

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
MESTRADO EM COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL**

**Tércia Vargas dos Santos**

**VARIABILIDADE CONQUILIOLOGICA, ANATÔMICA E MOLECULAR EM  
*Subulina octona* (BRUGÜIÈRE, 1789) (MOLLUSCA, GASTROPODA,  
SUBULINIDAE)**

**Juiz de Fora  
2012**

**Tércia Vargas dos Santos**

**VARIABILIDADE CONQUILIOLOGICA, ANATÔMICA E MOLECULAR EM  
*Subulina octona* (BRUGÜIÈRE, 1789) (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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sthefane D'ávila de Oliveira e Paula

Juiz de Fora

2012

Santos, Tércia Vargas dos.

Variabilidade conchiliológica, anatômica e molecular em *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Mollusca, Gastropoda, Subulinidae) / Tércia Vargas dos Santos. – 2012.

117 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.


1. Comportamento Animal. 2. Malacologia. I. Título.

VARIABILIDADE CONQUILÍOLÓGICA, ANATÔMICA E MOLECULAR EM  
*Subulina octona* (Brugüière, 1789) (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.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Stefane D'Ávila (Orientadora)

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Nisaka Solferini

Universidade Estadual de Campinas



Dr<sup>ª</sup>. Liana Konovaloff Jannotti-Passos

Centro de Pesquisas René Rachou, FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

À lógica matemática do universo que chamamos Deus, pela oportunidade da reencarnação.

À orientadora Sthefane pela oportunidade de desenvolver meu trabalho na iniciação científica e mestrado. Agradeço pela amizade e carinho nas horas difíceis e por ter paciência com minha ansiedade. Agradeço principalmente pela liberdade, confiança e imenso incentivo no desenvolvimento das atividades, que certamente fizeram a diferença em minha jovem carreira como pesquisadora.

Ao Museu de Malacologia da UFJF, nas pessoas da Profa. Elisabeth Bessa e Maria Alice Allemand, pelos anos de estágio e aprendizado e principalmente pela amizade de sempre.

À Profa. Vera Solferini, da Universidade Estadual de Campinas, por acreditar e confiar no meu trabalho e por abrir-me as portas a novas oportunidades.

Ao Márcio José da Silva, da Universidade Estadual de Campinas, por viabilizar o desenvolvimento de parte das análises genéticas.

À Profa. Juliane Lopes, do Departamento de Zoologia da UFJF, pela amizade e pelas conversas estatísticas regadas a cafezinhos.

Aos professores Roberto Júnio Pedroso Dias e Saulo Marçal da UFJF, que contribuíram com ótimas sugestões na banca de qualificação.

Ao Prof. Ricardo Zaidam, do Departamento de Geografia da UFJF, e sua orientada Marcele Gualtiere pela elaboração do mapa de pontos de coleta.

A todos os amigos da “Malaco” pela amizade. À Flávia, pelos primeiros passos na pesquisa. À amiga Lidiane, pela amizade e parceria, pelas inúmeras discussões científicas, pelos cafezinhos, cervejinhas, artesanatos... À Camilla pela ajuda inicial com as estatísticas (ufa!). À Evelyn e à Fabíola pela alegria. À Bruna pela importante parceria desde o cursinho. À Cida pela dedicação. À Liliane, Lorraine, Paula, Ana Carolina e outros tantos que já passaram pelo Museu e de alguma forma contribuíram com este trabalho.

A todos os amigos do laboratório da Profa. Vera Solferini pela incrível receptividade. Agradeço em especial à Célia, pelo exemplo de pessoa, à Mônica e Juliana pela disponibilidade desde que eu não sabia engatinhar até esses primeiros passos (ainda virão muitos outros) e ao Rafael por me aturar pedindo tanto favor. A todos os outros amigos pelo carinho e atenção.

Aos antigos e novos amigos de Campinas. À Luiza Godoy, Acqua e Gaia, por me receberem alegremente. Ao pessoal da república pela hospedagem e bons momentos no café filosófico: Alan, Bia, Marlon, Brunão, Adriana, Chicão e todos os demais.

Aos amigos de caminhada na graduação e mestrado pela torcida, em especial ao amigo José Hugo, pela parceria em todos os momentos. Agradeço aos companheiros do Diretório Acadêmico de Ciências Biológicas e do DCE-UFJF, em especial ao André Luiz (Mazinho), Neima, Juliana Mainenti e Fabíola pelos bons momentos. À amizade da Laila, Bianca, Tatá, Flávia, Edmo e John.

Agradeço à minha mãe por tentar entender meus propósitos de vida, por todo o esforço e por acreditar que sempre fez o melhor que podia. Ao meu irmão pela constante torcida e apoio. Ao meu pai pela amizade.

Às amigas de longa data, Patrícia (Broa), Val e aos amigos do espiritismo por entenderem a distância e continuarem na torcida. Às dezenas de amigos de repúblicas pela companhia e amizade, em especial à Rafaela, à Gabriela, à Marina e ao gato Grande.

Ao meu namorado e amigo Flávio, pelo companheirismo e carinho. Por ter entendido minha filosofia de vida e por estar embarcando junto na próxima etapa da viagem.

Aos amigos de caronas que tornaram possíveis tantas idas e vindas: Guilherme, Flavinho, Lucila e todos os anônimos.

Aos professores que fizeram diferença: Maria Inêz Xavier de Oliveira (Inezinha – Ginásio – Leopoldina), Aparecida Amadeu (CNEC – Leopoldina) e Francisco Borges (Chico – CEFET – Rio Pomba). Agradeço pelo incentivo, exemplo e amizade.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, na pessoa do Coordenador Prof. Roberto da Gama Alves, pelo apoio e viabilização do trabalho. Agradeço pelo apoio às viagens aos Congressos e a Campinas. Agradeço também aos secretários Rita e Osmar pela disponibilidade sempre.

À FAPEMIG pela bolsa concedida.

*Yes, there were times, I'm sure you knew  
When I bit off more than I could chew...  
And may I say, not in a shy way  
Oh, no, no not me  
I did it my way...  
The record shows I took the blows  
And did it my way*

***Elvis Presley – May Way***

## RESUMO

O conhecimento atual da diversidade de moluscos terrestres não leva em consideração a variabilidade intra e interespecífica, principalmente no que diz respeito a espécies de clima tropical, como é o caso de *Subulina octona*. A associação entre análises morfométricas e moleculares, ambas inéditas para estudos em *S. octona*, tem permitido a identificação de táxons e a compreensão de suas relações. No presente estudo, foi observada variabilidade na concha, no sistema reprodutor, na coloração corporal e na estrutura molecular com base na COI do DNA mitocondrial de populações de *S. octona*. A análise morfométrica ao longo do desenvolvimento demonstrou que a variabilidade intrapopulacional diminuiu ao longo do desenvolvimento dos moluscos e foi maior nas populações com dois fenótipos de coloração corporal. O componente que melhor explicou a variabilidade na maior parte da vida foi o comprimento da concha, seguido pela largura da abertura. Como a distância geográfica não explicou a variação na forma da concha, acredita-se que possa estar havendo um considerável fluxo gênico por ação antrópica e que a seleção esteja atuando modelando os padrões morfométricos na espécie. O fato de os padrões de crescimento e a forma final da concha na idade adulta terem variado entre populações mesmo em condições idênticas de criação, demonstra o importante papel da determinação genética. A anatomia do sistema reprodutor foi semelhante entre populações, mas a morfometria foi variável entre indivíduos e entre populações. Dentro das populações a porção masculina do sistema reprodutor foi mais variável que a feminina, conforme esperado para estruturas que sofrem seleção sexual. Já entre populações, a maior diferença foi observada na porção feminina. O sistema reprodutor foi mais variável que a concha, porém apresentando compatibilidade entre as populações quanto à forma das estruturas. A diferenciação morfométrica e fenotípica para coloração corporal não foram corroboradas pela variação molecular uma vez que indivíduos com mesmo haplótipo COI foram variáveis para concha e cor da massa cefalopodal. O modelo de evolução neutra das sequências foi aceito para as amostras analisadas apesar de nem todas as mutações serem silenciosas, destacando o papel da deriva na evolução da espécie. A baixa variabilidade de algumas populações pode ser reflexo da forte endogamia, devido à baixa capacidade de dispersão e capacidade de autofecundação da espécie, a despeito do fluxo gênico via dispersão passiva por ação antrópica. Foi observada estruturação genética para uma das populações, por apresentar um haplótipo exclusivo e formação de uma linhagem diferenciada no dendrograma de Máxima Verossimilhança. As diferentes linhagens



apresentaram diferenças morfométricas para estruturas reprodutivas que evidenciam a evolução independente das linhagens. Tais observações devem ser investigadas com mais detalhes a fim de confirmar a existência de espécies crípticas. A análise da diversidade encontrada no presente estudo forneceu ainda subsídios para pesquisas posteriores que visem esclarecer sobre a origem de *S. octona*.

Palavras-chave: Molusco terrestre. Morfometria. Análises multivariadas. Citocromo Oxidase. DNA mitocondrial.

## ABSTRACT

Current knowledge of the diversity of terrestrial molluscs does not take into account the intra- and interspecific variability, particularly with regard to species from tropical climates, as is the case of *Subulina octona*. The association between morphometric and molecular analysis, which remain unpublished for studies in *S. octona*, has allowed the identification of taxa and understanding of their relationships. In the present study, we observed variability in the shell, reproductive system, body color and molecular structure based on COI of mitochondrial DNA between populations of *S. octona*. Morphometric analysis along development showed that within-population variability decreased during the development of molluscs and was higher in populations with two body color phenotypes. The best component to explain the variability in most of lifetime was the shell length, followed by the opening width. Because the geographic distance does not explain the variation in shell shape, we believe that there may be considerable gene flow favored by human activities and that the selection may be shaping the morphometric patterns in this species. The interpopulation variation in growth patterns and shell shape in adulthood, even under identical rearing conditions, shows the important role of genetic determination. The anatomy of reproductive system was similar between populations, but the morphology was variable between individuals and populations. Within populations, the male portion of the reproductive system was more variable than the female portion, as expected for structures that are under sexual selection. Among populations, the largest difference was observed in the female portion. The reproductive system was more variable than the shell, but showed interpopulation compatibility for the shape of structures. Morphometric and body color phenotypic differentiation were not corroborated by molecular variation since individuals with the same COI haplotype were variable to shell shape and color head-foot mass. The neutral evolution model of sequences has been accepted for the samples analyzed even though not all mutations are silent, highlighting the role of drift in the species evolution. The low variability of some populations may reflect the strong inbreeding due to low dispersal ability and capacity of selfing species, in spite of gene flow via passive dispersal by human activities. We observed a genetic structure of populations, because it presents a unique haplotype and form a distinct lineage in the maximum likelihood dendrogram. Different lineages showed morphometric differences in reproductive structures, which show their independent evolution. These observations must be investigated in more detail to confirm the existence of cryptic species. The analysis of the diversity found in this

study also provided grants for further research aimed at shedding light on the origin of *S. octona*.

Keywords: Land snail. Morphometry. Multivariate analysis. Cytochrome Oxidase. Mitochondrial DNA.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Mapa 1:** Locais de coleta de *Subulina octona*: Belo Horizonte, Coronel Fabriciano, Juiz de Fora e Leopoldina no estado de Minas Gerais; Barra Mansa e seu distrito Floriano, Volta Redonda e Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro..... 31
- Esquema 1:** Medidas lineares da concha de *Subulina octona*; *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha. Ilustração: Tércia Vargas..... 32
- Fotografia 1:** Fenótipos para a coloração da massa cefalopodal de *Subulina octona*, verde (esquerda) e creme (direita). Indivíduos das populações de Juiz de Fora (JF) e Rio de Janeiro (RJ), respectivamente..... 50
- Fotografia 2:** Fenótipos para a coloração da massa cefalopodal de *Subulina octona*, verde (esquerda) e creme (direita). Indivíduos da população de Coronel Fabriciano-MG (CF) aos 180 dias de vida..... 50
- Gráfico 1:** Taxa de crescimento (mm/dia) da concha ao longo do desenvolvimento de moluscos de oito populações de *Subulina octona*, em condições de laboratório; Belo Horizonte-MG (BH); Barra Mansa-RJ (BM); Coronel Fabriciano-MG (CF); Floriano-RJ (FLO); Leopoldina-MG (LEO); Rio de Janeiro-RJ (RJ); Volta Redonda-RJ (VR)..... 50
- Gráfico 2:** Índice espiral (comprimento / largura) das conchas de oito populações de *Subulina octona* aos 180 dias de vida; Belo Horizonte-MG (BH); Barra Mansa-RJ (BM); Coronel Fabriciano-MG (CF); Floriano-RJ (FLO); Leopoldina-MG (LEO); Rio de Janeiro-RJ (RJ); Volta Redonda-RJ (VR)..... 51
- Gráfico 3:** Análise de conglomerados para variáveis conquiliomorfológicas de oito populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento; Belo Horizonte-MG (BH); Barra Mansa-RJ (BM); Coronel Fabriciano-MG (CF); Floriano-RJ (FLO); Leopoldina-MG (LEO); Rio de Janeiro-RJ (RJ); Volta Redonda-RJ (VR)..... 51-52
- Gráfico 4:** Análise discriminante de medidas da concha de oito populações de *Subulina octona* aos 180 dias de vida; Belo Horizonte-MG (BH); Barra Mansa-RJ (BM); Coronel Fabriciano-MG (CF); Floriano-RJ (FLO); Leopoldina-MG (LEO); Rio de Janeiro-RJ (RJ); Volta Redonda-RJ (VR)..... 56
- Mapa 2:** Locais de coleta de *Subulina octona*: Coronel Fabriciano e Leopoldina no estado de Minas Gerais; Barra Mansa, Volta Redonda e Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro..... 67

<b>Esquema 2:</b> Porção proximal do sistema reprodutor de <i>Subulina octona</i> . <i>ai</i> – altura da inserção da bolsa copuladora no oviduto; <i>cbc</i> – comprimento do ducto da bolsa copuladora; <i>ccp</i> – comprimento do complexo peniano; <i>cdbc</i> – comprimento do ducto da bolsa copuladora; <i>ce</i> – comprimento do epifalo; <i>cfa</i> – comprimento do falo; <i>cfl</i> – comprimento do flagelo; <i>co</i> – comprimento do oviduto; <i>lbc</i> – largura da bolsa copuladora; <i>ldbc</i> – largura do ducto da bolsa copuladora; <i>le</i> – largura do epifalo; <i>lfa</i> – largura do falo; <i>lfl</i> – largura do flagelo; <i>lo</i> – largura do oviduto. Ilustração: Tércia Vargas.....	73
<b>Gráfico 5:</b> Análise de conglomerados baseada em medidas lineares e relações morfométricas de estruturas do sistema reprodutor de <i>Subulina octona</i> de cinco populações aos 80 dias de vida. BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR.....	75
<b>Gráfico 6:</b> Análise discriminante baseada em medidas lineares da bolsa copuladora (a), complexo peniano (b), oviduto (c) e associação <i>ai-ccp-co</i> (d) de <i>Subulina octona</i> de cinco populações aos 80 dias de vida.....	80-81
<b>Gráfico 7:</b> Índice espiral ( <i>cc/lc</i> ) da concha de <i>Subulina octona</i> comparado entre cinco populações. BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR.....	82
<b>Gráfico 8:</b> Rede de haplótipos (a) e frequências haplotípicas (b) considerando-se quatro diferentes haplótipos – H1, H2, H3 e H4 – em <i>Subulina octona</i> de cinco diferentes populações.....	84
<b>Dendrograma 1:</b> Dendrograma de Máxima Verossimilhança para cinco populações de <i>Subulina octona</i> . BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR.....	87
<b>Gráfico 9:</b> Análise discriminante baseada em medidas lineares do sistema reprodutor de <i>Subulina octona</i> de duas diferentes linhagens: linhagem 1 (H1+H3+H4) e linhagem 2 (H2).....	88

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Coeficiente de variação (%) das medidas lineares e relações conquiliomorfométricas de oito populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento..... 39-40
- Tabela 2:** Coeficiente de variação (%) para as medidas lineares e relações conquiliomorfométricas e distribuição dos fenótipos de coloração da massa cefalopodal dentro de oito populações de *Subulina octona* na idade de 180 dias..... 41
- Tabela 3:** Estatística descritiva das medidas lineares e relações conquiliomorfométricas de *Subulina octona* aos 180 dias de vida para os fenótipos verde e creme da massa cefalopodal..... 42
- Tabela 4:** Valores médios das medidas lineares e relações morfométricas da concha de *Subulina octona* de três populações (Coronel Fabriciano, Leopoldina e Rio de Janeiro) aos 180 dias de vida..... 43
- Tabela 5:** Valores médios em milímetros e desvio padrão das medidas lineares e relações morfométricas da concha de oito populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento..... 43-49
- Tabela 6:** Matriz de correlações entre medidas lineares da concha de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento..... 53
- Tabela 7:** Resultado do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls para as medidas lineares e razões conquiliomorfométricas de oito populações de *Subulina octona* nas idades de 0 e 180 dias de vida..... 54-55
- Tabela 8:** Resumo da Análise de Componentes Principais para as variáveis conquiliomorfométricas de oito populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento..... 56
- Tabela 9:** Coeficientes de variação (%) para medidas lineares de estruturas do sistema reprodutor de *Subulina octona* de cinco populações aos 80 dias de vida..... 76
- Tabela 10:** Medidas lineares e razões (média  $\pm$  desvio padrão) de estruturas do sistema reprodutor de *Subulina octona* de cinco populações aos 80 dias de vida..... 77
- Tabela 11:** Análise de variância ANOVA seguida de teste t entre medidas lineares e razões de estruturas do sistema reprodutor de *Subulina octona* de cinco populações aos 80 dias de vida..... 78

<b>Tabela 12:</b> Medidas lineares e razões das estruturas do sistema reprodutor de <i>Subulina octona</i> aos 80 dias de vida comparando-se indivíduos com presença e ausência de ovos no útero.....	82
<b>Tabela 13:</b> Correlações entre medidas lineares de estruturas do sistema reprodutor e da concha de <i>Subulina octona</i> .....	83
<b>Tabela 14:</b> Índices de diversidade intrapopulacional: diversidade nucleotídica, frequência haplotípica e número médio de alelos de cinco populações de <i>Subulina octona</i> .....	85
<b>Tabela 15:</b> Teste de neutralidade pelos métodos Tajima e Fu (nível de significância 0,05) para cinco populações de <i>Subulina octona</i> .....	85
<b>Tabela 16:</b> $F_{ST}$ par-a-par (abaixo da diagonal) e distância genética par-a-par (acima da diagonal) para cinco populações de <i>Subulina octona</i> .....	86
<b>Tabela 17:</b> $F_{ST}$ par-a-par (abaixo da diagonal) e distância genética par-a-par (acima da diagonal) para cinco populações de <i>Subulina octona</i> , após retirada do haplótipo H2.....	86
<b>Tabela 18:</b> Medidas lineares e razões de estruturas do sistema reprodutor e concha de <i>Subulina octona</i> de duas linhagens: linhagem 1 (H1+H3+H4) e linhagem 2 (H2).....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS

### *Abreviaturas de localidades geográficas*

BH	Belo Horizonte-MG
BM	Barra Mansa-RJ
CF	Coronel Fabriciano-MG
FLO	Florianópolis-RJ
JF	Juiz de Fora-MG
LEO	Leopoldina-MG
RJ	Rio de Janeiro-RJ
VR	Volta Redonda-RJ

### *Abreviaturas conchiliológicas*

<i>ca</i>	comprimento da abertura
<i>cc</i>	comprimento total da concha
<i>ce</i>	comprimento da espira (Sessão I)
<i>cvc</i>	comprimento da volta corporal
<i>la</i>	largura da abertura
<i>lc</i>	largura máxima da concha
<i>nv</i>	número de voltas da concha

### *Abreviaturas anatômicas*

<i>ai</i>	altura da inserção do ducto da bolsa copuladora no oviduto
<i>cbc</i>	comprimento da bolsa copuladora
<i>ccp</i>	comprimento do complexo peniano
<i>cdbc</i>	comprimento do ducto da bolsa copuladora
<i>ce</i>	comprimento do epifalo (Sessão II)
<i>cfa</i>	comprimento do falo
<i>cfl</i>	comprimento do flagelo
<i>co</i>	comprimento do oviduto
<i>lbc</i>	largura da bolsa copuladora
<i>ldbc</i>	largura do ducto da bolsa copuladora
<i>le</i>	largura do epifalo
<i>lfa</i>	largura do falo
<i>lfl</i>	largura do flagelo
<i>lo</i>	largura do oviduto

### *Outras abreviaturas*

H1	haplótipo 1
H2	haplótipo 2
H3	haplótipo 3
H4	haplótipo 4



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>17</b>
<b>2 VARIABILIDADE CONQUILIOLOGICA EM <i>Subulina octona</i> (Brugüière, 1789) (MOLLUSCA, GASTROPODA, SUBULINIDAE) .....</b>	<b>28</b>
<b>3 VARIABILIDADE ANATÔMICA E MOLECULAR EM <i>Subulina octona</i> (Brugüière, 1789) (MOLLUSCA, GASTROPODA, SUBULINIDAE) .....</b>	<b>64</b>
<b>4 CONCLUSÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O filo Mollusca apresenta-se como o segundo maior filo zoológico, sendo superado em número de espécies apenas por Insecta (HYMAN, 1967; VALENTINE, 2004). Dentre os grupos de moluscos, os gastrópodes pulmonados apresentam grande diversidade, sendo estimada a existência de mais de 30.000 espécies, distribuídas por uma ampla variedade de habitats (BARKER, 2001; HELLER, 2001). Muitas espécies foram descritas com base somente na concha e isso dificulta o entendimento das relações entre espécies. Atualmente existe a tendência não apenas de se obter descrições da morfologia mais detalhadas e aprofundadas, como também de se empregar ferramentas moleculares como mais uma fonte de informação para a distinção entre espécies e estabelecimento de suas inter-relações, bem como para a resolução de situações onde a morfologia não é suficientemente informativa.

Os moluscos terrestres apresentam capacidade de dispersão muito baixa. Evidências moleculares têm demonstrado que, em populações distintas, o acasalamento ocorre predominantemente entre indivíduos geneticamente aparentados ou por autofecundação (HELLER, 2001). Como consequência dessa estratégia reprodutiva em resposta à baixa capacidade de dispersão, as populações locais de determinada espécie apresentam genótipos únicos, sendo consideradas linhagens distintas. Dessa forma, genes co-adaptados são mantidos juntos e cada população ou linhagem é altamente adaptada às condições locais (BACKELJAU et al., 2001; HELLER, 2001). Segundo Backeljau et al. (2001) o número de linhagens para uma espécie tende a aumentar à medida que indivíduos de diferentes áreas são estudados e os polimorfismos são detectados.

