. 276. 1887.

CARVALHO, C.M.; SILVA, J.P.; MENDONÇA., C.L.F.; BESSA, E.C.A. & D'ÁVILA, S.Life history strategy of *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata, Subulinidae). *Invertebrate Reproduction and development* v.53, pp.211-222. 2009.

CHIBA, S.Appearance of morphological novelty in a hybrid zone between two species of land snail. *Evolution*, v.59, pp.1712-1720. 2005.

CHIBA, S. & DAVISON, A.Shell shape and habitat use in the North-west Pacific land snail *Mandarina polita*, from Hhajima, Ogasawara: current adaptation or ghost of species past? *Biological Journal of the Linnean Society*, v.91, pp.149-159.2007.

CHOH, M.S.; YAP, C.K.; TAN, S.G.; JAMBARI, H.A. Morphological and allozyme studies of small terrestrial snails (*Opeas* sp., *Subulina* sp. and *Huttonella bicolor*) collected from Peninsular Malaysia. *Russian Journal of Genetics* 42, 40-48.2006.

COLOMBA, M.S.; VITTURI, R.; CASTRIOTA, L.; BERTONI, R. & LIBERTINI, A. FISH mapping of 18S-28S and 5S ribosomal DNA, (GATA)_n and (TTAGGG)_n telomeric repeats in the periwinkle *Melarhaphe neritoides* (Prosobranchia, Gastropoda, Caenogastropoda). *Heredity*, v. 88, pp.381–384.2002.

COLOMBA, M.; VITTURI, R.; RAMPIN, M.; LANNINO, A.; TARAVELLA, A. & DAVIS, G.M., CHEN, C.E. & YU, S.H. Unique morphological innovation and population variation in *Gammatricula songi*, a new species of Triculinae from China (Gastropoda: Rissoacea). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 145: 107–145.1994.

DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, v.85, n° 3, pp.407-415. 2005.

DELICADO, D & RAMOS, M.A.. Morphological and molecular evidence for cryptic species of springsnails [genus *Pseudamnicola* (Corrosella)(Mollusca, Caenogastropoda, Hydrobiidae)] *ZooKeys*, v.190, pp. 55–79.2012.

FIorentino, V.; MANGANELLI, G. & GIUSTI, F. 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, pp.359–370.2008.

GÓMEZ, B.J. Structure and functioning of the reproductive system. In: BARKER, G.M. (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. CAB International, pp.552. 2001.

GOODFRIEND, G.A. Variation in land-snail shell form and size and its causes: a review. Systematic Zoology, v.35, pp. 204–223.1986.

HAAHAUGE, P. & KRISTENSEN, T.K.A comparison of *Bulinus africanus* group species (Planorbidae: Gastropoda) by use of the internal transcriber spacer 1 region combined by morphological and anatomical characters. Acta Tropica,v.75, pp.85-94. 2000.

HEALY, J.M. Spermatogenesis and oogenesis. In: BARKER, G.M. (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. CAB International, pp. 552. 2001.

HELLER, J.Life history strategies. In: BARKER, G.M. (Ed.). The biology of terrestrial molluscs. CAB International, pp.552. 2001.

HOWELL, W.H. & BLACK, D.A.Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method.Experientia, pp.36-1014.1980.

HUANG, X.; HU, J.; HU, X.; ZHANG, C.; ZHANG, L.; WANG, S.;LU, W.; BAO, Z. Cytogenetic characterization of the bay scallop, *Argopecten irradians irradians*, by multiple staining techniques and fluorescence *in situ* hybridization. Genes Genetic System, v. 82, pp. 257-263.2007.

INABA, A. Cytological studies in molluscs. III. A chromosome survey in the opisthobranchiate Gastropoda. *Annot. Zool. Japan*, v. 32, n°2, pp.81-88.1959.

INABA, A. Chromosomes of some opisthobranchs. (In Japanese) *Dobutsugaku Zasshi* v.70, n° 24.1961.

INABA, A. and HIROTA, R. A chromosome survey in ten species of nudibranchis (Gastropoda, Mollusca). *Japanese Journal Zoology*, v. 2, n°12, pp.157-162.1958.