Além da importância para a sistemática tradicional, os conhecimentos acumulados a respeito da morfologia dos gastrópodes pulmonados contribuem para os estudos em sistemática filogenética. Apesar de a monofilia de Pulmonata ser aceita (BARKER, 2001), bem como de Stylommatophora (WADE et al., 2001), as relações filogenéticas entre as várias radiações adaptativas não estão completamente resolvidas. Por este motivo, o desenvolvimento de esquemas de classificação baseados em relações evolutivas é de grande interesse.

Apesar de diversas espécies terem sido descritas com base na conchiliologia e, em alguns casos ser suficiente, o estudo da morfoanatomia dos diferentes sistemas permite a obtenção de maior quantidade de informações relevantes (OLIVEIRA & ALMEIDA, 2000). Variações na morfologia de estruturas como concha, sistema reprodutor e rádula de moluscos

pulmonados, detectadas por meio de estudos morfométricos, podem ser úteis para a diferenciação de populações e espécies de moluscos terrestres (CARR, 2002; CARVALHO, 2009). As ferramentas morfométricas são tratadas através de análises multivariadas para estudos que vão além da simples comparação morfológica, que isolada pode não ser suficiente, mostrando ser um bom parâmetro para comparar formato da estrutura estudada e relacioná-lo à função da mesma (PADILLA, 2003).

Em muitos casos, os resultados da análise morfológica, combinada com a investigação da variabilidade molecular, podem subsidiar mudanças na taxonomia dos grupos estudados (ELEJALDE et al., 2008). Dentre essas mudanças, pode-se mencionar a descrição de novas espécies, a partir da descoberta de complexos de espécies sob uma denominação específica única, ou, em outro extremo, a redução do número de espécies reconhecidas, baseada na descoberta de que a variabilidade morfológica observada corresponde a um polimorfismo.

O conhecimento da variabilidade inerente às populações de moluscos terrestres torna-se importante no contexto da conservação da biodiversidade. De acordo com Backeljau et al. (2001) populações geneticamente distintas devem ser reconhecidas como unidades apropriadas para a conservação, independentemente do seu status taxonômico objetivando a preservação de adaptações ecológicas únicas e a manutenção do potencial evolutivo.

A maior parte das espécies de subulinídeos foi descrita e é conhecida até hoje somente pelas características da concha (NAGGS, 1994), sendo provável a ampla existência de sinonímia, bem como de complexos de espécies sob uma denominação comum. O conhecimento correto da identidade específica em moluscos terrestres é melhor realizado pela integração de várias abordagens – conquiliológica, anatômica e genética (PFENNINGER et al., 2003; KAMEDA et al., 2007; ELEJALDE et al., 2008) – a fim de esclarecer os limites entre o polimorfismo dentro de determinada espécie e a formação de um complexo de espécies.

### **1.1 A espécie *Subulina octona***

*Subulina octona* (Brugüière, 1789) é um molusco pulmonado amplamente distribuído pela Europa, África, Austrália e Américas, incluindo o Brasil (PILSBRY, 1946; HERBERT, 2010). Sua ocorrência foi relatada em todas as regiões do território brasileiro (ARAÚJO & BESSA, 1993; SIMONE, 2006). É uma espécie importante do ponto de vista médico-veterinário por se tratar de hospedeiro intermediário nos ciclos de vários parasitos (ARAÚJO & BESSA, 1993). Dentre eles, destacam-se *Platynosomum illiciens* (Braun, 1901) e *Tanaisia*

*bragai* (Santos, 1934) (BRANDOLINI et al., 1997), *Postharmostomum gallinum* Witenberg, 1923 (ALICATA, 1940 apud ARAÚJO & BESSA, 1993), *Aerulostrongylus abstrusus* (Railliet, 1898) (ALICATA, 1964 apud ARAÚJO & BESSA, 1993), *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) (BESSA et al., 2000) e *A. cantonensis* (Chen, 1935) (CALDEIRA et al., 2007).

Grande parte dos trabalhos realizados sobre *S. octona* refere-se a estudos conquiliológicos, sinonímia e distribuição geográfica (TRYON & PILSBRY, 1906 apud BESSA & ARAÚJO, 1995a; BAKER, 1913; ALMEIDA & MOTA, 2011). Trabalhos com enfoque parasitológico também vêm sendo desenvolvidos (ARAÚJO & BESSA, 1993; BRANDOLINI et al., 1997; BESSA et al., 2000; BRANDOLINI & AMATO, 2006; CALDEIRA et al., 2007). Estudos sobre a biologia e o comportamento (ARAÚJO & BESSA, 1993; BESSA & ARAÚJO, 1995a,b; D'ÁVILA et al., 2004, 2006; D'ÁVILA & BESSA, 2005a,b) ampliaram as informações acerca dessa espécie. Tais abordagens atualmente vêm subsidiando trabalhos em que *S. octona* atua como modelo de estudo para desenvolvimento de moluscidas (FERREIRA et al., 2009), tendo em vista seu *status* de praga (JUŘIČKOVÁ, 2006; HERBERT, 2010).

O comprimento da concha relatado para *S. octona* na literatura é bastante variável. Bessa & Araújo (1995b) verificaram um tamanho médio de 17,6mm (máximo de 19,8mm) para moluscos com idade de 120 dias em condições de laboratório, com padrão indeterminado de crescimento. Esses autores relataram também que indivíduos com comprimento entre 9 e 13,5mm apresentavam-se maduros, sendo possível verificar ovos no interior do corpo dos animais por transparência da concha. Segundo Tryon & Pilsbry (1906 apud BESSA & ARAÚJO, 1995a), a reprodução de *S. octona* começa antes que a concha atinja 2/3 do tamanho máximo da espécie.

*Subulina octona* é uma espécie hermafrodita simultânea capaz de realizar autofecundação (BESSA & ARAÚJO, 1995a). BESSA & ARAÚJO (1995a) verificaram que a idade média para a primeira oviposição foi de 43 dias (mínimo de 38 e máximo de 50), independente da densidade em que os moluscos foram criados, com posturas contendo de 1 a 9 ovos. D'ávila & Bessa (2005a) em estudo sobre a influência do substrato no desenvolvimento de *S. octona* proveniente de Juiz de Fora-MG, verificaram que, criados em terra vegetal em grupos de 35 indivíduos, estes moluscos levaram em média 59,17 dias (mínimo 48 dias, máximo 69 dias) para o alcance da maturidade sexual, com 11,46mm (mínimo 8mm, máximo 14mm) de comprimento da concha.

ARAÚJO & BESSA (1993) descreveram o sistema reprodutor de moluscos identificados como *S. octona* provenientes de coletas nos estados do Rio de Janeiro, de São Paulo, do Rio Grande do Sul e do Amapá. Segundo esses autores, a espécie apresenta um complexo peniano muito longo e delgado, com a região fállica representando a maior parte do órgão, não possuindo bainha muscular e sendo destacado pelo seu maior calibre até o ponto onde se insere uma faixa muscular originada do músculo columelar. O músculo retrator do pênis tem inserção terminal no flagelo e é relativamente longo. O flagelo curto termina em fundo cego e pode apresentar calibre diferente do falo. O oviduto é longo, tendo o canal deferente preso em grande parte de sua extensão, por tecido conjuntivo frouxo, que a certa distância do átrio genital abandona o oviduto e se liga ao complexo peniano. O oviduto desemboca no átrio genital.

Até o presente momento, nenhuma sequência gênica da espécie *S. octona* foi depositada no banco de dados virtual GenBank (NCBI, 2012). Abordagens com enfoque genético para a espécie são escassas na literatura limitando-se a inclusões em filogenias de grupos maiores (WADE et al., 2001; FONTANILLA, 2010).

## 1.2 A concha dos gastrópodes terrestres

Espécies com baixa capacidade de dispersão, como é o caso dos moluscos terrestres, geralmente apresentam uma estrutura de populações forte, constituindo-se por isso de ótimos modelos para o estudo da evolução fenotípica (PFENNINGER & MAGNIN, 2001). O fenótipo é influenciado pela história filogenética, deriva gênica, fluxo gênico, seleção, ambiente e processos de desenvolvimento (PFENNINGER & MAGNIN, 2001). Caracteres da concha são propensos à convergência devido a contextos ecológicos semelhantes (CHIBA, 2004) ou podem ser altamente variáveis devido ao isolamento geográfico e à deriva genética (TESHIMA et al., 2003).

Chiba & Davison (2007) afirmaram que alguns padrões distintos com relação à altura da concha, relação entre comprimento e largura e tamanho da abertura têm sido relacionados a habitats e hábitos distintos. Como exemplo, observam-se menores tamanhos de abertura em relação ao tamanho total da concha em moluscos arborícolas, conchas mais alongadas em populações que habitam o folhiço. Nesse sentido, acredita-se que a forma da concha seja bastante influenciada por pressões ambientais e sujeita à variação interpopulacional.

Fatores como temperatura, umidade e o tipo de substrato podem regular o ritmo de desenvolvimento de populações de moluscos, afetando principalmente seu crescimento e

desenvolvimento, reprodução e sobrevivência (FURTADO et al., 2004). A morfologia da concha de moluscos terrestres relaciona-se com parâmetros biológicos, como competição com outras espécies, e físicos, como profundidade da serrapilheira, altitude e geologia.

Tamanho do corpo é um dos parâmetros mais estudados em macroecologia uma vez que se correlaciona com fisiologia, comportamento, ecologia e outros aspectos morfológicos (PETERS, 1983). Alguns autores verificaram que, em menores altitudes, as conchas tendem a se apresentar maiores. É o caso, por exemplo, de *Mandarina polita* (CHIBA & DAVISON, 2007) e dos subulinídeos do gênero *Rumina* Risso, 1826 (CARR, 2002).

Alguns autores relacionaram o tamanho dos moluscos à densidade populacional (BAMINGER & HAASE, 2000; ANDERSON et al., 2007; SILVA et al. 2008, 2009). *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821), *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (ALMEIDA & BESSA, 2000), *Bulimulus tenuissimus* (d'Orbigny, 1835) (MEIRELES et al., 2008; SILVA et al., 2008) e *Cepaea hortensis* (PERRY & ARTHUR, 1991) apresentaram menores tamanhos quando do incremento da densidade. Esta, por sua vez, também interfere indiretamente na produtividade (ALMEIDA & BESSA, 2000; ANDERSON et al., 2007; SILVA et al., 2008, 2009; MEIRELES, 2009).

A média anual de temperatura gerou variação no tamanho da concha de *Oreohelix cooperi* (Binney, 1838), sendo que as populações estudadas não apresentavam diferenciação genética (ANDERSON et al., 2007). Dessa forma, as variações fenotípicas surgiram como resultado de fatores exógenos, bióticos ou abióticos, que atuaram sobre os moluscos. Tal efeito é conhecido como plasticidade fenotípica. Em outros casos, a variabilidade morfológica da concha pode vir acompanhada de variabilidade genética.

Samadi et al. (2000) estudando populações de limneídeos verificaram grande variação entre dados conquiliológicos e anatômicos (principalmente masculinos) entre populações de *Lymnaea*. No entanto, as análises genéticas pela técnica de alo-enzimas não apresentaram o mesmo resultado (JABBOUR-ZAHAB et al., 1997 apud SAMADI et al., 2000), o que sugere a predominância de fatores ambientais determinando a variabilidade fenotípica. Neste caso, a diferenciação dos taxa só foi possível acessando-se os caracteres anatômicos.

Alguns autores defendem que o tamanho do corpo aumenta com o dessecamento do habitat, outros que o aumento se dá com a maior umidade – embora não de forma linear. Nevo et al. (1983) hipotetizaram que moluscos grandes são predominantes em habitats secos porque perdem relativamente menos água devido à sua maior razão superfície/volume. Hausdorf (2006), no entanto, não encontrou correlação significativa entre tamanho do corpo de moluscos terrestres de regiões áridas e a amplitude de precipitação, ou seja, a variação

interespecífica, neste caso, não foi explicada pela pluviosidade. Pfenninger & Magnin (2001) encontraram correlação negativa entre a precipitação anual e tamanho de *Candidula unifasciata* (Poiret, 1801).

Chiba & Davison (2007) relacionaram o tamanho da concha com a habilidade do molusco para se enterrar. O estudo da variabilidade do formato de *M. polita*, considerando-se o índice espiral (razão entre comprimento e a largura), permitiu relacionar os formatos de conchas com predação e profundidade da serrapilheira, mostrando que a morfologia é variável em diferentes sítios. Conchas com maior índice espiral permitem que os moluscos tenham maior habilidade para se enterrar que aquelas com menor índice. Em presença de competidores, *M. polita* tende a ter menor índice espiral e ocupar a serrapilheira rasa. Na ausência, a concha de *M. polita* é mais variável, tendendo a um maior índice espiral e a se enterrar mais.

A abertura da concha também tem sido objeto de estudos morfológicos e ecológicos. Cameron (1981) estudou a geometria da concha e as relações alométricas de 19 espécies de moluscos terrestres intra e interespecificamente, relacionando a área da abertura da concha e o peso do corpo a fim de compreender a relação entre forma e função. Sugeriu que a variação geométrica em moluscos de pequeno tamanho é geralmente maior que nos maiores. Moluscos maiores precisam minimizar o efeito da carga enquanto, nos menores, a dessecação e a predação são fatores mais importantes. Uma pequena abertura, minimizando a área da superfície exposta, representa uma vantagem seletiva que minimiza a perda de umidade sob condições de estresse hídrico (PFENNINGER & MAGNIN, 2001).

Características da ornamentação da concha também podem ser influenciadas pelo ambiente. Moluscos da espécie *C. unifasciata* estudados por Pfenninger & Magnin (2001) foram separados em duas linhagens distintas com base nas relações entre temperatura e forma, aspereza e espaçamento entre as lamelas da concha. Segundo estes autores, estas características sofrem influência dos períodos de estivação, que afetam, entre outros, a alimentação dos moluscos em campo. Populações com elevada média anual de temperatura tenderam a apresentar indivíduos com a superfície da concha áspera, com costelas largamente espaçadas e formato da concha reduzido, com aberturas pequenas. Quando transportados para laboratório, a prole desenvolveu-se com superfície mais lisa, mostrando que a característica sofre influência das pressões do ambiente.

Segundo Puillandre et al. (2010), o último estágio de algumas decisões taxonômicas em malacologia é a reavaliação dos caracteres conquiológicos a fim de identificar e

formalizar características discriminantes, levando-se em conta a variabilidade intraespecífica da concha.

### 1.3 O sistema reprodutor dos gastrópodes terrestres

Características anatômicas do sistema reprodutor servem como critério para diferenciação de grupos taxonômicos e podem apresentar grande variabilidade entre e dentro de populações. Essas características, associadas à conquiliologia e aos estudos genéticos, podem esclarecer sobre biologia, comportamento e evolução.

De acordo com Boer & Joosse (1975), o crescimento e a diferenciação do trato reprodutor de gastrópodes pulmonados está sob o controle de dois fatores endócrinos produzidos pelas gônadas. Runham & Laryea (1968) acrescentaram ainda que os estágios de maturação do sistema reprodutor estão relacionados às fases do crescimento do animal e que podem ser controlados por fatores fisiológicos e ambientais.

Estudos morfológicos e morfométricos do sistema reprodutor vêm sendo extensamente realizados para várias espécies, mas para *S. octona* essa abordagem nunca foi utilizada. Muitos desses estudos relacionam essas características com as conquiliológicas, como o tamanho do animal (BEESE et al., 2006b; BEESE & BAUR, 2006), e biológicas, como maturidade sexual, fecundidade e densidade populacional (CUEZZO, 1990; BAMINGER & HAASE, 2000; PFENNINGER & MAGNIN, 2001).

Cuezzo (1990) verificou que há relação entre o diâmetro da concha e o grau de maturidade do trato reprodutor de *Neohelix major* (Binney, 1837), tendo a parte masculina amadurecido ligeiramente mais cedo que a feminina, embora ambos os sistemas parecessem ser funcionais no animal maduro.

Através de abordagens conquiliológica, anatômica e genética, Kameda et al. (2007) puderam diferenciar duas linhagens evolutivas distintas de *Satsuma (Luchuhadra) largillierti*. Estes autores compararam o sistema reprodutor completo e separadamente para o masculino e o feminino e verificaram maior variação na parte masculina, o que segundo Eberhard (1985) é mais comum. Tais variações promovem um isolamento reprodutivo que leva estes animais a um rápido processo de especiação.

Segundo Beese et al. (2006a), características sexualmente selecionadas, como aquelas do sistema reprodutor, tendem a ter a alta variação fenotípica. Segundo Arnqvist (1998), mecanismos que geram variação no sucesso de paternidade pós-inseminação do macho, como competição espermática, escolha críptica da fêmea e conflito sexual (estratégias masculinas e



femininas de controle da fertilização), são os principais modeladores da evolução das características reprodutivas por meio de seleção sexual. Vários estudos com esta abordagem vêm sendo realizados, com destaque para o molusco terrestre *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758) (BAUR & BAUR, 1992; CHEN, 1993; BAMINGER & HAASE, 2000; BOJAT et al., 2001; BEESE & BAUR, 2006; BEESE et al., 2006a,b; MINORETTI & BAUR, 2006; BAUR, 2007). Tais estudos visam compreender o papel da seleção sexual na modelagem e evolução das espécies, tendo em vista os mecanismos geradores de variabilidade e, em última análise, de especiação.

A interação entre interesses masculinos e femininos na reprodução, leva à coevolução entre características a partir do jogo de interesses sexuais. Estruturas diretamente envolvidas no sucesso de fertilização, como o complexo peniano, responsável pela formação do espermátóforo, a bolsa copuladora e seu divertículo, responsáveis pela digestão espermática e a espermateca, responsável pelo armazenamento de alo-espermatozóides sofrem uma grande pressão de seleção (LIND, 1973; ARNQVIST, 1997, 1998; KOENE, 2006; LEONARD, 2006). Em consequência, são estruturas que apresentam significativa variação intra e interespecífica.

A respeito da competição espermática, pesquisadores buscam compreender o papel do tamanho corporal dos parceiros, do espermátóforo e dos espermatozóides, da quantidade de esperma, da sua sobrevivência após o processo de digestão e da competição dentro da espermateca com esperma de outros machos, à luz da seleção sexual (LIND, 1973; BAUR, 1998, 2007; ANGELONI et al., 2002; ANGELONI, 2003; EVANNO et al., 2005; BEESE et al., 2006a; ANTHES et al., 2007; DILLEN, et al., 2010; GAREFALAKI et al., 2010; KUPFERNAGEL et al., 2010). Por outro lado, a respeito das características femininas do sistema reprodutor, o foco das pesquisas tem sido na compreensão dos mecanismos de funcionamento da bolsa copuladora e divertículo, e da morfologia e funcionamento da espermateca, focando no armazenamento e utilização do esperma proveniente de cópulas múltiplas (mecanismos de escolha críptica da fêmea) (EBERHARD & CORDERO, 1995; BAMINGER & HAASE, 1999, 2000; BOJAT et al., 2001, 2002; BOJAT & HAASE, 2002; EVANNO et al., 2005; BEESE & BAUR, 2006; BEESE et al., 2006a,b, 2008; DAVISON, 2006; ANTHES et al., 2007; KOEMTZOPOULOS & STAIKOU, 2007; EVANNO & MADEC, 2007; DILLEN et al., 2009; KOENE et al., 2009).

O papel do hermafroditismo e da autofecundação em moluscos terrestres também vem sendo amplamente investigado (SELANDER & KAUFMAN, 1973; MC CRACKEN & BRUSSARD, 1980; MC CRACKEN & SELANDER, 1980; FOLTZ et al., 1982; JARNE &

DELAY, 1990; CHEN, 1993; HELLER, 1993; VIANEY-LIAUD et al., 1996; FREITAS et al., 1997; ARMBRUSTER & BERNHARD, 2000; JORDAENS et al., 2006; ARMBRUSTER et al., 2007; KUPFERNAGEL et al., 2010). É aceito na literatura que a autofecundação reduz a variabilidade, caracterizando um grau máximo de endogamia nas populações (MC CRACKEN & BRUSSARD, 1980), mas questiona-se como populações com expressiva taxa de autofecundação e reduzida variabilidade conseguem se manter viáveis e bem sucedidas nos ambientes que colonizam (FACON et al., 2003; DLUGOSCH & PARKER, 2008).

Carr (2002) fez uma investigação mais detalhada da morfologia da parede interna de alguns órgãos do sistema reprodutor de diferentes espécies do subulinídeo *Rumina* sp., encontrando maior diferença entre as características internas dos órgãos (como lamelas) do que externas. Carvalho (2009) estudou a variação morfométrica e morfológica entre populações de outro subulinídeo, *L. unilamellata* e, como outros autores, verificou que as principais variações ocorrem na região proximal do sistema reprodutor. Esses órgãos, envolvidos diretamente no sucesso do acasalamento, sofrem maior pressão de seleção.

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 (EBERHARD, 1985). A morfologia do aparelho genital masculino integra o conjunto de critérios utilizados na sistemática de vários pulmonados. Dessa forma, o conhecimento da variação de características reprodutivas de *S. octona* fornece subsídios para compreensão das relações intra e interpopulacionais nesta espécie.

#### **1.4 O DNA mitocondrial como ferramenta para estudos malacológicos**

O conhecimento da relação entre organismos e sua evolução é fundamental para a sistemática, que inclui a classificação e identificação das espécies e o entendimento de suas relações, visando compreender os padrões evolutivos da diversidade biológica (BUSO, 2005).

Variações fenotípicas em ambientes heterogêneos podem ocorrer devido à variabilidade genética, à plasticidade fenotípica ou a ambas, e constituem um desafio para a ecologia evolutiva (ANDRADE & SOLFERINI, 2006). Polimorfismo intraespecífico e convergência morfológica entre diferentes espécies podem levar a confusões taxonômicas quando se consideram somente caracteres morfológicos na classificação (CALDEIRA et al., 2000; KAMEDA et al., 2007; ELEJALDE et al., 2008). Métodos moleculares podem ajudar a esclarecer essas relações e fornecer subsídios para análises filogenéticas (CHIBA, 1999). A

maior vantagem dessas técnicas é a investigação direta da situação genotípica, que permite a detecção de variação ao nível de DNA, excluindo, portanto, influências ambientais diretas (BUSO, 2005).

Através de abordagens conchiliológica, anatômica e genética, Kameda et al. (2007) puderam diferenciar duas linhagens evolutivas distintas de *S. (L.) largillierti*: *S. erabuensis* Minato, 1978 e *S. sooi* Minato, 1982. Segundo esses autores, estudos moleculares e anatômicos têm mostrado que algumas espécies nominais podem não refletir a verdadeira linhagem evolutiva. No entanto, afirmar que determinado grupo de indivíduos caracterizados morfológica e/ou geneticamente retrata uma população isolada reprodutivamente e, assim, uma espécie biológica, ainda requer maiores conhecimentos.

Para se conhecer a relação entre parentes próximos, como espécies dentro de um gênero, devem ser escolhidas regiões do DNA que evoluem rapidamente, ou seja, áreas neutras (BUSO, 2005). O DNA mitocondrial (mtDNA) tem se mostrado muito eficiente em explicar aspectos evolutivos de populações e espécies animais (WILSON et al., 1985; AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987) devido a sua alta taxa de evolução, o formato circular, o pequeno tamanho, a simplicidade gênica (BROWN, 1985; HARRISON, 1989) e por apresentar-se muito conservado nos animais. O sequenciamento e comparação de regiões do mtDNA tem sido amplamente utilizado na caracterização de genomas e na detecção de variabilidade genética entre populações ou espécies, cujos resultados contribuem para o conhecimento da biodiversidade dos ecossistemas.

Várias técnicas moleculares vêm sendo utilizadas nas últimas décadas para desvendar as relações de parentesco genético entre organismos em maior ou menor escala. Muitos trabalhos têm utilizado as análises dos genes mitocondriais COI e 16SrRNA em estudos filogenéticos, sistemáticos ou comparativos com caracteres morfológicos (WATANABE & CHIBA, 2001; MAURO et al., 2003; PFENNINGER et al., 2003; HYMAN et al., 2004; PINCEEL et al., 2005; HERSHLER et al., 2007; KAMEDA et al., 2007; FIORENTINO et al., 2008; MELO, 2008; CHEN et al., 2009; KÖHLER & DAMES, 2009; PUILLANDRE et al., 2010).

O uso de sequências de nucleotídeos mitocondriais COI tem se mostrado uma ferramenta promissora para esses estudos. Sua subunidade 1 é parte de um complexo gênico codante de proteínas transmembranares, envolvidas no transporte elétrico e catálise da cadeia respiratória de organismos eucariontes (MORAIS & MARRELLI, 2009). Este gene vem sendo alvo de estudos populacionais de variabilidade genética pela sua universalidade e importância evolutiva.

Puillandre et al. (2010) analisaram várias espécies do gênero *Gemmuloborsonia*. A diferenciação entre espécies não ficou clara acessando-se caracteres radulares e conquiliológicos, enquanto a análise da subunidade I da citocromo oxidase revelou a presença de espécies crípticas. Esses autores ressaltaram que nem sempre os mecanismos que levam à especiação, especialmente os recentes, resultam em espécies morfologicamente distintas.

Samadi et al. (2000), estudando populações de limnédeos obtidas em campo, verificaram grande variação entre dados conquiliológicos e anatômicos (principalmente masculinos) entre populações. No entanto, os dados genéticos não forneceram evidências de variabilidade, sugerindo a predominância de fatores ambientais como fatores determinantes. Neste caso, a diferenciação dos taxa só foi possível acessando-se os caracteres anatômicos. Daí se conclui que uma ferramenta que se mostra adequada para estudos com determinado grupo pode não ser para outro, mostrando a necessidade de utilização de várias ferramentas associadas ou mesmo mais de uma técnica para cada uma delas, por exemplo, análise de mais de uma região alvo no DNA.

Algumas vezes os caracteres morfológicos podem não ser suficientes para a correta identificação de espécies, tornando-se indispensável o uso da ferramenta molecular. Em um estudo morfológico e molecular do gênero de gastrópode marinho *Patella*, Mauro et al. (2003) verificaram que caracteres da concha não foram suficientes para discriminar adequadamente as espécies, o que os autores sugeriram dever-se à influência dos fatores ambientais. A distinção das espécies só foi obtida através da abordagem genética, com o uso de alozima e marcadores do gene COI do mtDNA.

Atualmente um grande esforço vem sendo feito por pesquisadores de todo o mundo em se ampliar e organizar o conhecimento acerca das características genéticas dos diversos organismos existentes no planeta. Bancos de dados como o GenBank (NCBI, 2012), disponíveis em rede, arquivam sequências genéticas desses organismos obtidas a partir de pesquisas realizadas e depósito dos dados no sistema. Até o presente momento, nenhuma sequência da espécie *S. octona* foi encontrada nos registros desse banco de dados. Para o gênero *Subulina*, *S. striatella* (Rang, 1831) nativa do oeste africano foi a única espécie já sequenciada (NCBI, 2012), porém para o marcador RNAr (WADE et al., 2001).

O uso da taxonomia molecular não menospreza os dados morfológicos e tem sido utilizado como uma ferramenta auxiliar em determinadas situações. Estudos que utilizam ambas as abordagens podem gerar dados que permitem uma melhor interpretação e compreensão da diversidade biológica dos organismos em estudo, ressaltando-se que cada método tem suas vantagens e desvantagens.

## 2 VARIABILIDADE CONQUILIOLÓGICA EM *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (MOLLUSCA, GASTROPODA, SUBULINIDAE)

### 2.1 Introdução

A grande diversidade de gastrópodes pulmonados, estimada em mais de 30.000 espécies, distribuídas em diferentes habitats (BARKER, 2001; HELLER, 2001), compreende, em sua maioria, espécies descritas com base em características conquiliológicas, como é o caso da família Subulinidae (NAGGS, 1994). A baixa vagilidade (BAUR, 1996) e a capacidade de se reproduzir por autofecundação (HELLER, 2001) podem acelerar os processos evolutivos nesses moluscos. Dessa forma, observa-se uma rápida adaptação às condições ambientais, e principalmente de microhabitat, levando à formação de linhagens distintas (BACKELJAU et al., 2001).

A variabilidade observada entre e dentro de populações é reflexo destas adaptações, que podem refletir-se na morfologia, na biologia e/ou nas estruturas genéticas das espécies (CHIBA & DAVISON, 2007). A variabilidade é bastante estudada em ambientes temperados enquanto pouco se conhece sobre espécies de moluscos terrestres que habitam ambientes tropicais, sejam nativas ou introduzidas (HYMAN et al., 2004; GOMES et al., 2010). Variações na morfologia de estruturas como concha, sistema reprodutor e rádula de moluscos pulmonados, detectadas por meio de estudos morfométricos, podem ser úteis para a diferenciação de populações e espécies de moluscos terrestres (CARVALHO, 2009).

*Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Subulinidae) é um gastrópode pulmonado amplamente distribuído pela Europa, África, Austrália e Américas, incluindo o Brasil (PILSBRY, 1946), tendo sido relatada sua ocorrência em todas as regiões do território nacional (ARAÚJO & BESSA, 1993; SALGADO & COELHO, 2003; SIMONE, 2006). A localidade tipo da espécie é o Caribe (Antilhas, Guadalupe e São Domingues) (BRUGÜIÈRE, 1792), sendo registrada sua ocorrência por outros autores para outras localidades do continente americano (PILSBRY, 1946; SHEA, 2007). É uma espécie importante do ponto de vista médico-veterinário por se tratar de hospedeiro intermediário no ciclo de vários parasitos (ARAÚJO & BESSA, 1993). Sua dispersão pelos territórios é predominantemente passiva, uma vez que habita ambientes antropizados, como hortas e jardins (ARAÚJO & BESSA, 1993), sendo transportada junto a terra ou mudas de plantas. Apresenta concha espiralada com

comprimento variável e padrão indeterminado de crescimento. É hermafrodita simultânea e realiza autofecundação (BESSA & ARAÚJO, 1995a).

Grande parte dos trabalhos realizados sobre *S. octona* refere-se a estudos conchiliológicos, sinonímia e distribuição geográfica (TRYON & PILSBRY, 1906 apud BESSA & ARAÚJO, 1995a; BAKER, 1913; ALMEIDA & MOTA, 2011). Estudos sobre a biologia e o comportamento (ARAÚJO & BESSA, 1993; BESSA & ARAÚJO, 1995a,b; D'ÁVILA et al., 2004, 2006; D'ÁVILA & BESSA, 2005a,b) ampliaram as informações sobre a espécie.

Espécies com baixa capacidade de dispersão apresentam uma forte estrutura populacional, constituindo-se de ótimos modelos para o estudo da evolução fenotípica (PFENNINGER & MAGNIN, 2001). O fenótipo é influenciado pela história filogenética, deriva e fluxo gênico, seleção, ambiente e processos de desenvolvimento (PFENNINGER & MAGNIN, 2001). Variações fenotípicas em ambientes heterogêneos podem ocorrer devido à variabilidade genética, à plasticidade fenotípica ou a ambas (ANDRADE & SOLFERINI, 2006). Caracteres da concha são propensos à convergência devido a contextos ecológicos semelhantes (CHIBA, 2004) ou podem ser altamente variáveis devido ao isolamento geográfico e à deriva genética (TESHIMA et al., 2003) sujeitos assim à variação intra e/ou interpopulacional (CHIBA & DAVISON, 2007). A variabilidade fenotípica pode ser (PFENNINGER & MAGNIN, 2001) ou não ser (SAMADI et al., 2000) reflexo da variabilidade molecular.

Objetivou-se com este trabalho verificar a variabilidade conchiliológica intra e interpopulacional na espécie *S. octona* com base em ferramentas morfométricas.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Grupos experimentais**

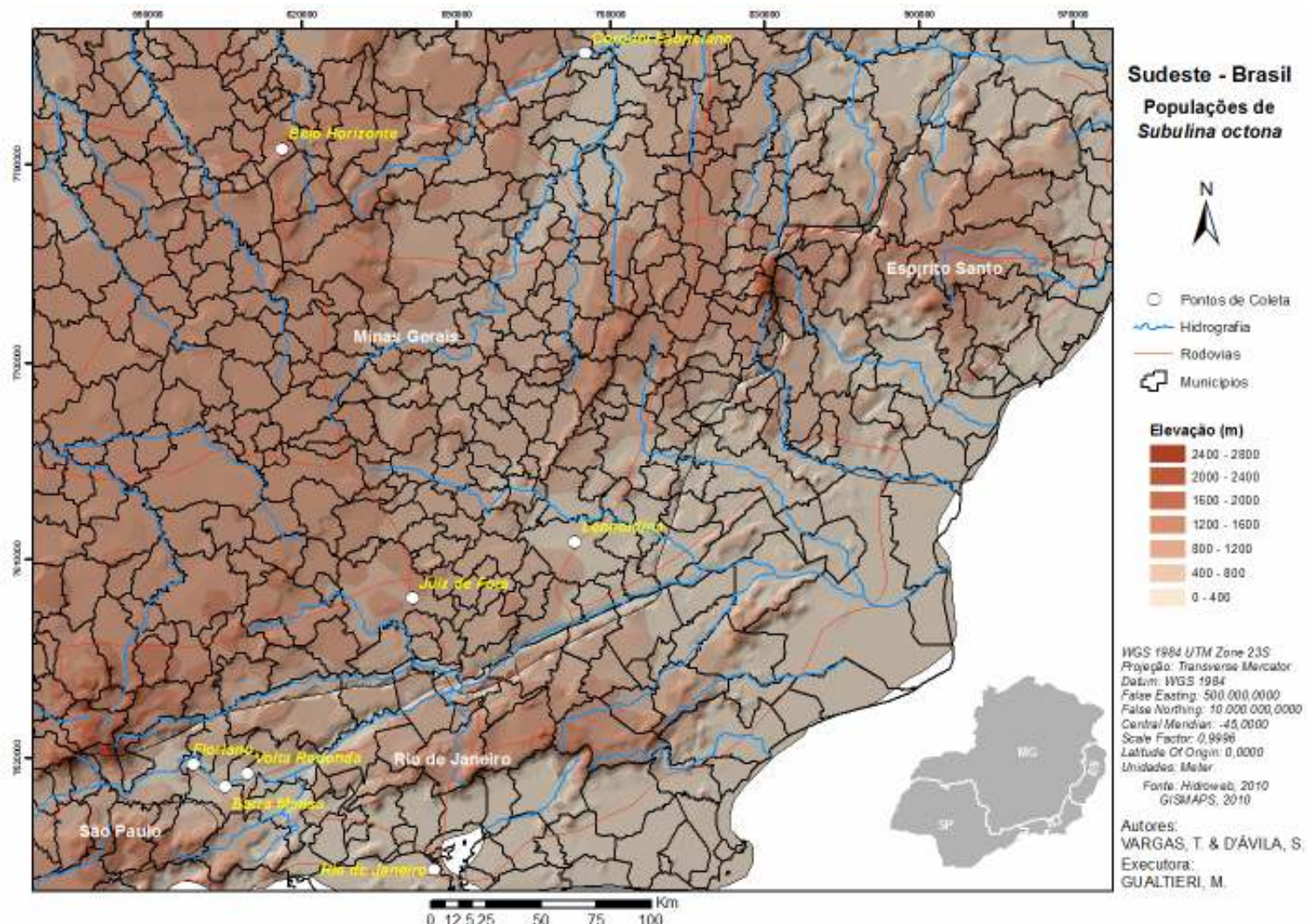
O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Moluscos do Museu de Malacologia Professor Maury Pinto de Oliveira da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. Os grupos experimentais foram formados por moluscos recém-eclodidos obtidos de criações matrizes de *S. octona* formadas a partir de moluscos coletados em oito populações (Mapa 1): Belo Horizonte (morfortipo BH) (19°55'16"S, 43°56'8"O), Coronel Fabriciano (morfortipo CF) (19°30'57"S, 42°37'39"O), Juiz de Fora (morfortipo JF) (21°31'32"S, 42°38'43"O) e Leopoldina (morfortipo LEO) (21°45'50"S, 43°21'0"O) no estado

de Minas Gerais; Barra Mansa (morfotipo BM) (22°32'38"S, 44°10'15"O) e seu distrito Floriano (morfotipo FLO) (22°27'11"S, 44°18'2"O), Volta Redonda (morfotipo VR) (22°29'14"S, 44°4'12"O) e Rio de Janeiro (morfotipo RJ) (22°52'28"S, 43°14'42"O), no estado do Rio de Janeiro.

Cada criação-matriz foi formada por moluscos provenientes da mesma localidade, mantidos em caixas plásticas transparentes (14cm de diâmetro, 9cm de altura), fechadas com tecido de algodão e elástico, contendo terra vegetal esterilizada, umedecida com 10ml de água de torneira a intervalos de dois dias. Os moluscos foram alimentados segundo Bessa & Araújo (1995) e mantidos em condições naturais de luz e temperatura. Filhotes recém-eclodidos foram transferidos para novos terrários, com as características descritas anteriormente, compondo os grupos experimentais. Os terrários de todas as populações foram mantidos nas mesmas condições de criação, evitando assim a influência dos fatores ambientais.

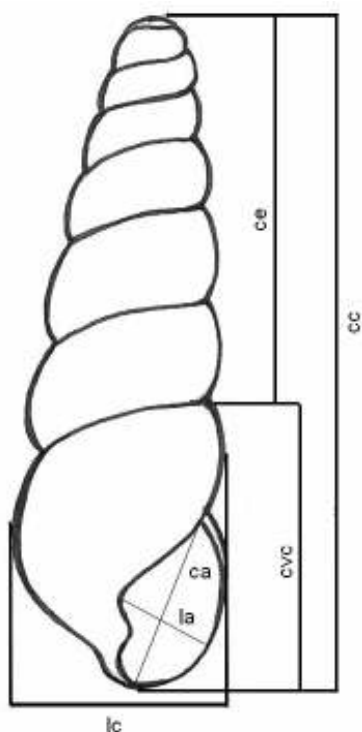
### 2.2.2. Estudo da concha

Para estudo da concha, 30 moluscos recém-eclodidos de cada localidade (escolhidos ao acaso) foram mantidos em grupos de 10 indivíduos nos terrários até atingirem 180 dias de vida. Foi observado o padrão geral da morfologia da concha dos espécimes de *S. octona* proveniente das diferentes localidades ao término de 180 dias. Em intervalos de 30 dias desde a eclosão, efetuou-se o estudo conchiliomorfológico utilizando-se um paquímetro com 0,05mm de precisão. Foram tomadas as seguintes medidas lineares (Esquema 1): comprimento total da concha (*cc*), largura máxima da concha (*lc*), comprimento da abertura (*ca*), largura da abertura (*la*), comprimento da volta corporal (*cvc*), comprimento da espira (*ce*) e número de voltas (*nv*), adaptado de Carvalho (2009). Foram calculadas ainda as seguintes razões entre as medidas:  $cc/lc$ ,  $cvc/cc$ ,  $cvc/lc$ ,  $ca/la$ ,  $la/lc$  e  $(ca \times la)/(cvc \times lc)$ .



**Mapa 1:** Locais de coleta de *Subulina octona*: Belo Horizonte, Coronel Fabriciano, Juiz de Fora e Leopoldina no estado de Minas Gerais; Barra Mansa e seu distrito Floriano, Volta Redonda e Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro.





**Esquema 1:** Medidas lineares da concha de *Subulina octona*; *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha. Ilustração: Tércia Vargas

### 2.2.3 Tratamento estatístico

Foi realizada a análise da estatística descritiva e o cálculo da taxa de crescimento da concha (comprimento em mm/dia). A fim de verificar a existência de variação morfométrica na concha das diferentes localidades foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido de teste de Student-Newman-Keuls (significância 0,05). As relações de similaridade entre os padrões morfométricos foram caracterizadas pela Análise de Conglomerados, utilizando-se o método de agregação de Ward, considerando-se a variância mínima entre os grupos e a distância Euclidiana. A análise de Função Discriminante foi utilizada para verificar se separação entre diferentes localidades. A análise de Componentes Principais foi utilizada para detectar os componentes que mais contribuíram para a variabilidade. As medidas lineares foram aplicadas à matriz de correlações. Os dados de distância geográfica foram correlacionados à morfometria pelo teste de Mantel (significância 0,05). Para realização das análises foi utilizado o *software* BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), exceto para a análise de Componentes Principais, para a qual foi utilizado o *software* Past 1.94b (HAMMER et al., 2001).

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Variabilidade intrapopulacional

*Subulina octona* apresentou uma redução na variabilidade intrapopulacional ao longo do desenvolvimento. Observou-se uma tendência à diminuição nos coeficientes de variação para todas as variáveis analisadas (Tabela 1). A exceção foi a população CF, que apresentou aumento nos coeficientes ao longo do desenvolvimento para a maioria das variáveis analisadas.

O *ce* foi a variável que apresentou maiores médias de coeficiente de variação em todas as populações ao longo do desenvolvimento, variando entre 10% na população de BH e 24% em CF. Considerando-se o coeficiente de variação médio de cada população (calculado pela média dos coeficientes de todas as variáveis em todas as idades), foram observados valores semelhantes para as populações, variando entre 6% em BH e BM e 11% em CF.

### 2.3.2 Variabilidade interpopulacional

#### 2.3.2.1 Conquiliomorfometria

Nos moluscos recém-eclodidos, a medida linear que mais variou entre as populações foi o *ca*, sendo que das 28 comparações possíveis, 11 foram significativamente diferentes, enquanto a *lc* não apresentou diferença significativa interpopulacional ( $H=11,58$ ;  $p=0,115$ ); as relações *ca/la* e *la/lc* foram diferentes em 15/28 das comparações possíveis entre populações, sendo mais robustas para diferenciar as populações que as medidas lineares (Tabela 7). Aos 180 dias de vida houve uma tendência à estabilização do crescimento da concha em *S. octona*. Nesta idade, as medidas lineares que melhor permitiram diferenciar as populações foram *lc* e *ca*, sendo que, das 28 comparações possíveis para cada variável, 21 foram significativamente diferentes. Já para as relações morfométricas, destaca-se maior importância de *cvc/cc*, com 20/28 (Tabela 7).

Na idade de 180 dias, a concha de *S. octona* das diferentes populações apresentou comprimento médio variando entre  $13,46\text{mm}\pm 0,89$  na população de BM e  $21,76\text{mm}\pm 0,70$  na população de VR. Estas populações apresentaram menor e maior número de voltas, com  $7,04\pm 0,24$  e  $9,70\pm 0,50$  voltas, respectivamente. Já nas populações intermediárias, o maior

comprimento da concha não foi acompanhado por um aumento proporcional no número de voltas da concha (Tabela 5).

As conchas com menor e maior comprimento aos 180 dias de vida foram encontradas, ambas, na população de CF, com 10,35mm e 26,40mm, respectivamente. As conchas com maior número de voltas (10,5 voltas) aos 180 dias foram encontradas nas populações de CF e VR, enquanto na mesma idade foram encontradas conchas com 6,5 voltas nas populações de BM e FLO (Tabela 5).

Pela análise do índice espiral ( $cc/lc$ ), observa-se que, quanto menor seu valor, mais abaulada a concha e quanto maior, mais alongada. As conchas da população de BM apresentaram os menores índices espirais (mais abauladas), seguidas pelo par FLO-RJ e pelo grupo composto por RJ-JF-BH-LEO-CF; por último e isoladamente, com o maior índice, a população de VR (mais alongada) (Tabela 5 e Gráfico 2).

Para todas as medidas lineares consideradas, BM foi a população que se destacou com as menores medidas ao término do experimento. Com os maiores valores observados destacasse a população de VR, com exceção para a largura da abertura, já que esta medida não sofreu influência direta do incremento no tamanho corporal (Tabela 5 e Gráfico 2).

### 2.3.2.2 Análises Multivariadas

O padrão de agrupamentos interpopulacionais variou ao longo do desenvolvimento (Gráfico 3) pela análise de conglomerados. As populações que mais formaram grupos-irmãos foram BH e JF, agrupadas aos 30, 60, 90, 150 e 180 dias; CF e LEO, agrupadas aos 60, 90, 150 e 180 dias; CF-RJ, BM-FLO e BM-VR formaram grupos-irmãos nas idades de 0 e 30, 60 e 150, 90 e 120, respectivamente. Todos os outros grupos formados apareceram em somente uma idade. Aos 180 dias de vida, VR apareceu como grupo externo a todos os outros.