JORDAENS, K.; BRUYNDONCX, L.; GOETHEN, J.V. & BACKEULJAU, T. Morphological an anatomical differentiation of three land snails of the genus *Rhynchothrochus* (Gastropoda: Pulmonata: Camaenidae). *Journal of Molluscan Studies*, v.75, pp.1-8. 2009.

LA COUR, L. Acetic-orcein: A new stain-fixative for chromosomes. *Stain Techn.* v.16, pp.169-174.1941.

LEITÃO, A.; CHAVES, R.; SANTOS, S.; BOUDRY, P.; GUEDES-PINTO, H. & THIRIOT-QUIÉVREUX, C. Cytogenetic study of *Ostrea conchaphila* (Mollusca: Bivalvia) and comparative karyological analysis within Ostreinae. *Journal of Shellfish Research*, v. 21, n° 2, pp. 685-690. 2002.

LEITÃO, A.; CHAVES, R.; MATIAS, D.; JOAQUIM, S.; RUANO, F. & GUEDES-PINTO, H. Restriction enzyme digestion chromosome banding on two commercially important venerid bivalve species: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma edule*. *Journal of Shellfish Research*, v.25, n. 3, pp. 857-863. 2006.

LEVAN, A.; FREDGA, A.; SANDERBERG, A.A. Nomenclature for centromeric position in chromosomes. *Hereditas*, v.3, n°52, pp.201-220.1964.

LIBERTINI, A. Comparative Cytogenetic Analysis of Three Stylommatophoran Slugs (Mollusca, Pulmonata). *Malacologia*, v.51, pp.173-179.2009.

LIBERTINI, A.; VITTURI, R.; GREGORINE, A. & COLOMBA, M. Karyotypes, banding patterns and nuclear DNA content in *Credipula umguiformis* (LAMARCK, 1822) and *Naticarius stercusmuscarum* (GMELIN, 1791) (MOLLUSCA, CAENOGASTROPODA). *Malacologia*, v.51, n°1, pp.111-118.2009.

MANCINO, G. & SORDI, M. II Corredo cromosomico di alcuni Opisthobranchi Sacoglossi del mar Tirreno. *Ibid*, v.71, pp.12.1964.

MEDEIROS, C.; DANIEL, P.A.; SANTOS, E.O.; FERREIRA, P.B.; CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.F.; CARVALHO, O.S. & D'ÁVILA, S. Macro- and microscopic morphology of the reproductive system of *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata, Subulinidae). *Journal of Natural History*, v.47, n°37, pp. 2385-2407. 2013.

NAGGS, F. The reproductive anatomy of *Paropeas achatinaceum* and a new concept of *Paropeas* (Pulmonata: Achatinoidea: Subulinidae). *Journal of Molluscan Studies*, V.60, pp. 175-191. 1994.

NATARAJAN, R. Further cytological studies in *Pulmonata* (Mollusca: Gastropoda). *Ibid*, v.1, n° 12, pp.69-79.1960.

NATARAJAN, R.; BURCH, J. B. Chromosomes of Some *Archaeopulmonata* (Mollusca: Basommatophora). *Cytologia*, v.31, n.2, pp.109-116.1966.

NATARAJAN, R.; HUBRICHT, L. and BURCH, J. B. Chromosome of eight species of *Succineidae* (Gastropoda, Stylommatophora) from the Southern United States. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, v.1, n°17, pp.105-120.1966.

NEWCOMER, E.H. A new cytological and hystological fixing fluid. *Science*, pp.118-161.1953.

PADIAL, J.M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, J. & Vences, M. The Integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, v.7, pp.16. 2010.

PARK, G.; KIM JAE-JIN; CHUNG, P.; WANG, Y. and MIN DUK-YOUNG. Karyotypes on three Species of Chinese mesogastropod snails, *Semisulcospira libertine*, *S. dolichostoma* and *Viviparus rivularis*. *The Korean Journal of Parasitology*, v.1, n° 37, pp.5-11.1999.

PASCOE, P.L.; PATTON, S.J.; CRITCHER, R.; DIXON, D.R. Robertsonian polymorphism in the marine gastropod *Nucella lapillus*: advances in karyology using rDNA loci and NORs. *Chromosoma*, v.104, pp. 455-460.1996.