A análise discriminante (Gráfico 4) mostrou que os agrupamentos formados apresentam grande sobreposição, porém observam-se aproximações entre alguns grupos populacionais, como BM e FLO, LEO e VR, sendo JF e BH intermediários entre os dois agrupamentos anteriores. A população de CF apresentou maior dispersão no gráfico, indicando ser esta a população de maior variabilidade intrapopulacional, corroborando os valores de coeficientes de variação (Tabela 1 e 2).

O Componente Principal 1 explicou mais de 80% da variabilidade da concha em quase todas as idades, com exceção de 0 e 90 dias, idade nas quais representou 79,56% e 78,32%, respectivamente (Tabela 8). Este componente foi representado pela  $lc$  na idade 0 e pelo  $cc$  dos

30 aos 180 dias. O Componente Principal 2 explicou de 4,47% a 12,04% da variabilidade da concha, sendo representado pelo *ce* na idade 30 e *la* em todas as outras idades.

O teste de Mantel para as matrizes de distância Euclidiana entre a morfologia e a distância geográfica dos locais de origem das populações não demonstrou nenhuma correlação significativa, indicando que tais parâmetros analisados não foram suficientes para explicar as diferenças entre as populações ( $r=-0,20$ ;  $p=0,31$ ).

### 2.3.2.3 Padrões de desenvolvimento

Ao longo do desenvolvimento, foram observados diferentes padrões de crescimento da concha. A análise da taxa de crescimento da concha ao longo dos 180 dias de desenvolvimento, medida pelo seu comprimento, mostrou que a variabilidade encontrada é reflexo de diferentes padrões de crescimento, que são intrínsecos a cada população.

O grupo formado pelas populações BM, FLO, BH e JF mostrou um pico inicial de crescimento seguido de declínio após 60 dias e estabilização após 90 dias; o grupo formado por CF, LEO e VR apresentou taxa de crescimento constante ao longo de todo o desenvolvimento; a população RJ teve um comportamento intermediário, com o valor da taxa de crescimento inicial situado entre os dois outros grupos, porém constante até 90 dias, seguido de uma queda e estabilização do crescimento no final do desenvolvimento (Gráfico 1). Destaca-se a população de BM, que apresentou taxa de crescimento nula a partir de 90 dias, o que explica os menores valores de comprimento da concha observados. A menor taxa média de crescimento foi observada nas populações de BM e FLO (0,07mm/dia), seguida por RJ (0,08mm/dia), BH e JF (0,09mm/dia), CF e LEO (0,10mm/dia) e VR (0,11mm/dia).

O aumento no *cc* foi acompanhado pelo aumento na *lc* em todas as populações tomando-se como base a idade de 180 dias (Tabela 5), sendo BM a população de menor *lc*, e VR a de maior. Assim como para o *cc*, o ranking entre as populações para a *lc* foi variável, com as populações ocupando posições alternadas ao longo do desenvolvimento.

No início do desenvolvimento, a razão *cc/lc* variou entre 1,20 e 1,30, indicando uma concha arredondada no recém-eclodido (Tabela 5). De maneira geral, observou-se um aumento contínuo nos valores deste índice ao longo do desenvolvimento, mostrando que o incremento no *cc* não é acompanhado por um incremento proporcional na *lc* (Tabela 5), apesar da forte correlação positiva entre estas medidas ao longo do desenvolvimento (Tabela 6). Tal observação explica a forma da concha alongada de *S. octona*.

Considerando-se o conjunto das populações, a relação entre  $cc$  e  $lc$  aumentou gradativamente ao longo do desenvolvimento. O padrão final de desenvolvimento foi diferente do inicial, sendo menor no início, com média de  $1,25 \pm 0,03$ , e maior na idade máxima estudada, com média de  $3,94 \pm 0,30$  ( $H=43,94$ ;  $p < 0,0001$ ). No entanto, essa mudança não foi perceptível em intervalos de 30 dias (0 a 30 dias:  $H=8,25$ ,  $p=0,31$ ; 30-60 dias:  $H=10,38$ ,  $p=0,20$ ; 60-90 dias:  $H=7,88$ ,  $p=0,33$ ; 90-120 dias:  $H=5,56$ ,  $p=0,50$ ; 120-150 dias:  $H=6,56$ ,  $p=0,42$ ; 150-180 dias:  $H=5,31$ ,  $p=0,51$ ).

Levando-se em conta que o comprimento da concha é composto pela volta corporal e espira, quanto maior a relação  $cvc/cc$ , maior a contribuição da volta corporal e menor a contribuição da espira na formação da concha. Dessa forma, observa-se um decréscimo nos valores de  $cvc/cc$  ao longo do desenvolvimento nas conchas de todas as populações, ou seja, o aumento no tamanho da concha passa cada vez mais explicado pelo incremento na espira (Tabela 5). Essa observação é corroborada pelo fato de as correlações entre  $ce$  e  $cc$  ( $0,98 < r < 0,99$ ) serem mais significativas que entre  $cvc$  e  $cc$  ( $0,88 < r < 0,97$ ) dos 60 aos 180 dias (Tabela 6). Ao término de 180 dias, a relação entre volta corporal e comprimento da concha oscilou entre  $0,36 \pm 0,01$  na população de VR e  $0,44 \pm 0,01$  na população de BM, mostrando que, nesta idade, a volta corporal já passa a representar menos da metade do comprimento da concha (Tabela 5).

Considerando-se o conjunto das populações para esta relação ( $cvc/cc$ ), verificou-se um decréscimo nos valores médios, indo de  $0,65 \pm 0,05$  aos 30 dias a  $0,39 \pm 0,03$  nos moluscos com 180 dias. Embora o aumento não tenha sido perceptível em pequenos intervalos de tempo (30-60 dias:  $H=10,69$ ,  $p=0,13$ ; 60-90 dias:  $H=7,44$ ,  $p=0,29$ ; 90-120 dias:  $H=6,56$ ,  $p=0,35$ ; 120-150 dias:  $H=5,25$ ,  $p=0,45$ ; 150-180 dias:  $H=5,13$ ,  $p=0,46$ ), o padrão final também foi diferente do inicial ( $H=35,06$ ;  $p < 0,0001$ ).

A volta corporal de *S. octona* varia de arredondada no início do desenvolvimento a ovalada à medida que o molusco cresce. A relação entre seu comprimento e sua largura (ou largura da concha) oscilou entre  $1,24 \pm 0,07$  (CF-30 dias) e  $1,60 \pm 0,08$  (BH-90 dias) (Tabela 5). Considerando-se o conjunto das populações, a relação morfométrica  $cvc/lc$  apresentou padrão de desenvolvimento final diferente do inicial, sendo menor aos 30 dias, com média de  $1,32 \pm 0,06$ , e maior aos 180 dias, com média de  $1,52 \pm 0,05$  ( $H=26,06$ ,  $p=0,0002$ ). No entanto, o aumento gradativo não foi perceptível em intervalos de 30 dias (30-60 dias:  $H=12,13$ ,  $p=0,08$ ; 60-90 dias:  $H=9,75$ ,  $p=0,16$ ; 90-120 dias:  $H=0,13$ ,  $p=0,99$ ; 120-150 dias:  $H=4,44$ ,  $p=0,53$ ; 150-180 dias:  $H=0,13$ ,  $p=0,99$ ).

A abertura da concha mostrou-se ovalada em todas as populações desde a eclosão até completar 180 dias de vida. A relação  $ca/la$  oscilou entre  $1,45\pm 0,11$  (LEO-60 dias) e  $1,88\pm 0,19$  (VR-60 dias) (Tabela 5). Considerando-se os valores médios do conjunto das populações, a relação  $ca/la$  não apresentou mudança de padrão ao longo do desenvolvimento, com uma média geral de  $1,64\pm 0,10$  ( $H=4,64$ ,  $p=0,59$ ), mostrando que o crescimento do molusco em comprimento não interfere no padrão de desenvolvimento da abertura da concha.

A  $la$  corresponde a aproximadamente metade da  $lc$ . Os menores valores de  $la$  foram observados em todas as populações nos recém-eclodidos, entre  $0,45\pm 0,06$  em JF e  $0,50\pm 0,03$  em CF (Tabela 5). Aos 180 dias de vida, a população com menor valor foi VR, com  $0,52\pm 0,04$ , e a de maior valor foi RJ, com  $0,58\pm 0,04$ .

Considerando-se o conjunto das populações, verificou-se um aumento nos valores médios de  $la/lc$  no primeiro intervalo de 30 dias, indo de  $0,47$  a  $0,55$ . Após este intervalo, o aumento verificado foi gradativo e não perceptível em pequenos intervalos de tempo (0 a 30 dias:  $H=29,44$ ,  $p=0,0003$ ; 30-60 dias:  $H=6,06$ ,  $p=0,46$ ; 60-90 dias:  $H=0,13$ ,  $p=0,99$ ; 90-120 dias:  $H=3,50$ ,  $p=0,67$ ; 120-150 dias:  $H=9,06$ ,  $p=0,27$ ; 150-180 dias:  $H=8,31$ ,  $p=0,31$ ), porém culminando em um molusco adulto ( $0,56\pm 0,02$ ) com concha diferente daquela do juvenil ( $0,47\pm 0,02$ ) ( $H=37,38$ ,  $p<0,0001$ ).

A área da abertura da concha corresponde a aproximadamente  $1/3$  da área da volta corporal (no plano bidimensional). Para a relação  $(ca \times la)/(cvc \times lc)$ , no conjunto das populações, foi verificado um decréscimo gradativo nos valores médios, não perceptível em intervalos de 30 dias (30-60 dias:  $H=10,63$ ,  $p=0,13$ ; 60-90 dias:  $H=4,19$ ,  $p=0,55$ ; 90-120 dias:  $H=2,25$ ,  $p=0,75$ ; 120-150 dias:  $H=12,88$ ,  $p=0,07$ ; 150-180 dias:  $H=8,25$ ,  $p=0,24$ ), indo de  $0,36\pm 0,03$  aos 30 dias a  $0,28\pm 0,00$  no molusco com 180 dias, padrões significativamente diferentes ( $H=33,69$ ,  $p<0,0001$ ). Tal observação indica uma menor abertura proporcionalmente à última volta da concha do molusco.

Todas as medidas lineares se correlacionaram positivamente em todas as idades (Tabela 6). No início do desenvolvimento, a maior correlação observada foi entre o comprimento da abertura e a largura da concha, com  $r=0,99$ . Aos 30 dias, a correlação observada entre  $cvc$  e  $ca$  foi a de maior destaque, com  $r=0,98$ . A partir de 60 dias, observou-se forte correlação entre  $cc$  e  $ce$ , variando entre  $0,98$  e  $0,99$ .

### 2.3.3 Polimorfismo da coloração corporal

Foi observado um polimorfismo para a coloração da massa cefalopodal de *S. octona*, com dois morfotipos, verde e creme, variando entre e dentro das populações. Do total dos moluscos que compuseram os experimentos, observou-se que, aos 180 dias de vida, havia 32% de indivíduos de coloração esverdeada e 68% de coloração creme compondo os grupos (Fotografia 1). Analisando cada população separadamente observou-se que BH e JF são compostas somente por indivíduos de fenótipo verde, que BM, FLO e VR são compostas somente pelo fenótipo creme e que CF, LEO e RJ são compostas por ambos os fenótipos. Nas populações compostas por ambos os fenótipos, os coeficientes de variação foram maiores que naquelas compostas por um único fenótipo considerando-se a maior parte das variáveis analisadas (Tabela 2).

O teste de Kruskal-Wallis mostrou que, agrupando-se todos os moluscos de cada fenótipo, somente as relações  $ca/la$ ,  $la/lc$  e  $(ca \times la)/(cvc \times lc)$  não diferiram entre os grupos (Tabela 3). Todas as variáveis que diferiram entre os fenótipos foram maiores nos moluscos verdes, com exceção da relação  $cvc/cc$ , que foi menor, o que era esperado para este índice. A concha dos moluscos esverdeados apresentou-se mais alongada, com índice espiral médio de  $4,11 \pm 0,29$ , contra  $3,75 \pm 0,47$  dos moluscos de cor creme, mais abaulados (Fotografia 2). Quando o polimorfismo foi analisado separadamente para cada população, somente foi observada diferença entre os fenótipos da população CF, que apresentou diferença em todas as medidas lineares, além do índice espiral e da relação  $cvc/cc$  (Tabela 4).

**Tabela 1:** Coeficiente de variação (%) das medidas lineares e relações conquiliomorfológicas de oito populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento.

<b>Belo Horizonte-MG</b>								
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Média
cc	10	8	7	8	8	6	6	8
lc	8	6	4	4	4	3	3	4
ca	9	8	6	5	4	4	4	6
la	11	9	5	7	5	6	5	7
cvc	-	7	6	5	4	4	5	5
ce	-	11	10	11	12	9	7	10
ca/lc	6	5	5	6	6	4	4	5
cvc/cc	-	3	5	6	5	5	4	4
cvc/lc	-	5	5	5	2	3	4	4
ca/la	9	10	6	9	6	5	5	7
la/lc	8	7	5	7	4	4	4	6
(ca x la)/(cvc x lc)	-	8	8	7	5	6	7	7
Mínimo	6	3	4	4	2	3	3	Média Geral
Máximo	11	11	10	11	12	9	7	6
<b>Barra Mansa-RJ</b>								
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Média
cc	15	17	8	6	6	7	7	9
lc	7	10	4	4	3	4	4	5
ca	11	11	5	6	4	4	9	7
la	9	11	5	4	2	4	3	6
cvc	-	14	5	4	4	6	6	7
ce	-	21	12	9	8	8	8	11
ca/lc	12	9	6	5	4	4	4	6
cvc/cc	-	5	6	4	3	2	3	4
cvc/lc	-	6	5	3	3	4	4	4
ca/la	8	8	4	6	4	5	8	6
la/lc	7	7	4	4	3	4	3	5
(ca x la)/(cvc x lc)	-	10	5	8	5	5	9	7
Mínimo	7	5	4	3	2	2	3	Média Geral
Máximo	15	21	12	9	8	8	9	6
<b>Coronel Fabriciano-MG</b>								
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Média
cc	9	18	11	12	20	22	23	17
lc	8	11	8	8	12	12	13	10
ca	7	13	9	8	12	15	14	11
la	10	13	8	9	13	10	14	11
cvc	-	13	9	9	17	15	16	13
ce	-	30	16	17	25	27	28	24
ca/lc	8	8	6	8	10	11	12	9
cvc/cc	-	7	5	6	8	8	9	7
cvc/lc	-	6	6	6	9	6	7	7
ca/la	6	8	6	6	6	8	6	7
la/lc	7	8	5	6	6	6	6	6
(ca x la)/(cvc x lc)	-	9	8	9	14	6	6	9
Mínimo	6	6	5	6	6	6	6	Média Geral
Máximo	10	30	16	17	25	27	28	11
<b>Florianópolis-RJ</b>								
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Média
cc	15	11	7	6	5	5	4	8
lc	13	8	3	4	3	3	3	5
ca	12	8	5	4	4	3	4	6
la	20	11	6	6	5	4	5	8
cvc	-	9	4	4	3	3	4	5
ce	-	17	12	9	8	8	7	10
ca/lc	8	6	6	4	4	4	4	5
cvc/cc	-	4	6	5	5	4	5	5
cvc/lc	-	5	4	4	3	3	5	4
ca/la	15	11	8	6	6	5	6	8
la/lc	12	11	7	6	5	4	5	7
(ca x la)/(cvc x lc)	-	14	7	6	7	5	6	7
Mínimo	8	4	3	4	3	3	3	Média Geral
Máximo	20	17	12	9	8	8	7	7



Tabela 1 (continuação)

Juiz de Fora-MG								
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Média
<i>cc</i>	14	11	7	5	5	5	4	7
<i>lc</i>	11	7	4	4	4	3	3	5
<i>ca</i>	12	6	8	7	3	3	3	6
<i>la</i>	20	13	7	8	6	5	5	9
<i>cvc</i>	-	6	7	4	4	3	3	4
<i>ce</i>	-	23	9	7	7	7	6	10
<i>ccAc</i>	7	10	5	4	4	4	4	5
<i>cvc/cc</i>	-	6	4	4	4	4	3	4
<i>cvcAc</i>	-	5	4	4	3	2	3	4
<i>caAa</i>	13	13	7	8	4	5	6	8
<i>la/lc</i>	14	12	6	8	5	6	6	8
<i>(ca x la)/(cvc x lc)</i>	-	15	9	12	8	6	6	9
Mínimo	7	5	4	4	3	2	3	Média Geral
Máximo	20	23	9	12	8	7	6	7
Leopoldina-MG								
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Média
<i>cc</i>	12	21	16	18	14	8	13	14
<i>lc</i>	7	15	12	10	9	7	6	9
<i>ca</i>	9	15	11	9	10	5	6	9
<i>la</i>	11	16	13	9	15	7	8	11
<i>cvc</i>	-	15	12	12	9	6	8	10
<i>ce</i>	-	39	25	24	18	11	16	22
<i>ccAc</i>	8	11	7	9	8	4	8	8
<i>cvc/cc</i>	-	10	8	6	5	5	6	7
<i>cvcAc</i>	-	5	8	5	4	5	5	5
<i>caAa</i>	7	7	8	5	11	6	5	7
<i>la/lc</i>	7	7	8	6	11	4	4	7
<i>(ca x la)/(cvc x lc)</i>	-	8	9	8	12	6	7	8
Mínimo	7	5	7	5	4	4	4	Média Geral
Máximo	12	39	25	24	18	11	16	10
Rio de Janeiro-RJ								
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Média
<i>cc</i>	16	19	16	14	16	16	15	16
<i>lc</i>	8	12	8	7	7	6	6	8
<i>ca</i>	9	15	8	9	8	7	7	9
<i>la</i>	9	16	10	7	8	8	7	9
<i>cvc</i>	-	14	9	8	9	9	9	10
<i>ce</i>	-	29	24	18	21	20	19	22
<i>ccAc</i>	11	11	12	12	15	15	14	13
<i>cvc/cc</i>	-	8	8	7	8	8	7	8
<i>cvcAc</i>	-	7	6	8	8	9	9	8
<i>caAa</i>	5	8	5	8	7	5	8	6
<i>la/lc</i>	6	8	5	6	5	6	6	6
<i>(ca x la)/(cvc x lc)</i>	-	11	8	7	7	7	6	8
Mínimo	5	7	5	6	5	5	6	Média Geral
Máximo	16	29	24	18	21	20	19	10
Volta Redonda-RJ								
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias	Média
<i>cc</i>	12	11	17	9	9	5	3	9
<i>lc</i>	6	8	13	4	4	4	3	6
<i>ca</i>	9	8	11	6	5	4	3	7
<i>la</i>	8	8	13	6	4	6	6	7
<i>cvc</i>	-	9	17	7	5	4	3	8
<i>ce</i>	-	21	20	13	12	7	4	13
<i>ccAc</i>	8	6	7	7	6	6	4	6
<i>cvc/cc</i>	-	6	7	6	5	4	4	5
<i>cvcAc</i>	-	6	9	6	4	5	5	6
<i>caAa</i>	6	8	10	6	5	7	7	7
<i>la/lc</i>	6	9	10	4	4	6	7	7
<i>(ca x la)/(cvc x lc)</i>	-	11	20	7	6	8	9	10
Mínimo	6	6	7	4	4	4	3	Média Geral
Máximo	12	21	20	13	12	8	9	8

**Legenda:** *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha.

**Tabela 2:** Coeficiente de variação (%) para as medidas lineares e relações conquiliomorfológicas e distribuição dos fenótipos de coloração da massa cefalopodal dentro de oito populações de *Subulina octona* na idade de 180 dias.

Fenótipo		Medidas lineares					
População	%Verde / %Creme	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
BH	100 / 0	5,53	3,09	4,06	5,08	4,80	6,97
BM	0 / 100	6,59	4,35	9,15	2,81	5,50	8,20
CF	33 / 67	23,23	12,81	14,36	13,84	16,04	27,59
FLO	0 / 100	4,44	3,30	4,03	4,78	4,08	7,09
JF	100 / 0	4,00	2,52	2,86	5,39	2,88	5,63
LEO	73 / 27	12,64	6,08	6,36	7,54	7,76	15,74
RJ	8 / 92	15,49	5,52	7,44	7,40	9,28	19,47
VR	0 / 100	3,22	2,66	3,27	6,03	3,44	4,43

Medidas lineares							
População	<i>nv</i>	<i>cc/lc</i>	<i>cvc/cc</i>	<i>cvc/lc</i>	<i>ca/la</i>	<i>la/lc</i>	$(ca \times la) / cvc/lc$
BH	5,10	4,08	3,81	3,63	4,82	4,07	6,53
BM	3,37	4,38	3,38	3,92	8,38	3,37	8,67
CF	11,58	12,13	9,32	7,10	6,12	5,79	6,15
FLO	4,75	3,50	4,73	4,92	5,68	5,01	5,92
JF	3,23	4,13	3,22	2,52	6,26	6,17	6,44
LEO	8,01	7,97	5,55	4,71	4,94	4,46	6,55
RJ	9,93	14,10	7,36	8,63	7,82	6,19	6,47
VR	5,13	4,12	3,70	4,56	6,64	7,28	8,62

**Legenda:** *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha, *nv* – número de voltas da concha.

**Tabela 3:** Estatística descritiva das medidas lineares e relações conquiliomorfológicas de *Subulina octona* aos 180 dias de vida para os fenótipos verde e creme de coloração da massa cefalopodal.

Fenótipo VERDE						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>lc</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
Tamanho médio (mm) ± desvio padrão (mínimo - máximo)	19,28±2,52 a (15,55-26,40)	4,68±0,38 a (3,90-5,60)	4,27±0,32 a (3,60-5,10)	2,64±0,26 a (2,20-3,30)	7,31±0,57 a (6,00-8,70)	11,97±2,02 a (9,10-17,90)
Coefficiente de Variação	13%	8%	8%	10%	8%	17%
% de indivíduos	32%					
	<i>cc/lc</i>	<i>cvc/cc</i>	<i>cvc/lc</i>	<i>ca/la</i>	<i>la/lc</i>	<i>(ca x la)/(cvc x lc)</i>
Tamanho médio (mm) ± desvio padrão (mínimo - máximo)	4,11±0,29 a (3,40-5,00)	0,38±0,02 a (0,32-0,42)	1,56±0,06 a (1,33-1,71)	1,62±0,09 a (1,45-1,93)	0,56±0,03 a (0,48-0,64)	0,33±0,02 a (0,28-0,38)
Coefficiente de Variação	7%	6%	4%	6%	5%	10%
Fenótipo CREME						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>lc</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
Tamanho médio (mm) ± desvio padrão (mínimo - máximo)	16,43±3,44 b (9,90-24,35)	4,34±0,43 b (3,45-5,40)	3,87±0,50 b (2,10-4,90)	2,40±0,20 b (1,85-2,95)	6,45±0,83 b (4,60-8,40)	9,98±2,68 b (5,05-15,95)
Coefficiente de Variação	21%	10%	13%	9%	13%	27%
% de indivíduos	68%					
	<i>cc/lc</i>	<i>cvc/cc</i>	<i>cvc/lc</i>	<i>ca/la</i>	<i>la/lc</i>	<i>(ca x la)/(cvc x lc)</i>
Tamanho médio (mm) ± desvio padrão (mínimo - máximo)	3,75±0,47 b (2,87-5,08)	0,40±0,04 b (0,32-0,49)	1,48±0,09 b (1,23-1,68)	1,61±0,14 a (1,00-2,09)	0,56±0,03 a (0,45-0,64)	0,33±0,03 a (0,21-0,41)
Coefficiente de Variação	12%	10%	6%	9%	6%	12%

**Legenda:** *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha, *nv* – número de voltas da concha. \*Para cada variável analisada, médias seguidas de letras desiguais diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4:** Valores médios das medidas lineares e relações morfométricas da concha de *Subulina octona* de três populações (Coronel Fabriciano, Leopoldina e Rio de Janeiro) aos 180 dias de vida.

População (fenótipo)	N (%)	Medidas lineares e relações morfométricas												
		<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>	<i>nv</i>	<i>cc/lc</i>	<i>cvc/cc</i>	<i>cvc/lc</i>	<i>ca/la</i>	<i>la/lc</i>	$(ca \times la) / (cvc \times lc)$
CF (verde)	33	23,03a	5,16a	4,71a	2,95a	7,94a	15,08a	9,69a	4,45a	0,35a	1,54a	1,60a	0,57a	0,34a
CF (creme)	67	17,50b	4,43b	3,96b	2,43b	6,50b	11,00b	8,66b	3,91b	0,38b	1,46a	1,62a	0,55a	0,34a
LEO (verde)	73	20,93a	20,93a	5,07a	4,50a	2,86a	7,73a	13,20a	8,88a	4,12a	0,37a	1,53a	1,58a	0,56a
LEO (creme)	27	18,73a	18,73b	4,73a	4,36a	2,68a	7,30a	11,43a	8,50a	3,95a	0,39a	1,54a	1,63a	0,57a
RJ (verde)	8	18,90a	4,18a	3,95a	2,60a	6,65a	12,25a	9,25a	4,49a	0,36a	1,59a	1,52a	0,62a	0,37a
RJ (creme)	92	16,90a	4,31a	3,77a	2,49a	6,15a	10,75a	8,42a	3,92a	0,37a	1,43a	1,52a	0,58a	0,36a

**Legenda:** *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha, *nv* – número de voltas da concha; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ.

**Tabela 5:** Valores médios em milímetros e desvio padrão das medidas lineares e relações morfométricas da concha de oito populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento.

	<i>cc</i>						
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
<b>BH</b>	1,85±0,19 abc	7,45±0,59 cd	14,32±1,01 de	15,80±1,25 ef	16,13±1,30 c	17,41±1,13 de	17,80±0,98 c
<b>BM</b>	1,75±0,26 a	7,66±1,28 d	12,57±1,04 c	13,39±0,83 c	13,41±0,83 a	13,45±0,89 a	13,46±0,89 a
<b>CF</b>	1,93±0,18 bc	4,46±0,83 a	6,92±0,78 a	9,57±1,19 a	11,92±2,44 a	15,86±3,48 bc	19,34±4,49 cd
<b>FLO</b>	2,00±0,30 c	6,91±0,77 c	13,10±0,93 cd	13,96±0,77 cd	14,98±0,80 b	15,02±0,79 b	15,20±0,68 b
<b>JF</b>	1,87±0,26 abc	7,82±0,85 d	15,29±1,14 e	16,90±0,86 f	18,13±0,87 d	18,24±0,84 e	18,47±0,74 c
<b>LEO</b>	1,81±0,22 ab	3,84±0,79 a	7,35±1,20 a	10,74±1,89 ab	14,92±2,14 b	17,90±1,45 de	20,33±2,57 de
<b>RJ</b>	1,95±0,31 bc	5,71±1,08 b	10,23±1,67 b	15,00±2,07 de	16,29±2,63 c	16,69±2,66 cd	17,06±2,64 c
<b>VR</b>	1,86±0,22 abc	3,62±0,41 a	6,92±1,21 a	11,53±1,05 b	15,18±1,31 bc	18,78±1,00 e	21,76±0,70 e

Tabela 5 (continuação)

<i>lc</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	1,49±0,11 a	3,55±0,20 d	4,30±0,16 d	4,17±0,15 e	4,26±0,16 bc	4,40±0,15 c	4,36±0,14 c
<b>BM</b>	1,45±0,10 a	3,19±0,33 c	3,87±0,16 c	4,03±0,15 de	3,98±0,13 a	4,00±0,15 a	4,03±0,18 a
<b>CF</b>	1,51±0,12 a	2,29±0,26 ab	2,95±0,23 a	3,53±0,29 a	3,81±0,44 a	4,29±0,52 bc	4,67±0,60 d
<b>FLO</b>	1,57±0,20 a	3,25±0,27 c	3,95±0,12 c	3,97±0,14 cd	4,16±0,11 b	4,15±0,13 ab	4,13±0,14 ab
<b>JF</b>	1,52±0,17 a	3,70±0,26 d	4,52±0,20 d	4,53±0,19 f	4,69±0,17 d	4,66±0,14 d	4,64±0,12 d
<b>LEO</b>	1,49±0,10 a	2,12±0,32 a	3,19±0,37 a	3,87±0,41 bc	4,39±0,38 c	4,73±0,32 d	4,98±0,30 e
<b>RJ</b>	1,49±0,12 a	2,63±0,31 b	3,59±0,28 b	4,12±0,30 de	4,26±0,28 bc	4,24±0,26 bc	4,30±0,24 bc
<b>VR</b>	1,49±0,09 a	2,02±0,17 a	2,83±0,37 a	3,76±0,15 ab	4,30±0,17 bc	4,65±0,18 d	5,02±0,13 e
<i>ca</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	1,18±0,11 bc	3,02±0,24 cd	3,57±0,21 c	3,64±0,18 c	3,83±0,14 de	3,94±0,17 cd	4,04±0,16 c
<b>BM</b>	1,10±0,12 a	2,85±0,32 c	3,55±0,16 c	3,58±0,22 c	3,59±0,16 b	3,58±0,14 a	3,49±0,32 a
<b>CF</b>	1,20±0,08 bcd	1,92±0,26 ab	2,49±0,21 a	2,95±0,24 a	3,24±0,40 a	3,76±0,56 bc	4,21±0,60 c
<b>FLO</b>	1,26±0,15 d	2,98±0,24 cd	3,60±0,18 c	3,58±0,15 c	3,79±0,15 cd	3,76±0,12 bc	3,78±0,15 b
<b>JF</b>	1,22±0,14 cd	3,15±0,19 d	3,88±0,33 c	4,00±0,29 d	4,21±0,14 f	4,20±0,11 ef	4,24±0,12 cd
<b>LEO</b>	1,16±0,10 ab	1,81±0,28 a	2,71±0,30 a	3,34±0,31 b	3,80±0,36 cd	4,17±0,19 de	4,46±0,28 de
<b>RJ</b>	1,15±0,10 ab	2,16±0,32 b	3,06±0,25 b	3,50±0,31 bc	3,65±0,28 bc	3,67±0,26 ab	3,78±0,28 b
<b>VR</b>	1,16±0,10 bc	1,75±0,15 a	2,47±0,27 a	3,50±0,20 bc	3,95±0,20 e	4,46±0,19 f	4,64±0,15 e

Tabela 5 (continuação)

<i>la</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	0,71±0,08 a	1,85±0,16 c	2,09±0,10 c	2,08±0,15 bc	2,23±0,12 b	2,41±0,15 cd	2,44±0,12 b
<b>BM</b>	0,70±0,06 a	1,78±0,20 c	2,10±0,10 c	2,08±0,08 bc	2,11±0,05 a	2,11±0,09 a	2,23±0,06 a
<b>CF</b>	0,75±0,08 b	1,26±0,16 a	1,63±0,13 a	1,96±0,18 a	2,11±0,28 ab	2,35±0,23 c	2,61±0,36 bc
<b>FLO</b>	0,73±0,15 a	1,71±0,19 c	2,13±0,14 c	2,02±0,11 ab	2,15±0,10 ab	2,21±0,09 b	2,32±0,11 a
<b>JF</b>	0,69±0,14 a	1,86±0,25 c	2,30±0,15 d	2,31±0,17 d	2,41±0,14 c	2,48±0,12 de	2,62±0,14 c
<b>LEO</b>	0,68±0,07 a	1,20±0,20 a	1,89±0,25 b	2,23±0,20 d	2,33±0,34 c	2,66±0,18 e	2,81±0,21 c
<b>RJ</b>	0,72±0,07 ab	1,47±0,24 b	2,03±0,19 bc	2,22±0,16 d	2,36±0,18 c	2,43±0,20 cd	2,50±0,19 bc
<b>VR</b>	0,69±0,06 a	1,19±0,10 a	1,33±0,17 a	2,11±0,13 c	2,32±0,09 c	2,57±0,15 e	2,61±0,16 bc
<i>cvc</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	-	4,74±0,34 cd	6,26±0,35 cd	6,66±0,36 e	6,71±0,26 e	6,92±0,27 c	6,93±0,33 c
<b>BM</b>	-	4,37±0,63 c	5,85±0,31 c	5,98±0,23 cd	6,06±0,26 bc	6,00±0,35 a	5,93±0,33 a
<b>CF</b>	-	2,85±0,37 ab	4,01±0,37 a	4,84±0,42 a	5,30±0,88 a	6,31±0,97 ab	6,98±1,12 c
<b>FLO</b>	-	4,55±0,43 c	6,17±0,24 cd	6,28±0,24 d	6,44±0,22 d	6,44±0,20 b	6,35±0,26 b
<b>JF</b>	-	5,04±0,33 d	6,77±0,45 d	7,11±0,26 e	7,25±0,25 f	7,33±0,20 d	7,28±0,21 cd
<b>LEO</b>	-	2,70±0,41 a	4,29±0,53 a	5,46±0,64 b	6,34±0,59 cd	7,13±0,39 cd	7,61±0,59 d
<b>RJ</b>	-	3,42±0,48 b	4,99±0,46 b	5,74±0,44 bc	5,96±0,54 b	6,09±0,54 ab	6,19±0,57 ab
<b>VR</b>	-	2,53±0,22 a	3,65±0,63 a	5,60±0,37 b	6,54±0,34 de	7,30±0,30 cd	7,77±0,27 d

Tabela 5 (continuação)

<i>ce</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	-	2,71±0,29 bc	8,06±0,79 d	9,14±1,01 d	9,42±1,09 cd	10,49±0,95 c	10,87±0,76 c
<b>BM</b>	-	3,28±0,67 d	6,72±0,83 c	7,41±0,67 c	7,35±0,60 a	7,45±0,58 a	7,52±0,62 a
<b>CF</b>	-	1,62±0,49 a	2,90±0,46 a	4,73±0,82 a	6,62±1,63 a	9,55±2,54 b	12,36±3,41 cd
<b>FLO</b>	-	2,36±0,40 bc	6,93±0,80 c	7,69±0,67 c	8,53±0,72 b	8,58±0,69 b	8,85±0,63 b
<b>JF</b>	-	2,77±0,63 c	8,52±0,80 d	9,79±0,73 d	10,89±0,74 e	10,91±0,75 c	11,20±0,63 cd
<b>LEO</b>	-	1,14±0,45 a	3,06±0,77 a	5,29±1,28 ab	8,58±1,57 b	10,77±1,14 c	12,72±2,00 de
<b>RJ</b>	-	2,30±0,66 b	5,24±1,25 b	9,25±1,70 d	10,34±2,15 de	10,60±2,16 c	10,87±2,12 c
<b>VR</b>	-	1,08±0,23 a	3,27±0,64 a	5,93±0,78 b	8,64±1,04 bc	11,48±0,80 c	14,00±0,62 e
<i>nv</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	-	5,10±0,25	7,14±0,27	7,29±0,36	7,50±0,50	7,90±0,35	8,00±0,41
<b>BM</b>	-	4,59±0,64	6,56±0,45	6,91±0,28	6,85±0,30	6,94±0,38	7,04±0,24
<b>CF</b>	-	3,21±0,47	4,63±0,40	5,79±0,35	6,61±0,76	7,98±0,87	9,00±1,04
<b>FLO</b>	-	4,76±0,41	6,66±0,45	6,68±0,34	7,11±0,34	7,13±0,32	7,14±0,34
<b>JF</b>	-	4,95±0,25	7,04±0,34	7,35±0,37	7,87±0,33	7,87±0,38	7,96±0,26
<b>LEO</b>	-	2,75±0,54	4,50±0,55	5,91±0,64	7,28±0,76	8,20±0,39	8,77±0,70
<b>RJ</b>	-	4,06±0,64	5,98±0,69	7,74±0,68	8,25±0,84	8,37±0,81	8,48±0,84
<b>VR</b>	-	2,76±0,35	4,27±0,65	6,41±0,45	7,70±0,52	8,68±0,46	9,70±0,50

Tabela 5 (continuação)

<i>cc/lc</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	1,24±0,08 abc	2,10±0,10 c	3,33±0,16 c	3,79±0,24 d	3,78±0,22 e	3,96±0,17 de	4,08±0,17 c
<b>BM</b>	1,20±0,14 a	2,38±0,21 d	3,25±0,21 c	3,32±0,15 c	3,37±0,14 b	3,36±0,15 a	3,34±0,15 a
<b>CF</b>	1,28±0,10 cd	1,94±0,16 b	2,34±0,13 a	2,70±0,21 a	3,10±0,32 a	3,66±0,41 bc	4,09±0,50 c
<b>FLO</b>	1,27±0,11 bcd	2,12±0,12 c	3,31±0,19 c	3,52±0,14 d	3,60±0,15 d	3,62±0,14 b	3,69±0,13 b
<b>JF</b>	1,23±0,09 abc	2,12±0,21 c	3,38±0,16 c	3,73±0,15 d	3,86±0,16 e	3,91±0,16 de	3,98±0,16 c
<b>LEO</b>	1,21±0,09 ab	1,80±0,19 ab	2,30±0,16 a	2,76±0,24 a	3,39±0,26 bc	3,78±0,16 cd	4,08±0,33 c
<b>RJ</b>	1,30±0,14 d	2,16±0,23 c	2,84±0,35 b	3,64±0,46 d	3,82±0,58 e	3,94±0,59 d	3,96±0,56 bc
<b>VR</b>	1,25±0,10 ab	1,79±0,10 a	2,43±0,18 a	3,06±0,21 b	3,53±0,21 cd	4,04±0,22 e	4,34±0,18 d
<i>cvc/cc</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	-	0,64±0,02 bc	0,44±0,02 a	0,42±0,02 b	0,42±0,02 bc	0,40±0,02 b	0,39±0,01 c
<b>BM</b>	-	0,57±0,03 a	0,47±0,03 b	0,45±0,02 c	0,45±0,01 f	0,45±0,01 d	0,44±0,01 e
<b>CF</b>	-	0,64±0,05 c	0,58±0,03 d	0,51±0,03 d	0,45±0,03 ef	0,40±0,03 b	0,37±0,04 ab
<b>FLO</b>	-	0,66±0,03 c	0,47±0,03 b	0,45±0,02 c	0,43±0,02 cd	0,43±0,02 c	0,42±0,02 d
<b>JF</b>	-	0,65±0,04 c	0,44±0,02 a	0,42±0,02 ab	0,40±0,02 ab	0,40±0,02 b	0,39±0,01 c
<b>LEO</b>	-	0,71±0,07 d	0,59±0,05 d	0,51±0,03 d	0,43±0,02 cd	0,40±0,02 b	0,38±0,02 bc
<b>RJ</b>	-	0,60±0,05 b	0,49±0,04 b	0,39±0,03 a	0,37±0,03 a	0,37±0,03 a	0,37±0,03 ab
<b>VR</b>	-	0,70±0,04 d	0,53±0,04 c	0,49±0,03 d	0,43±0,02 de	0,39±0,01 ab	0,36±0,01 a



Tabela 5 (continuação)

<i>cvc/lc</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	-	1,34±0,06 cd	1,46±0,07 d	1,60±0,08 c	1,58±0,03 c	1,57±0,05 c	1,59±0,06 e
<b>BM</b>	-	1,37±0,09 de	1,51±0,07 de	1,48±0,05 b	1,52±0,04 b	1,50±0,06 a	1,47±0,06 ab
<b>CF</b>	-	1,24±0,07 a	1,36±0,08 bc	1,37±0,08 a	1,38±0,13 a	1,47±0,09 a	1,49±0,11 abc
<b>FLO</b>	-	1,40±0,07 e	1,56±0,06 e	1,58±0,07 c	1,55±0,05 bc	1,55±0,05 bc	1,54±0,08 cde
<b>JF</b>	-	1,37±0,07 de	1,50±0,06 de	1,57±0,06 c	1,54±0,05 bc	1,57±0,04 c	1,57±0,04 de
<b>LEO</b>	-	1,27±0,07 ab	1,35±0,11 ab	1,41±0,07 a	1,44±0,06 a	1,51±0,07 ab	1,53±0,07 bcd
<b>RJ</b>	-	1,30±0,10 bc	1,39±0,08 c	1,40±0,11 a	1,40±0,11 a	1,44±0,13 a	1,44±0,12 a
<b>VR</b>	-	1,26±0,08 a	1,28±0,12 a	1,49±0,08 b	1,52±0,06 b	1,57±0,08 c	1,55±0,07 de
<i>ca/la</i>							
	<b>0 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>	<b>90 dias</b>	<b>120 dias</b>	<b>150 dias</b>	<b>180 dias</b>
<b>BH</b>	1,66±0,14 b	1,64±0,16 cd	1,71±0,11 b	1,76±0,15 d	1,72±0,10 c	1,64±0,08 cd	1,66±0,08 c
<b>BM</b>	1,58±0,13 a	1,61±0,13 bc	1,69±0,07 b	1,72±0,11 cd	1,70±0,07 c	1,70±0,08 e	1,56±0,13 ab
<b>CF</b>	1,60±0,09 ab	1,52±0,12 ab	1,53±0,09 a	1,51±0,09 ab	1,53±0,09 a	1,59±0,13 bc	1,62±0,10 bc
<b>FLO</b>	1,77±0,27 c	1,76±0,20 d	1,70±0,13 b	1,77±0,11 d	1,76±0,10 c	1,71±0,08 e	1,63±0,09 bc
<b>JF</b>	1,80±0,23 c	1,71±0,22 cd	1,69±0,12 b	1,73±0,15 cd	1,75±0,08 c	1,69±0,09 de	1,62±0,10 bc
<b>LEO</b>	1,71±0,12 c	1,51±0,10 a	1,45±0,11 a	1,50±0,08 a	1,65±0,18 b	1,57±0,09 ab	1,59±0,08 b
<b>RJ</b>	1,60±0,07 ab	1,48±0,12 a	1,51±0,07 a	1,58±0,12 b	1,55±0,11 a	1,52±0,08 a	1,52±0,12 a
<b>VR</b>	1,70±0,10 c	1,48±0,12 a	1,88±0,19 c	1,66±0,10 c	1,70±0,09 c	1,74±0,12 e	1,79±0,12 d

Tabela 5 (continuação)

<i>la/lc</i>							
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
<b>BH</b>	0,48±0,04 b	0,52±0,04 a	0,49±0,02 ab	0,50±0,04 a	0,52±0,02 a	0,55±0,02 bc	0,56±0,02 b
<b>BM</b>	0,48±0,03 bc	0,56±0,04 cd	0,54±0,02 c	0,52±0,02 a	0,53±0,02 ab	0,53±0,02 a	0,55±0,02 b
<b>CF</b>	0,50±0,03 c	0,55±0,04 bc	0,55±0,03 cd	0,56±0,03 bc	0,55±0,03 c	0,55±0,03 c	0,56±0,03 b
<b>FLO</b>	0,46±0,05 a	0,53±0,06 ab	0,54±0,04 c	0,51±0,03 a	0,52±0,03 a	0,53±0,02 a	0,56±0,03 b
<b>JF</b>	0,45±0,06 a	0,50±0,06 a	0,51±0,03 b	0,51±0,04 a	0,51±0,03 a	0,53±0,03 ab	0,57±0,03 bc
<b>LEO</b>	0,46±0,03 a	0,56±0,04 cd	0,59±0,05 e	0,58±0,03 c	0,53±0,06 bc	0,56±0,02 cd	0,57±0,03 bc
<b>RJ</b>	0,48±0,03 bc	0,56±0,04 cd	0,57±0,03 de	0,54±0,03 b	0,55±0,03 c	0,57±0,03 d	0,58±0,04 c
<b>VR</b>	0,46±0,03 ab	0,59±0,05 d	0,47±0,05 a	0,56±0,03 c	0,54±0,02 bc	0,55±0,03 c	0,52±0,04 a
<i>(ca x la)/(cvc x lc)</i>							
	0 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
<b>BH</b>	-	0,33±0,02 ab	0,28±0,02 a	0,27±0,02 a	0,30±0,01 a	0,31±0,02 a	0,33±0,02 b
<b>BM</b>	-	0,37±0,04 cde	0,33±0,01 bc	0,31±0,02 b	0,32±0,01 bc	0,32±0,02 a	0,33±0,03 b
<b>CF</b>	-	0,37±0,03 de	0,35±0,03 c	0,34±0,03 cd	0,34±0,05 de	0,33±0,02 b	0,34±0,02 b
<b>FLO</b>	-	0,35±0,05 bc	0,32±0,02 b	0,29±0,02 a	0,30±0,02 ab	0,31±0,01 a	0,33±0,02 b
<b>JF</b>	-	0,32±0,05 a	0,29±0,03 a	0,29±0,04 a	0,30±0,02 a	0,31±0,02 a	0,33±0,02 b
<b>LEO</b>	-	0,38±0,03 ef	0,37±0,03 d	0,35±0,03 d	0,32±0,04 cd	0,33±0,02 b	0,33±0,02 b
<b>RJ</b>	-	0,35±0,04 cd	0,35±0,03 c	0,33±0,02 bc	0,34±0,02 e	0,35±0,03 b	0,36±0,02 c
<b>VR</b>	-	0,41±0,05 f	0,33±0,06 b	0,35±0,02 d	0,33±0,02 cde	0,34±0,03 b	0,31±0,03 a

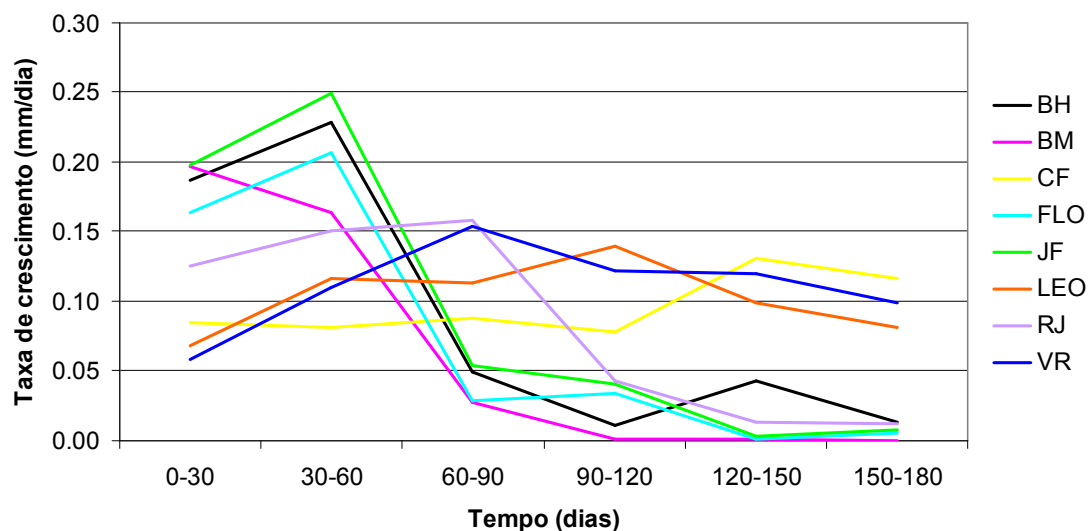
**Legenda:** *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha, *nv* – número de voltas da concha. \*Para cada variável analisada separadamente, as médias seguidas de letras desiguais diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).