PATTERSON, C.M. Chromosome of moluscs. *Proc. Symp. Moll., II, Mar. Biol. Assoc. India*, pp.635-686.1969.

PATTERSON, C.M.A karyotype technique using freshwater snail embryos. *Malacological Review*, v.1, n°4, p. 27.1971.

PEREZ, K.E. A new species of *Praticolella* (Gastropoda: Polygyridae) from northeastern Mexico and revision of several species of this genus. *The Nautilus*, v.125, n°3, pp.113–126.2011.

PETKEVICIUTE, R.; STUNZENAS, V. AND STANEVICIUTE, G. Polymorphism of the *Sphaerium corneum* (Bivalvia, Veneroida, Sphaeriidae) revealed by cytogenetic and sequence comparison. *Biological Journal of the Linnean Society*, v.89 , pp. 53–64. 2005.

PETRACCIOLI A., GUARINO, FM, MAIO, N., ODIERNA, G. Molecular cytogenetic study of three common Mediterranean limpets, *Patella caerulea*, *P. rustica* and *P. ulyssiponensis* (Archaeogastropoda, Mollusca). *Genetica*, v.2, n° 138, pp.219-25.2010.

PETROVIC, V.; PÉREZ-GARCÍA, C.; PASANTES, J.J.; SATOVIC, E.; PRATS, E.; PLOHL, M. A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: a dominance of GC-rich heterochromatin. *Cytogenet Genome Res.*, v.124, pp.63–71.2008.

PIRES, A.C. & MARINONI, L. Barcoding and traditional taxonomy unified through integrative taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotropica*, v.10, n°2, pp. 339-346. 2010.

POONAM; TRIPATHI, N.K; KOUR, P. & JANGRAL, S. Chromosomal studies in Pouch snail, *Physa acuta* (Gastropoda: Pulmonata: Physidae) from Jammu e Kashmir (Western Himalayas), India. International Journal of Recent Scientific Research, v. 4, pp.1551-1553. 2013.

PRÉVOT, V.; JORDAENS, K.; SONET, G.; BACKELJAU, T.. Exploring Species Level Taxonomy and Species Delimitation Methods in the Facultatively Self-Fertilizing Land Snail Genus *Rumina* (Gastropoda: Pulmonata). Plos One, v.8.2013.

REEDER, R.L. & MILLER, W.B. Karyotypes studies in a *Ashmunella* (Pulmonata: Polygyridae) . Bulletin of the American Malacological Union, Inc.1975.

SCHILEYKO, A.A. The system of the order Geophila (= Helicida) (Gastropoda: Pulmonata). Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences. USSR, v.80, pp.44-69.1997.

SCHILICK-STEINER, B.C.; STEINER, F.M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E. & CROZIER, R.H. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. Annual Review of Entomology, v.55, pp.421-438. 2010.

SCHIMID, M. Chromosome banding in Amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. Chromosoma, v.66, pp.361–388. 1978.

SCHILTHUIZEN, M. Sexual selection on land snail shell ornamentation: a hypothesis that may explain shell diversity. BMC Evolutionary Biology, v.3, pp.13.2003.

SIMONE, L.R.L. Land and Freshwater Molluscs of Brazil: São Paulo. 2006.

SKUZA, L.; LABECKA, A. M.; DOMAGALA, J. Cytogenetic and Morphological Characterization of *Corbicula fluminalis* (O. F. Muller, 1774) (Bivalvia: Veneroida: Corbiculidae): Taxonomia Status Assessment of a Freshwater Clam. *Folia biologica* (Kraków), v.57, pp. 3-4. 2009.

SOLEM, A. A world model of land snail diversity and abundance. *World-wide Snails, Biogeographical studies on non-marine Mollusca*. Brill & Backhuys, Leiden, pp.6-22.1984.

SPENCER, H.G.; MARSHALL, B.A. & WATERS, J.M. Systematics and phylogeny of a new cryptic species of *Diloma Philippi* (Mollusca: Gastropoda: Trochidae) from a novel habitat, the bull kelp holdfast communities of southern New Zealand. *Invertebrate Systematics*, v. 23, pp.19–25.2009.