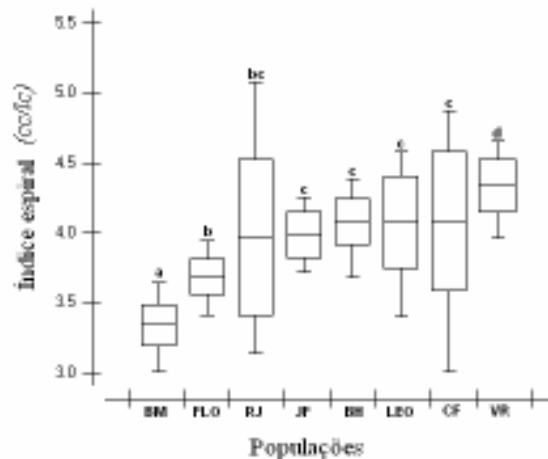
**Fotografia 1:** Fenótipos para a coloração da massa cefalopodal de *Subulina octona*, verde (esquerda) e creme (direita). Indivíduos das populações de Juiz de Fora (JF) e Rio de Janeiro (RJ), respectivamente.



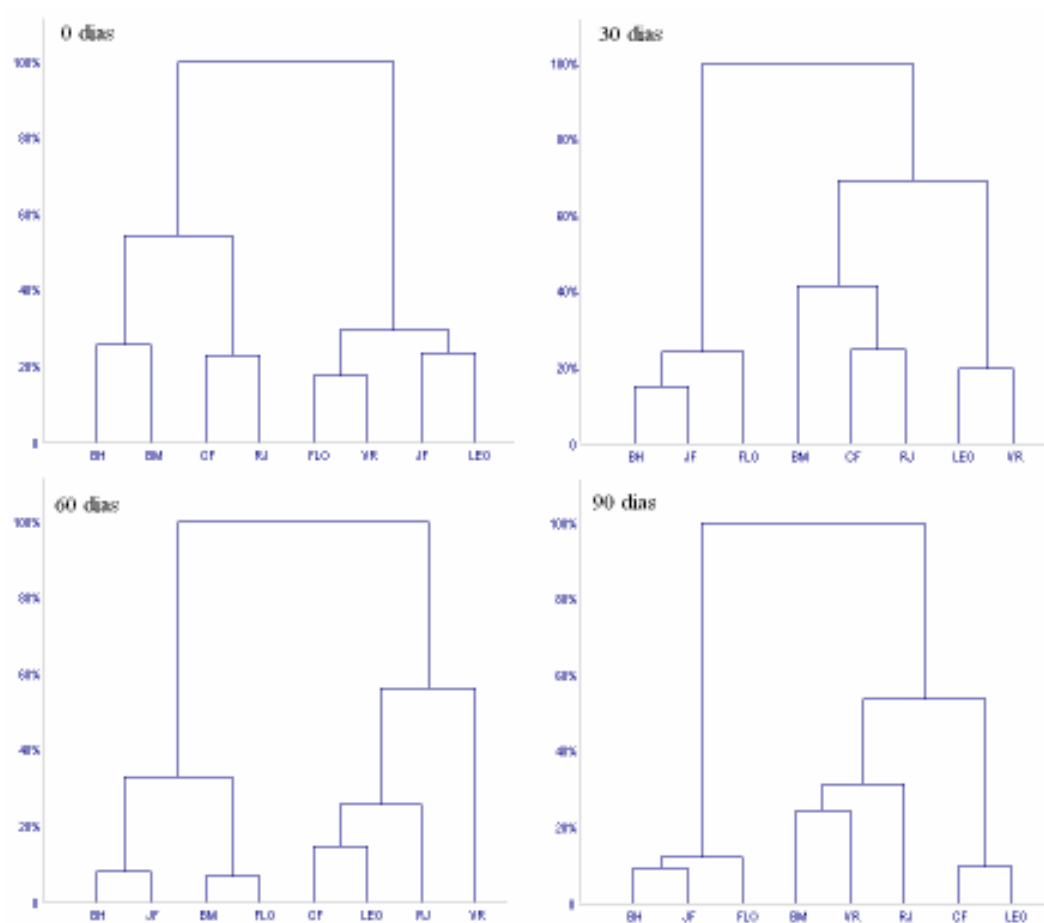
**Fotografia 2:** Fenótipos para a coloração da massa cefalopodal de *Subulina octona*, verde (esquerda) e creme (direita). Indivíduos da população de Coronel Fabriciano (CF) aos 180 dias de vida.



**Gráfico 1:** Taxa de crescimento (mm/dia) da concha de oito diferentes populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento, em condições de laboratório; Belo Horizonte-MG (BH); Barra Mansa-RJ (BM); Coronel Fabriciano-MG (CF); Florianópolis-RJ (FLO); Leopoldina-MG (LEO); Rio de Janeiro-RJ (RJ); Volta Redonda-RJ (VR).



**Gráfico 2:** Índice espiral (comprimento / largura) das conchas de oito populações de *Subulina octona* aos 180 dias de vida; Belo Horizonte-MG (BH); Barra Mansa-RJ (BM); Coronel Fabriciano-MG (CF); Florianópolis-RJ (FLO); Leopoldina-MG (LEO); Rio de Janeiro-RJ (RJ); Volta Redonda-RJ (VR). Letras diferentes indicam diferença significativa.



**Gráfico 3:** Análise de conglomerados para variáveis conchiliomorfológicas de oito populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento; Belo Horizonte-MG (BH); Barra Mansa-RJ (BM); Coronel Fabriciano-MG (CF); Florianópolis-RJ (FLO); Leopoldina-MG (LEO); Rio de Janeiro-RJ (RJ); Volta Redonda-RJ (VR).

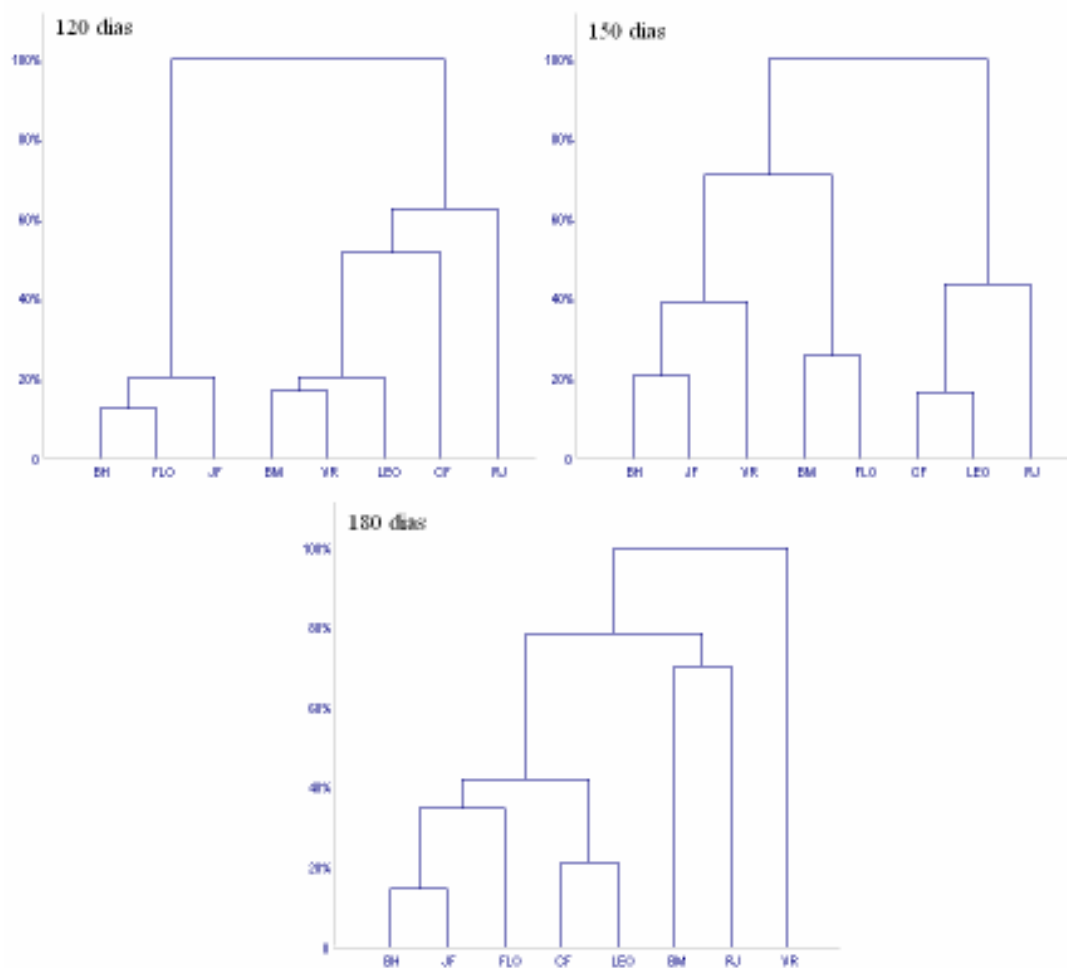


Gráfico 3 (continuação)

**Tabela 6:** Matriz de correlações entre medidas lineares da concha de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento.

0 dias						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>		
<i>cc</i>	1,00	---	---	---	---	---
<i>lc</i>	0,96	1,00	---	---	---	---
<i>ca</i>	0,96	0,99	1,00	---	---	---
<i>la</i>	0,94	0,97	0,97	1,00	---	---
30 dias						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
<i>cc</i>	1,00	---	---	---	---	---
<i>lc</i>	0,95	1,00	---	---	---	---
<i>ca</i>	0,94	0,97	1,00	---	---	---
<i>la</i>	0,87	0,90	0,89	1,00	---	---
<i>cvc</i>	0,96	0,97	0,98	0,87	1,00	---
<i>ce</i>	0,95	0,83	0,82	0,79	0,83	1,00
60 dias						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
<i>cc</i>	1,00	---	---	---	---	---
<i>lc</i>	0,95	1,00	---	---	---	---
<i>ca</i>	0,95	0,93	1,00	---	---	---
<i>la</i>	0,81	0,86	0,84	1,00	---	---
<i>cvc</i>	0,97	0,95	0,96	0,84	1,00	---
<i>ce</i>	0,99	0,93	0,93	0,77	0,93	1,00
90 dias						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
<i>cc</i>	1,00	---	---	---	---	---
<i>lc</i>	0,84	1,00	---	---	---	---
<i>ca</i>	0,83	0,77	1,00	---	---	---
<i>la</i>	0,49	0,63	0,56	1,00	---	---
<i>cvc</i>	0,90	0,82	0,87	0,49	1,00	---
<i>ce</i>	0,99	0,81	0,77	0,47	0,82	1,00
120 dias						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
<i>cc</i>	1,00	---	---	---	---	---
<i>lc</i>	0,83	1,00	---	---	---	---
<i>ca</i>	0,87	0,86	1,00	---	---	---
<i>la</i>	0,66	0,74	0,67	1,00	---	---
<i>cvc</i>	0,88	0,82	0,92	0,59	1,00	---
<i>ce</i>	0,98	0,78	0,79	0,64	0,77	1,00
150 dias						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
<i>cc</i>	1,00	---	---	---	---	---
<i>lc</i>	0,85	1,00	---	---	---	---
<i>ca</i>	0,89	0,84	1,00	---	---	---
<i>la</i>	0,80	0,83	0,74	1,00	---	---
<i>cvc</i>	0,90	0,84	0,93	0,72	1,00	---
<i>ce</i>	0,99	0,81	0,83	0,79	0,82	1,00
180 dias						
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>
<i>cc</i>	1,00	---	---	---	---	---
<i>lc</i>	0,91	1,00	---	---	---	---
<i>ca</i>	0,94	0,90	1,00	---	---	---
<i>la</i>	0,81	0,81	0,77	1,00	---	---
<i>cvc</i>	0,94	0,88	0,95	0,76	1,00	---
<i>ce</i>	0,99	0,89	0,91	0,80	0,89	1,00

**Legenda:** *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha.

**Tabela 7:** Resultado do teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Student-Newman-Keuls para as medidas lineares e razões conchiliomorfológicas de oito populações de *Subulina octona* nas idades de 0 e 180 dias de vida.

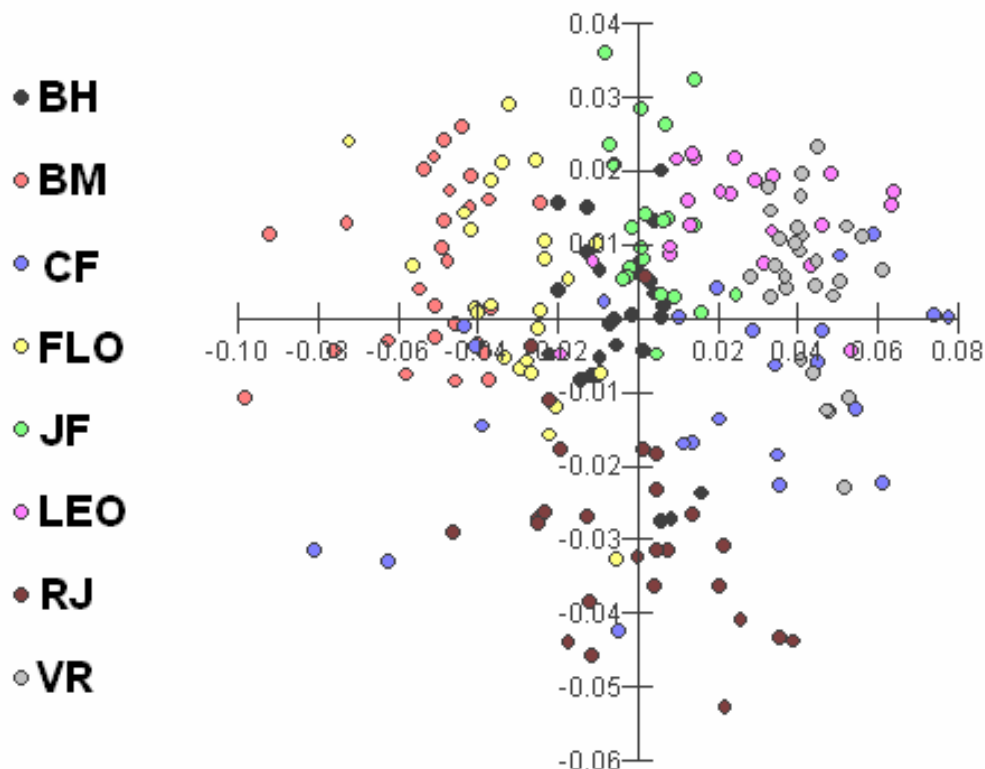
Idade 0							
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cc/lc</i>	<i>ca/la</i>	<i>la/lc</i>
H=	18,32	11,58	30,72	17,96	19,69	54,83	36,43
p (Kruskal-Wallis)		0,115					
	p (Student-Newman-Keuls)						
BH-BM	0,175		0,016	0,346	0,472	0,019	0,861
BH-CF	0,176		0,304	0,041	0,120	0,089	0,036
BH-FLO	0,058		0,032	0,706	0,193	0,043	0,042
BH-JF	0,750		0,110	0,798	0,878	0,019	0,031
BH-LEO	0,614		0,590	0,181	0,514	0,147	0,021
BH-RJ	0,167		0,419	0,798	0,049	0,069	0,625
BH-VR	0,778		0,876	0,114	0,445	0,127	0,093
BM-CF	0,007		0,001	0,003	0,023	0,532	0,054
BM-FLO	0,001		< 0,0001	0,577	0,044	< 0,0001	0,027
BM-JF	0,094		< 0,0001	0,493	0,572	< 0,0001	0,020
BM-LEO	0,395		0,062	0,693	0,946	0,000	0,013
BM-RJ	0,006		0,110	0,231	0,007	0,600	0,754
BM-VR	0,102		0,025	0,525	0,138	0,000	0,063
CF-FLO	0,591		0,269	0,016	0,802	0,000	< 0,0001
CF-JF	0,300		0,576	0,022	0,088	< 0,0001	< 0,0001
CF-LEO	0,064		0,118	0,001	0,028	0,002	< 0,0001
CF-RJ	0,988		0,067	0,073	0,688	0,916	0,106
CF-VR	0,283		0,237	0,000	0,426	0,001	0,000
FLO-JF	0,114		0,579	0,902	0,146	0,760	0,917
FLO-LEO	0,017		0,007	0,343	0,052	0,555	0,803
FLO-RJ	0,598		0,003	0,528	0,513	0,000	0,012
FLO-VR	0,106		0,022	0,235	0,588	0,608	0,716
JF-LEO	0,411		0,032	0,280	0,619	0,366	0,883
JF-RJ	0,288		0,016	0,609	0,034	< 0,0001	0,008
JF-VR	0,971		0,079	0,186	0,358	0,409	0,637
LEO-RJ	0,060		0,788	0,111	0,009	0,001	0,005
LEO-VR	0,432		0,702	0,809	0,157	0,938	0,536
RJ-VR	0,272		0,515	0,067	0,227	0,001	0,030
<b>Diferenças Totais</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

Tabela 7 (continuação)

Idade 180												
	<i>cc</i>	<i>lc</i>	<i>ca</i>	<i>la</i>	<i>cvc</i>	<i>ce</i>	<i>cc/lc</i>	<i>cvc/cc</i>	<i>cvc/lc</i>	<i>ca/la</i>	<i>la/lc</i>	<i>(ca x la)/ (cvc x lc)</i>
H=	164,55	160,87	165,05	132,49	157,84	163,96	141,42	154,81	80,62	90,11	42,56	40,04
p (Kruskal-Wallis)												
	p (Student-Newman-Keuls)											
BH-BM	< 0,0001	0,000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,002	0,358	0,938
BH-CF	0,403	0,095	0,408	0,068	0,916	0,242	0,750	0,041	0,000	0,094	0,621	0,240
BH-FLO	0,004	0,010	0,023	0,036	0,015	0,002	0,000	0,002	0,053	0,225	0,980	0,491
BH-JF	0,451	0,035	0,122	0,005	0,167	0,644	0,461	0,615	0,476	0,153	0,408	0,690
BH-LEO	0,029	< 0,0001	0,007	< 0,0001	0,016	0,039	0,839	0,169	0,029	0,019	0,584	0,739
BH-RJ	0,353	0,405	0,021	0,369	0,001	0,753	0,106	0,022	< 0,0001	< 0,0001	0,020	0,000
BH-VR	0,000	< 0,0001	< 0,0001	0,008	0,001	0,000	0,037	0,000	0,092	0,009	0,000	0,040
BM-CF	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,251	0,196	0,685	0,202
BM-FLO	0,013	0,267	0,022	0,065	0,036	0,018	0,005	0,039	0,003	0,073	0,371	0,435
BM-JF	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,131	0,081	0,629
BM-LEO	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,011	0,583	0,148	0,679
BM-RJ	< 0,0001	0,004	0,020	< 0,0001	0,204	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,732	0,093	0,001	< 0,0001
BM-VR	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,001	< 0,0001	0,008	0,044
CF-FLO	0,000	< 0,0001	0,002	< 0,0001	0,021	< 0,0001	0,002	< 0,0001	0,080	0,637	0,638	0,621
CF-JF	0,941	0,650	0,471	0,333	0,141	0,491	0,676	0,013	0,004	0,822	0,192	0,449
CF-LEO	0,177	0,019	0,061	0,011	0,013	0,364	0,914	0,539	0,165	0,487	0,307	0,418
CF-RJ	0,078	0,012	0,002	0,339	0,002	0,135	0,201	0,835	0,141	0,004	0,005	0,008
CF-VR	0,005	0,006	0,001	0,458	0,001	0,014	0,017	0,155	0,036	< 0,0001	0,003	0,001
FLO-JF	0,000	< 0,0001	0,000	< 0,0001	0,000	0,001	0,007	0,012	0,239	0,810	0,394	0,783
FLO-LEO	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,001	< 0,0001	0,757	0,244	0,568	0,739
FLO-RJ	0,046	0,078	0,999	0,003	0,408	0,005	0,052	< 0,0001	0,001	0,001	0,018	0,002
FLO-VR	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,765	0,000	0,001	0,006
JF-LEO	0,159	0,061	0,250	0,119	0,305	0,116	0,606	0,067	0,149	0,363	0,790	0,952
JF-RJ	0,095	0,003	0,000	0,053	< 0,0001	0,439	0,402	0,006	< 0,0001	0,002	0,148	0,001
JF-VR	0,004	0,023	0,016	0,786	0,055	0,002	0,005	< 0,0001	0,360	< 0,0001	< 0,0001	0,016
LEO-RJ	0,002	< 0,0001	< 0,0001	0,000	< 0,0001	0,017	0,174	0,407	0,004	0,033	0,089	0,001
LEO-VR	0,174	0,780	0,240	0,057	0,409	0,142	0,026	0,043	0,545	< 0,0001	< 0,0001	0,020
RJ-VR	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,080	< 0,0001	< 0,0001	0,000	0,217	0,000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Diferenças to tais	19	21	21	17	20	19	17	20	14	14	11	13

**Legenda:** *ca* – comprimento da abertura, *cc* – comprimento total da concha, *ce* – comprimento da espira, *cvc* – comprimento da volta corporal, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha.





**Gráfico 4:** Análise discriminante de medidas da concha de oito populações de *Subulina octona* aos 180 dias de vida; Belo Horizonte-MG (BH); Barra Mansa-RJ (BM); Coronel Fabriciano-MG (CF); Floriano-RJ (FLO); Leopoldina-MG (LEO); Rio de Janeiro-RJ (RJ); Volta Redonda-RJ (VR).

**Tabela 8:** Resumo da Análise de Componentes Principais para as variáveis conquiomorfológicas de oito populações de *Subulina octona* ao longo do desenvolvimento.

Idade (dias)	Componente Principal 1	Variância (%)	Componente Principal 2	Variância (%)
0	<i>lc</i>	79,56	<i>la</i>	9,77
30	<i>cc</i>	92,19	<i>ce</i>	4,47
60	<i>cc</i>	92,80	<i>la</i>	4,48
90	<i>cc</i>	78,32	<i>la</i>	12,04
120	<i>cc</i>	81,98	<i>la</i>	8,22
150	<i>cc</i>	84,89	<i>la</i>	6,42
180	<i>cc</i>	88,94	<i>la</i>	5,57

**Legenda:** *cc* – comprimento da concha, *ce* – comprimento da espira, *la* – largura da abertura, *lc* – largura máxima da concha.

## 2.4 Discussão

### 2.4.1 Variabilidade intrapopulacional

Os valores de coeficiente de variação do comprimento da concha de *S. octona* verificados no presente estudo foram semelhantes aos relatados na literatura por Bessa & Araújo (1995a) e D'ávila & Bessa (2005a). Da mesma forma que esses autores, foi verificada tendência à homogeneização da população com a redução dos coeficientes ao longo do desenvolvimento.

A despeito da baixa vagilidade dos moluscos terrestres, e o conseqüente reduzido fluxo gênico, variações genéticas intrapopulacionais podem ocorrer devido à seleção críptica do microclima, da vegetação, de características físico-químicas do solo, das pressões de predação, entre outros (CAIN & CURREY, 1963; SCHILTHUIZEN et al., 2006; ANDERSON et al., 2007; CHIBA & DAVISON, 2007).

Em algumas espécies, a variação intrapopulacional pode ser mais significativa do que a interpopulacional, como no caso do gastrópode marinho *Littoraria flava* (King & Broderip, 1832). Segundo Andrade & Solferini (2007), a variação intrapopulacional em pequena escala nesta espécie é reflexo da grande heterogeneidade no microhabitat, onde os efeitos da deriva e seleção alteram os padrões populacionais a nível genético e conseqüentemente, fenotípicos.

Para compreensão da variabilidade em *S. octona*, por outro lado, deve-se considerar ainda a influência da autofecundação. Tal característica da espécie pode comprometer a variabilidade intrapopulacional (MC CRACKEN & BRUSSARD, 1980) alterando os padrões de diversidade em termos de homo/heterozigosidade. No entanto, mesmo a prole de um único molusco autofecundado é capaz de apresentar variação nos padrões conchiliológicos (observações de laboratório).

### 2.4.2 Variabilidade interpopulacional

#### Conquiliomorfometria

Os tamanhos encontrados para a concha aos 180 dias estão compreendidos entre os relatados na literatura para a espécie, sendo o tamanho máximo registrado de  $21,76 \pm 0,70$ mm (em média). Almeida & Mota (2011) encontraram populações naturais de *S. octona* com tamanho máximo entre 17,1-18mm. No entanto, a criação dos moluscos em laboratório pode

ter promovido condições para o maior crescimento dos indivíduos, como alimentação reforçada e umidificação constante, além da ausência de predadores.

O formato da concha pode explicar em parte os habitats e hábitos dos moluscos. Chiba & Davison (2007), analisando as variações na concha de *M. polita*, observaram que a morfologia variou de acordo com a presença/ausência de competidores, com a altitude e com o sítio ocupado na serrapilheira. Segundo estes autores, conchas mais alongadas tornam os moluscos mais hábeis ao enterramento no substrato e esta característica, neste caso, teve herança genotípica.

O hábito de se enterrar, característico de Subulinidae, é fundamental para a sobrevivência dos indivíduos, principalmente ao longo das estações secas do ano. No caso de *S. octona*, que pode viver aproximadamente 3 anos (dados não publicados), ultrapassando cerca de três períodos de estiagem (característica da região estudada), o enterramento garante a sobrevivência dos indivíduos até a próxima estação chuvosa.

Acredita-se que as diferenças encontradas na forma da concha de *S. octona* possam ser devido às características genéticas selecionadas ao longo do tempo evolutivo nos ambientes de origem de cada população, conforme observado em *M. polita* (CHIBA & DAVISON, 2007) e em *Littorina saxatilis* (Olivi, 1792) (CONDE-PADÍN et al., 2009). No entanto, no presente trabalho não foi possível verificar a herdabilidade das características fenotípicas observadas, sendo necessários mais estudos para esclarecer tal proposição.

### **Análises Multivariadas**

Os resultados da análise de conglomerados mostraram formação de diferentes agrupamentos em cada idade, o que pode ser reflexo das mudanças nos padrões de crescimento apresentados por cada população. No entanto, a análise dos agrupamentos formados mostrou que os fenótipos verde e creme parecem ser características importantes para composição dos grupos-irmãos uma vez que todos foram compostos por populações de massas cefalopodais semelhantes (verde, creme, ou ambas).

O comprimento da concha e a largura da abertura apresentaram-se como os dois principais componentes a explicar a variabilidade no formato da concha na espécie *S. octona*. Conde-Padín et al. (2009) constataram uma influência da herança genética proveniente do ambiente de origem sobrepondo a influência do ambiente de crescimento, quando o animal é transferido de localidade. A herança genética se mostrou efetiva em explicar as variações no

comprimento e abertura da concha de *L. saxatilis*, sendo as variáveis que explicaram a maior parte da variação da concha, assim como em *S. octona*.

Pfenninger & Magnin (2001) também verificaram os mesmos padrões de variação no molusco terrestre europeu *C. unifasciata* spp., cujo formato foi explicado pela variação entre conchas globulares ou achatadas e entre aberturas elípticas ou arredondadas. Neste caso, os autores conseguiram relacionar a concha achatada e com pequena abertura aos ambientes quentes e secos, e moluscos pequenos habitando locais onde há elevada média anual de precipitação, como adaptação às áreas secas devido à redução da razão superfície/volume.

Não foi observada correlação entre a distância geográfica e as diferenças morfométricas encontradas na concha de *S. octona* no presente estudo, indicando que deve haver outros fatores atuando nestas populações para promover a variabilidade observada. As populações estudadas distanciam-se por no máximo 380km e situam-se numa região onde as atividades humanas de transporte de material como terra e mudas de plantas podem estar promovendo o fluxo gênico entre populações, considerando-se sua reduzida vagilidade. Dessa forma, é possível que as diferenças morfológicas encontradas sejam explicadas por seleção ambiente nos diferentes microhabitats, não sendo, portanto, promovidas pelo isolamento por distância.

Segundo Andrade & Solferini (2006), a variabilidade genética e a plasticidade fenotípica podem atuar em populações distintas promovendo a variabilidade fenotípica nos organismos. Considerando-se o fato de neste estudo ter sido utilizada a prole de indivíduos do campo, estes trouxeram as características genéticas de seus parentais. Quando diferentes populações mantêm suas diferenças fenotípicas em ambientes distintos daqueles de sua origem, isso se deve à determinação genética (FALCONER & MACKAY, 1996 apud CONDE-PADÍN et al., 2009). Esse pressuposto foi corroborado por Conde-Padín et al. (2009), que observaram que indivíduos de mesma origem, desenvolvendo-se em ambientes distintos, foram semelhantes entre si, enquanto indivíduos de origens distintas, desenvolvendo-se no mesmo ambiente, não tenderam a se tornar semelhantes, indicando que a herança genética foi determinante para o fenótipo apresentado.

No presente estudo observou-se que mesmo em condições semelhantes de criação, moluscos de diferentes localidades de origem apresentaram diferenças fenotípicas variando interpopulacionalmente. Assim, acredita-se que esta variabilidade seja reflexo de diferentes genótipos, característicos de cada população.

## Padrões de desenvolvimento

As diferenças nos padrões de crescimento em comprimento e em largura da concha de *S. octona*, bem como o fato de não ter sido observado um aumento proporcional no número de voltas, explicam as divergências entre os tamanhos da concha encontrados nas populações estudadas. A variação nos padrões de crescimento entre as populações culminaram em padrões de conchas variando entre abaulados e alongados, observados pelos diferentes índices espirais.

Bessa & Araújo (1995b) observaram uma taxa de crescimento média de 0,06mm/dia nos 120 dias posteriores ao início da oviposição em *S. octona*. No entanto, esta taxa tendeu a decrescer ao longo do tempo, indo de 0,15mm/dia a 0,01mm/dia da primeira para a última quinzena do período de estudo. No presente estudo, não foi observada a idade para o alcance da maturidade, sendo que as taxas de crescimento médias para os 180 dias de experimentação oscilaram entre 0,07 a 0,11mm/dia.

Apesar de todos os indivíduos estarem maduros ao término do experimento, algumas populações apresentaram padrão de crescimento diferente do esperado, inclusive com aumento da taxa de crescimento com o passar do tempo. Lam & Calow (1989) verificaram que, mesmo em condições naturais, os moluscos podem apresentar variabilidade intraespecífica nos padrões de histórias de vida, com diferenças nas taxas de crescimento, de reprodução e de mortalidade. O padrão de crescimento indeterminado proposto para a espécie (BESSA & ARAÚJO, 1995a; D'ÁVILA & BESSA, 1995b) pode ser determinado geneticamente.

As medidas de relação entre comprimento e largura da concha no recém-eclodido podem ser entendidas pelo formato do ovo desta espécie. Segundo Bessa & Araújo (1995b), o ovo de *S. octona* é arredondado e apresenta dois pólos de achatamento com tamanhos médios de 1,63x1,35mm e o recém eclodido apresenta tamanho médio de 1,53mm. O comprimento da concha deve estar compreendido no maior eixo do ovo e a largura no menor, dadas suas proporções. No presente estudo, o comprimento médio da concha foi de  $1,89 \pm 0,08$ mm e a largura média foi de  $1,50 \pm 0,03$ mm. Dentro das populações, o comprimento da concha foi mais variável que sua largura (Tabela 1) e, entre elas, o comprimento variou, mas a largura foi semelhante (Tabela 5).

A concha arredondada do recém-eclodido vai tornando-se cada vez mais alongada à medida que o molusco se desenvolve, característica frequentemente encontrada na família Subulinidae (CARR, 2002; CARVALHO et al., 2009). A volta corporal e anteriores abrigam

estruturas importantes do corpo de *S. octona*, como a parte cefálica (quando retraída) e o sistema reprodutor (permanentemente), incluindo uma grande glândula de albúmen e o útero que pode conter até 9 ovos (BESSA & ARAÚJO, 1995a). O formato do sistema reprodutor desta espécie acompanha o formato da concha, sendo bastante alongado (ARAÚJO & BESSA, 1993).

À medida que o molusco cresce, observa-se que a espira passa a abrigar a maior parte do seu corpo. O crescimento do animal é importante do ponto de vista da reprodução, pois o aumento no tamanho permitirá que o útero dilatado passe a abrigar maior quantidade de ovos em seu interior, conforme observado por outros autores para a espécie (DÁVILA & BESSA, 2005b). Como a largura da volta corporal (ou largura da concha) não aumenta significativamente, este molusco passa a utilizar voltas anteriores para distensão do útero em comprimento. A alocação inicial, ainda que reduzida, de recursos da reprodução para o crescimento permitirá ao molusco uma maior produtividade futura.

O formato alongado da abertura da concha de *S. octona* foi mantido durante todo o desenvolvimento do animal e não foi proporcional ao crescimento em comprimento. Seu formato será responsável pelo incremento na volta posterior já que é na borda da abertura que acontece a deposição de cálcio que permite o crescimento da concha. A abertura da concha deve ter um tamanho ótimo que permita a postura dos ovos e retração da massa cefalopodal, e ainda evite a perda de água corporal para o ambiente.

O aumento inicial na relação  $la/lc$  observado nos primeiros 30 dias de vida para o conjunto das populações pode ser entendido como uma compensação entre proteção contra dessecação e crescimento. Uma concha que apresentasse uma abertura estreita demoraria mais a alcançar uma largura de concha que atendesse às necessidades de reprodução, mas uma concha muito larga seria desvantajosa em termos de dessecação.

Com o passar do tempo e aumento no comprimento da concha, *S. octona* passa a produzir maior quantidade de ovos (DÁVILA & BESSA, 2005b). No entanto, nenhum estudo relata um aumento no tamanho dos ovos e as observações laboratoriais corroboram essa informação. Assim, entende-se não ser vantajoso uma abertura maior que o tamanho necessário para realização de tais atividades. Dessa forma, ao longo da evolução é provável que a seleção tenha atuado em favor de aberturas tão pequenas quanto possível. Uma pequena abertura, minimizando a área da superfície exposta e constitui-se de uma vantagem seletiva que minimiza a perda de umidade sob condições de estresse hídrico (PFENNINGER & MAGNIN, 2001).

No recém-eclodido a grande abertura em proporção ao pequeno tamanho corporal é desvantajosa para o animal, pois acentua a perda de água para o ambiente. Sendo muito susceptíveis, os moluscos jovens são geralmente encontrados sob a terra, como que estivado, somente emergindo após atingir certo tamanho (não mensurado), mas sempre se abrigando sob alguma proteção.

O enterramento e agregação são hábitos comuns em espécies de Subulinidae (D'ÁVILA et al., 2004), ficando a concha a aproximadamente 90° em relação ao solo, geralmente sob abrigo, com a abertura sempre voltada para baixo e protegida, principalmente em épocas de baixa umidade. Cook & Jaffar (1984) analisaram espécies de moluscos com diferentes índices espirais e verificaram que aqueles com índices elevados (aproximadamente 4,00), como é o caso de *S. octona*, localizavam-se preferencialmente a 90° em relação ao solo. Porém, ao invés de enterradas, as espécies analisadas situavam-se nas paredes dos terrários. Como *S. octona* não forma epifragma mesmo sob condições desfavoráveis (D'ÁVILA et al., 2004), tais hábitos amenizam a dessecação e ainda protegem o animal contra predação. Já a agregação permite que os moluscos tapem suas aberturas utilizando as conchas dos coespecíficos, garantindo maior proteção (D'ÁVILA et al., 2006).

### 2.4.3 Polimorfismo da coloração corporal

O polimorfismo da cor da massa cefalopodal já foi registrado para outras espécies de moluscos terrestres, tais como *Euhadra peliomphala* (Pfeiffer, 1850) (HAYASHI & CHIBA, 2000) e *Cepaea nemoralis* (Linnaeus, 1758) (OZGO, 2011). Carr (2002) relatou que a cor pode sofrer influência da alimentação, mas essa possibilidade foi descartada no presente estudo uma vez que os moluscos foram mantidos nas mesmas condições de criação, isolando assim qualquer efeito do ambiente na coloração. Além disso, o padrão de coloração não sofreu alteração ao longo do desenvolvimento dos moluscos.

Segundo Ford (1945), o polimorfismo da cor é definido como a co-ocorrência de duas ou mais variantes de cores distintas com embasamento genético. A herança da coloração corporal pode ser incerta (BACKELJAU et al., 2001), como é o caso de *S. octona*, mas para algumas espécies já se conhecem os padrões de distribuição das variantes e os mecanismos de herança genética nas diferentes populações. É o caso, por exemplo, de *E. peliomphala* (HAYASHI & CHIBA, 2000), em que a distribuição de fenótipos segue o mesmo padrão de distribuição dos haplótipos de mtDNA e de *C. nemoralis*, cuja coloração da concha tem bases genéticas bem compreendidas (OZGO & KINNINSON, 2008; OZGO, 2011).

Buscando compreender se havia alguma ligação entre características conquiliológicas e de coloração, efetuou-se a análise comparada das medidas da concha em cada população. Embora os fenótipos não tenham se diferenciado intrapopulacionalmente nas populações LEO e RJ (Tabela 4), estes se diferenciaram intrapopulacionalmente em CF, sendo as medidas do fenótipo verde maiores no creme. Quando analisados interpopulacionalmente, este padrão de diferenciação se manteve (Tabela 3). Tal abordagem não foi suficiente para esclarecer possíveis conexões entre características, sendo necessários mais estudos.

Variantes de coloração em moluscos terrestres podem ser atribuídas a fatores ambientais, genéticos ou a ambos. Segundo Forsman et al. (2008), espécies polimórficas ocupam maior nicho e maiores áreas, são mais bem-sucedidas e persistentes nas colonizações além de conseguirem se expandir com mais eficiência, sendo esperado que respondam rapidamente à seleção. A fim de testar esta proposição, Ozgo (2011) analisou populações de *C. nemoralis* de habitats instáveis antropizados comparando microhabitats sombreados e abertos. Este autor verificou diferenças significativas nas frequências de coloração em um curto espaço temporal, havendo uma tendência ao aumento na frequência de moluscos de coloração mais clara em habitats abertos (e por consequência, mais instáveis).

Para a coloração corporal em *Theba pisana* (Müller, 1774) (COWIE, 1990) e em duas espécies de *Cepaea* (COWIE & JONES, 1985) verificou-se que a seleção atuava em favor de moluscos mais claros em ambientes mais quentes. Quanto ao tamanho corporal, há autores que dizem que a relação é diretamente proporcional ao aumento da temperatura (WELTSCHULTES, 2000; ANDERSON et al., 2007), mas no presente estudo tal influência não foi investigada. Somente a combinação entre as abordagens ecológica e genética poderá esclarecer o padrão de herança e possíveis pressões relacionadas à coloração nesta espécie.



### **3 VARIABILIDADE ANATÔMICA E MOLECULAR EM *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (MOLLUSCA, GASTROPODA, SUBULINIDAE)**

#### **3.1 Introdução**

Os gastrópodes pulmonados apresentam grande diversidade, sendo estimada a existência de mais de 30.000 espécies, distribuídas por uma ampla variedade de habitats (BARKER, 2001; HELLER, 2001). Muitas dessas espécies, classificadas com base somente em características da concha pelos antigos naturalistas, vêm sendo estudadas com outras ferramentas para esclarecimento de suas relações taxonômicas, sistemáticas e evolutivas.

Características anatômicas do sistema reprodutor servem como critério para diferenciação de grupos taxonômicos e podem apresentar grande variabilidade entre e dentro de populações (RUNHAM & LARYEA, 1968; CUEZZO, 1990; PFENNINGER & MAGNIN, 2001; CARR, 2002; ARRUDA et al., 2006; BEESE & BAUR, 2006; BEESE et al., 2006 a,b; POINTIER et al., 2006; KAMEDA et al., 2007; CARVALHO, 2009). Muitos estudos relacionam características reprodutivas com conquiliológicas, como o tamanho do animal (BEESE et al., 2006a,b; BEESE & BAUR, 2006), ou biológicas, como maturidade sexual e fecundidade (CUEZZO, 1990; PFENNINGER & MAGNIN, 2001).

Segundo Puillandre et al. (2010), eventos que promovem especiação, especialmente os recentes, podem não resultar em espécies morfologicamente distintas. Assim, o acesso às informações moleculares das populações em estudo permite a identificação de espécies crípticas, além da compreensão dos mecanismos que estão promovendo a variabilidade e, em último caso, a especiação.

O conhecimento sobre as relações entre organismos é fundamental para a sistemática, que se ocupa não somente da classificação e identificação das espécies, mas busca compreender os processos evolutivos geradores da diversidade biológica (BUSO, 2005). Métodos moleculares podem ajudar a esclarecer essas relações e fornecer subsídios para análises filogenéticas (CHIBA, 1999; CARVALHO, 2009). A investigação direta da situação genotípica permite a detecção de variação ao nível de DNA, excluindo, portanto, influências ambientais que poderiam levar à sub ou superestimação da variabilidade (BUSO, 2005).

Divergências nas sequências de DNA, quantitativas ou qualitativas, são causadas por eventos mutacionais e permitem mensurar a variedade de alelos e genótipos nas populações (FRANKHAM et al., 2002), sendo este o foco atual para estudos de biologia da conservação

(SPRUELL et al., 2003). O DNA mitocondrial (mtDNA) tem se mostrado eficiente em explicar aspectos evolutivos de populações e espécies animais (WILSON et al., 1985; AVISE et al., 1987; MORITZ et al., 1987) devido a sua alta taxa de evolução, o formato circular, o pequeno tamanho, a simplicidade gênica (BROWN, 1985; HARRISON, 1989) e por apresentar estruturas muito conservada nos animais.

A subunidade I do gene para a citocromo oxidase (COI) vem sendo amplamente utilizada como marcador para identificar espécies e populações de moluscos terrestres, por conta de sua alta taxa de evolução que permite o acúmulo de mutações recentes. A associação de ferramentas moleculares e morfológicas tem permitido a identificação de táxons e o esclarecimento de relações intra e interpopulacionais, bem como suas relações com o ambiente (SAMADI et al., 2000; KAMEDA et al., 2007; PUILLANDRE et al., 2010).