SUMNER, A.T. Chromosome banding. Unwin Hyman Ltd, London.1990.

TATEWAKI, R.; KITADA, J. Karyological studies of five species of land snails (Helicoidea: Mollusca). *Genetica*, v.74, n.1, pp. 73-80, 1987.

THIRIOT-QUIÈVREUX, C. Advances in cytogenetics of aquatic organisms. In: *Genetics and Evolution of Aquatic Organism*, pp.369-388.1994.

THIRIOT-QUIÉVREUX, C. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. *Cahiers Biologie Marine*, v. 43, pp. 17–26. 2002.

THIRIOT-QUIÉVREUX, C. Advances in chromosomal studies of gastropod molluscs. *Journal of Molluscan Studies*, v. 69, pp. 187–201. 2003.

THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; AYRAUD, N. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastropodes marins. *Marine Biology*, v. 70, pp. 165–172. 1982.

TRYON, G.W. & PILSBRY, H.A. *Manual of conchology* Vol. XVIII. Achatinidae, Stenogyrinae and Coelioxinae. Conchology Dept. Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 1906.

VINOGRADOV, A. E. Larger genomes for molluscan land pioneers. *Genome*, v. 43, pp. 211–212. 2000.

VITTURI, R.; COLOMBA, M.S.; GIANGUZZA, P.; PIRRONE, A.M. Chromosomal location of ribosomal DNA (rDNA), (GATA)_n and (TTAGGG)_n telomeric repeats in the neogastropod *Fasciolaria lignaria* (Mollusca: Prosobranchia). *Genetica*, v. 108, pp. 253–257. 2000a.

VITTURI, R.; GIANGUZZA, P.; COLOMBA, M.S.; JENSEN, K.R.; RIGGIO, S. Cytogenetics in the sacoglossan *Oxynoe olivacea* (Mollusca: Opisthobranchia): Karyotype, chromosome banding and fluorescent in situ hybridization. *Marine Biology*, v. 137, pp. 577–582. 2000.

VITTURI, R.; LIBERTINI, A.; SINEO, L.; SPARACIO, I.; LANNINO, A.; GREGORINI, A.; COLOMBA, M. Cytogenetics of the land snails *Cantareus aspersus* and *C. mazzullii* (Molusca:Gastropoda:Pulmonata).*Micron*, v.36, pp. 351-357.2005.

WADE, C.M.; HUDELLOT, C.; DAVISON, A.; NAGGS, F. & MORDAN, P.B. Molecular phylogeny of the helicoid land snails (Pulmonata: Stylommatophora: Helicoidea), with special emphasis on the Camaenidae. *Journal of Molluscan Studies*, v.73, pp. 411-415.2007.

WATANABE, K.; YAHARA, T.; DENDA, T.; KONSUGE, K. Chromosomal Evolution in the genus *Brachyscome* (Asteraceae, Astereae) Statistical tests regarding correlation between changes in karyotype and habit using phylogenetic information. *Journal of Plant Research*, v.112, n° 2, pp. 145-161.1999.

WILLAN, R.C.; KÖHLER, F.; KESSNER, V.; BRABY, M.F. Description of four new species of limestone-associated *Torresitrachia* land snails (Mollusca: Pulmonata: Camaenidae) from the Katherine District of the Northern Territory, with comments on their conservation. *The Beagle, Records of the Museums and Art Galleries of the Northern Territory*, v.25, pp.85-98.2009.

WILKE T., PFENNINGER M., DAVIS G.M. Anatomical variation in cryptic mudsnail species: Statistical discrimination and evolutionary significance. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, v.152, pp.45-66. 2002.

WOZNICKI, P.; JANKUN, M. Chromosome Study of *Anodonta anatine* (L., 1758) (Bivalvia: Unionidae). *Folia biologica* (Kraków), v.52, pp.3-4. 2004.

WU, SHI-KUEI. Cross-breeding Experiments with the African snail Genus *Bulinus* (Gastropoda:Planorbidae). *Malacological Review*, v.6, pp.203.1973.