O gastrópode terrestre *Subulina octona* (Brugüière, 1789) (Subulinidae) amplamente distribuído no Brasil e em vários continentes (PILSBRY, 1946; ARAÚJO & BESSA, 1993; SIMONE, 2006), apresenta características biológicas que o tornam excelente colonizador de novos ambientes. O hábitat preferencial em ambientes antropizados, como hortas, e a consequente dispersão passiva (ARAÚJO & BESSA, 1993), aliado à capacidade de realizar autofecundação, às altas taxas reprodutivas e de sobrevivência da prole, tornam esta espécie muito abundante nos ambientes em que vive. O polimorfismo da coloração corporal vem sendo observado, com duas variantes já identificadas e a variabilidade morfológica da concha e sistema reprodutor vem sendo analisada.

O conhecimento dos subulinídeos se faz em sua maioria através da conquiliologia (NAGGS, 1994). Um conhecimento correto da identidade específica em moluscos terrestres é melhor realizado pela integração de várias abordagens – conquiliológica, anatômica e genética (PFENNINGER et al., 2003; KAMEDA et al., 2007) – a fim de esclarecer os limites entre o polimorfismo dentro de determinada espécie e a formação de um complexo de espécies (KAMEDA et al., 2007).

A despeito da ampla distribuição de *S. octona*, até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos que abordem a variabilidade morfológica e molecular para essa espécie (NCBI, 2012). Assim, objetivou-se com esse trabalho analisar a variabilidade morfométrica e molecular de populações de *S. octona* de diferentes localidades na região sudeste do Brasil através do estudo do sistema reprodutor e de parte da COI do mtDNA.

## 3.2 Material e Métodos

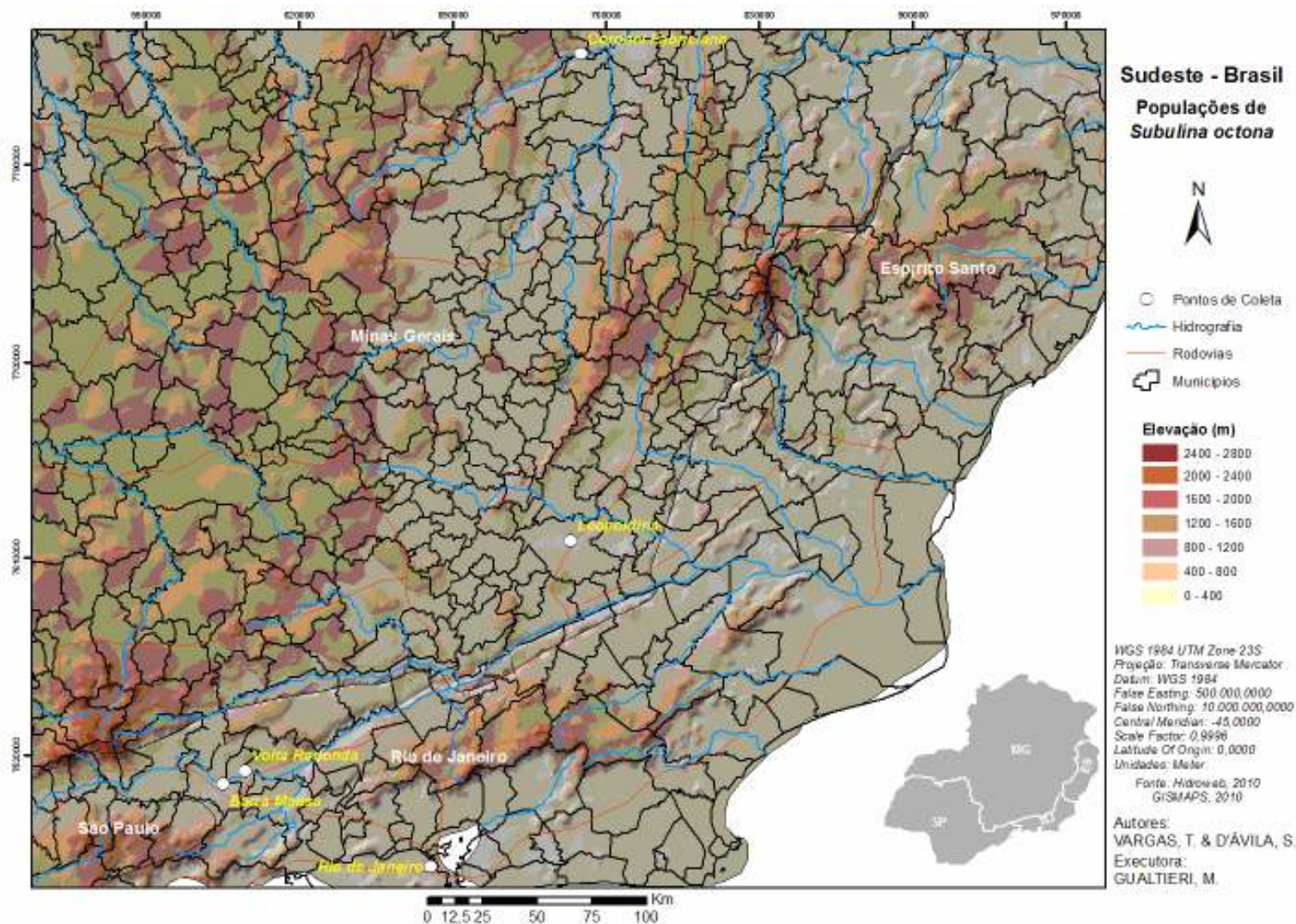
### 3.2.1 Grupos experimentais

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Moluscos do Museu de Malacologia Professor Maury Pinto de Oliveira da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. Os grupos experimentais foram formados por moluscos recém-eclodidos obtidos de criações matrizes de *S. octona* formadas a partir de moluscos coletados em cinco localidades (Mapa 2): Coronel Fabriciano (morfotipo CF) (19°30'57"S, 42°37'39"O) e Leopoldina (morfotipo LEO) (21°45'50"S, 43°21'0"O) no estado de Minas Gerais; Barra Mansa (morfotipo BM) (22°32'38"S, 44°10'15"O), Volta Redonda (morfotipo VR) (22°29'14"S, 44°4'12"O) e Rio de Janeiro (morfotipo RJ) (22°52'28"S, 43°14'42"O), no estado do Rio de Janeiro.

Cada criação-matriz foi formada por moluscos provenientes de uma mesma população, mantidos em caixas plásticas transparentes (14cm de diâmetro, 9cm de altura), fechadas com tecido de algodão e elástico, contendo terra vegetal esterilizada, umedecida com 10ml de água de torneira a intervalos de dois dias. Os moluscos foram alimentados segundo Bessa & Araújo (1995a) e mantidos em condições naturais de luz e temperatura. Filhotes recém-eclodidos foram transferidos para novos terrários, com as características descritas anteriormente, compondo os grupos experimentais. Os terrários de todas as populações foram mantidos nas mesmas condições de criação.

### 3.2.2 Estudo do sistema reprodutor

Para estudo morfométrico e morfológico do sistema reprodutor, 30 moluscos recém-eclodidos das localidades mencionadas foram mantidos em terrários separados por localidade, até atingirem 80 dias de vida, quando foram mortos e fixados. Nessa idade, *S. octona* da população originária da cidade de Juiz de Fora-MG foram considerados adultos (D'ÁVILA & BESSA, 2005a,b). Para matar os animais, esses foram acondicionados em recipientes de vidro totalmente preenchidos com água de torneira e mantidos durante quatro horas em temperatura ambiente e, posteriormente, em 24 horas sob refrigeração ( $4^{\circ}\text{C}\pm 2$ ). Após serem mortos, foi tomada a medida do comprimento total da concha (*cc*) e da largura máxima da concha (*lc*) com paquímetro (precisão 0,05mm). As conchas foram retiradas quebrando-se a região ao



**Mapa 2:** Locais de coleta de *Subulina octona*: Coronel Fabriciano e Leopoldina no estado de Minas Gerais; Barra Mansa, Volta Redonda e Rio de Janeiro, no estado do Rio de Janeiro.

redor das suturas e os moluscos foram conservados em frascos individuais e identificados, contendo álcool 70°GL. Os pés dos moluscos foram retirados e acondicionados separadamente em álcool 70° em microtubos com a mesma identificação para utilização no estudo molecular.

O sistema reprodutor dos moluscos foi dissecado e desenhado sob microscópio estereoscópico com câmara clara acoplada. A partir dos desenhos das estruturas, foram tomadas medidas lineares da porção proximal do sistema reprodutor: complexo peniano, oviduto e bolsa copuladora (Esquema 2). Foram tomadas as seguintes medidas lineares: comprimento do ducto da bolsa copuladora (*cdbc*), largura do ducto da bolsa copuladora (*ldbc*), altura da inserção do ducto da bolsa copuladora no oviduto (*ai*), comprimento da bolsa copuladora (*cbc*), largura da bolsa copuladora (*lbc*), comprimento do epifalo (*ce*), largura do epifalo (*le*), comprimento do falo (*cfa*), largura do falo (*lfa*), comprimento do flagelo (*cfl*), largura do flagelo (*lfl*), comprimento do complexo peniano (*ccp*), comprimento do oviduto (*co*), largura do oviduto (*lo*). Para estudar as relações de forma isolada ao tamanho dos animais, foram calculadas as seguintes razões:  $cfl/ce$ ,  $cfl/(ce+cfa)$ ,  $ccp/(cdbc+cbc)$ ,  $co/(cbc+cdbc)$ ,  $co/lo$ ,  $cbc/lbc$ ,  $ccp/ai$  e  $lo/lfa$ .

### 3.2.3 Tratamento estatístico

Os valores médios das estruturas do sistema reprodutor de cada população foram comparados a fim de verificar a existência de variação morfométrica utilizando-se o teste de variância ANOVA seguido do teste t de Student (significância 0,05). A mesma análise foi utilizada para comparação de estruturas entre indivíduos de diferentes cores da massa cefalopodal (verde e creme) e entre indivíduos com presença e ausência de ovos no útero. A variabilidade intrapopulacional foi mensurada através dos valores de coeficiente de variação.

Para caracterizar as relações de similaridade entre os padrões morfométricos das estruturas analisadas efetuou-se a Análise de Conglomerados pelo método de agregação de Ward, considerando-se a variância mínima entre os grupos, com a distância do tipo Euclidiana. Para verificar se havia separação entre as diferentes populações foi utilizada a análise de Função Discriminante considerando-se cada conjunto de estruturas (complexo peniano, oviduto e bolsa copuladora). A análise de Componentes Principais foi utilizada para explicitar os componentes que mais contribuíram para a variabilidade das amostras.

A correlação de Pearson (significância 0,05) foi utilizada para verificar correlação entre variáveis da concha (*cc* e *lc*) e do sistema reprodutor e entre estruturas componentes

deste último (*ai*, *ccp* e *co*). A distância multivariada Euclidiana do sistema reprodutor foi correlacionada à distância geográfica e à distância Euclidiana conquiliológica pelo teste de Mantel.

Foi calculado o percentual de indivíduos com e sem a presença de ovos no útero observado após a dissecação. As medidas das estruturas conquiliológicas e reprodutivas foram comparadas entre as categorias pela análise de variância ANOVA ( $p < 0,05$ ) e foram obtidas correlações entre as medidas conquiliológicas e anatômicas através da correlação de Pearson ( $p < 0,05$ ).

Para realização das análises foi utilizado o programa estatístico BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), exceto para a análise de Componentes Principais, para a qual foi utilizado o programa estatístico Past 1.94b (HAMMER et al., 2001).

### 3.2.4 Análise da variabilidade molecular – Citocromo oxidase I

As análises de genética molecular foram desenvolvidas no Departamento de Genética e Evolução, Instituto de Biologia, e no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os indivíduos utilizados foram os mesmos que compuseram o estudo do sistema reprodutor. Foram utilizados 30 espécimes de cada localidade, escolhidos aleatoriamente, dos quais foram obtidos fragmentos do pé para extração do DNA.

O DNA genômico total foi extraído utilizando-se o “*Wizard Genomic DNA Purification kit*” (Promega). As amostras de tecido foram rompidas mecanicamente em 600 $\mu$ L de solução de lise nuclear e incubadas a 65°C *overnight*. Em seguida, após deixar 5 minutos em temperatura ambiente, foram acrescentados 200 $\mu$ L de solução de precipitação de proteína. A solução foi agitada em vórtex, incubada à -20°C por 5 minutos e centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos a 24°C. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um tubo limpo contendo 600 $\mu$ L de isopropanol gelado para precipitação do DNA, sendo então incubado a -70°C por 1 hora. A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 600 $\mu$ L de etanol 70% e centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. O “pellet” foi tratado com 25 $\mu$ L de solução de reidratação do DNA e armazenado.

O gene para a citocromo oxidase I (COI) foi amplificado utilizando-se os *primers* universais HCO 2198 (5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA – 3') e LCO 1490 (5' – GGTCACAATCATAAAGATATTGG – 3') (FOLMER et al., 1994). A

amplificação pela PCR foi realizada segundo o protocolo descrito a seguir. A mistura consistiu de 2,5µL de tampão 10x; 2,5µL de Cloreto de Magnésio; 0,5µL de dNTP; 1,25µL de cada primer; 0,75µL de BSA; 0,2µL de Taq DNA polimerase; 2µL de DNA e 14,05µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, totalizando 25µL de solução. As reações foram submetidas ao seguinte ciclo: denaturação inicial por 2 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 48°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2,5 minutos, e extensão final a 72°C por 10 minutos. Um controle negativo foi incluído em todas as amplificações. 2,5µL do produto de amplificação de cada amostra, corados com 1µL de marcador GelRed<sup>TM</sup>, foram visualizados em géis de agarose para verificar a qualidade de amplificação.

O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, em um sequenciador capilar Prism 377 (Perkin Elmer). Para cada amostra foram produzidas duas sequências, a partir de 2µL de amostra de DNA amplificado, adicionado de 1µL de *primer*, sendo uma sequência *forward* (HCO) e uma *reverse* (LCO), a fim de obter uma sequência consenso.

Para a confirmação de que as sequências correspondem à região alvo foram realizadas buscas, por meio do *software* BLASTn (NCBI, 2012). Posteriormente, as sequências completas foram alinhadas pelo algoritmo Clustal W (THOMPSON et al., 1994) no BioEdit 7.0 e refinadas por inspeção visual.

O modelo de substituição que melhor representaria as sequências amostradas foi testado utilizando o Critério de Informação Akaike (AIC) implementado no jModeltest v3.06 (POSADA & CRANDALL, 1998), tendo como resultado o modelo HKY (HASEGAWA et al., 1985).

Para confecção da rede de haplótipos, utilizou-se o *software* TCS 1.21 (CLEMENT et al., 2000). Parâmetros de variabilidade intra e interpopulacional foram estimados usando o *software* Arlequin 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006). Como estimativas da variabilidade intrapopulacional e da diversidade genética usamos a diversidade nucleotídica (TAJIMA, 1993) e frequência haplotípica (EXCOFFIER et al., 2003). Como estimativa da variabilidade interpopulacional foi calculado o  $F_{ST}$  pareado entre amostras, sendo estimado de acordo com Weir & Cockerham (1984). Foram também estimadas as distâncias genéticas de Nei, par-a-par, de acordo com Tamura & Nei (1993). O  $F_{ST}$  e a distância genética também foram calculados após a retirada do haplótipo H2. O teste de Mantel foi utilizado para correlacionar distância genética (baseado na matriz de distância genética par-a-par, Tamura & Nei, 1993) à distância geográfica e à distância conquitilológica multivariada Euclidiana (baseado no índice espiral *cc/lc*) utilizando-se o *software* BioEstat 5.0. A fim de verificar uma possível influência

da seleção natural na evolução das sequências analisadas, submetemos as amostras ao teste de neutralidade de Fu (FU, 1997).

Para investigar se as relações genealógicas dos indivíduos estariam estruturadas na forma de populações geográficas, reconstruímos a genealogia desses indivíduos através do método de Máxima Verossimilhança com a ajuda do software MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011). Na reconstrução, foi informado ao programa o modelo de substituição nucleotídica HKY previamente selecionado, e o suporte dos ramos foi calculado a partir de 1000 *bootstraps*.

O frame de leitura das sequências foi identificado no BLASTp (NCBI, 2012) e posteriormente estas foram traduzidas em aminoácidos no *software* MEGA 5.0 para verificar possíveis modificações.

A morfometria do sistema reprodutor e da concha foi comparada entre os haplótipos e entre linhagens de mtDNA através da Análise de Variância ANOVA (significância 0,05) e a análise da Função Discriminante foi utilizada para verificar diferenciação entre linhagens de mtDNA. Tais análises foram efetuadas no *software* BioEstat 5.0 (AYRES *et al.*, 2007).

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Padrão geral da morfologia da porção proximal do sistema reprodutor de *S. octona*

*Subulina octona*, como todo Pulmonata, é uma espécie hermafrodita, sendo também capaz de realizar autofecundação. As estruturas proximais do sistema reprodutor encontram-se descritas abaixo, de acordo com o Esquema 2:

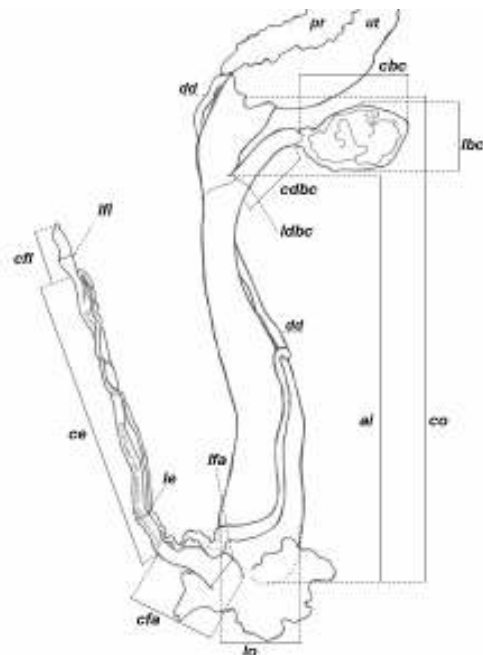
**Oviduto:** Seu sistema reprodutor se caracteriza por apresentar um oviduto que desemboca diretamente no poro genital, sem a presença de uma vagina. Este oviduto apresenta-se alongado e estreito, tendo na extremidade proximal a inserção do complexo peniano e próximo à extremidade distal, a inserção do ducto da bolsa copuladora, em face oposta à da inserção do complexo peniano. A largura do oviduto é pouco variável ao longo da estrutura e corresponde a cerca de 1/10 do seu comprimento. Ao longo do oviduto, desde sua extremidade distal até sua base, corre paralelamente e em sentido descendente o ducto deferente, integrante da parte masculina do sistema reprodutor. Na base do oviduto, esse se aproxima do falo e passa a orientar-se ascendentemente ao longo do complexo peniano.



**Complexo peniano:** O complexo peniano é uma estrutura alongada e muito estreita, formada pelo falo proximal, epifalo mediano e flagelo distal. Seu comprimento geralmente acompanha o comprimento do oviduto e sua largura máxima corresponde à largura do falo. É uma estrutura bastante variável, com proporções aproximadas de comprimento de 2:7:1 (falo:epifalo:flagelo). O falo insere-se na base do oviduto e nele se insere o músculo retrator peniano. O epifalo e o flagelo apresentam larguras semelhantes e menores que a do falo. O flagelo termina no músculo retrator do flagelo. Paralelamente ao complexo peniano e em sentido ascendente, segue o ducto deferente, canal estreito e oco. O flagelo tem início no ponto onde o ducto deferente mergulha no complexo peniano e se direciona para a região proximal deste, formando uma luz que pode ser visualizada por transparência em alguns pontos do epifalo. Falo e epifalo apresentam estrias transversais bem marcadas em alguns pontos.

**Bolsa copuladora:** A bolsa copuladora é um saco de fundo cego inserido no terço distal do oviduto em face oposta àquela da inserção do complexo peniano e que se enrola em torno do oviduto indo se acomodar atrás da próstata e do útero. É envolvida desde o ducto até à bolsa propriamente dita, juntamente com a porção distal do oviduto, por um tecido fino oriundo do prolongamento do útero. Apresenta um ducto comprido e estreito que desemboca na bolsa. Esta possui formato e tamanho variáveis, em geral arredondada ou ovalada, com faces achatadas. Observa-se por transparência que há uma bolsa interna. Uma luz pode também ser percebida vinda do oviduto próximo à altura da inserção do ducto e desembocando neste.

**Correlações entre estruturas:** A altura da inserção do ducto da bolsa copuladora correlaciona-se positivamente com o comprimento do oviduto ( $r=0,94$ ;  $p<0,0001$ ) e com o comprimento do complexo peniano do mesmo indivíduo ( $r=0,66$ ;  $p<0,0001$ ). O comprimento do complexo peniano também se correlaciona positivamente com o comprimento do oviduto ( $r=0,67$ ;  $p<0,0001$ ) (Tabela 13).



**Esquema 2:** Porção proximal do sistema reprodutor de *Subulina octona*. *ai* – altura da inserção da bolsa copuladora no oviduto; *cbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ccp* – comprimento do complexo peniano; *cdb* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ce* – comprimento do epifalo; *cfa* – comprimento do falo; *cfl* – comprimento do flagelo; *co* – comprimento do oviduto; *dd* – ducto deferente; *lbc* – largura da bolsa copuladora; *ldb* – largura do ducto da bolsa copuladora; *le* – largura do epifalo; *lfa* – largura do falo; *lfl* – largura do flagelo; *lo* – largura do oviduto; *pr* – próstata; *ut* – útero. Ilustração: Tércia Vargas

### 3.3.2 Variabilidade intra e interpopulacional do sistema reprodutor e concha de *S. octona*

A análise da variabilidade intrapopulacional, com base nos coeficientes de variação, mostrou que o *cfl* foi a medida linear mais variável (em três de cinco populações) e as medidas menos variáveis foram *ccp* e *co* (ambas em duas de cinco populações), seguidas por *ai* (em uma de cinco populações) (Tabela 9). O *ccp* apresentou valores de coeficiente de variação menores ou iguais aos de suas partes componentes (*cfa*, *ce* e *cfl*) em todas as populações. Dentre as razões, a que mais variou foi *cfl/ce* (quatro de cinco populações) e a que menos variou foi *co/(cbc+cdb)* (quatro de cinco populações) (Tabela 9).

As populações com maior variação interna para os valores de medidas lineares do sistema reprodutor foram LEO (27%±10) e RJ (27%±15) enquanto BM (19%±10) foi a menos variável (Tabela 9). Para as razões, a população mais variável foi LEO (37%±9) e a menos variável foi BM (25%±13). As razões apresentaram maiores coeficientes de variação

que as medidas lineares considerando cada população isoladamente, variando de 25% (BM) a 37% (LEO) e de 19% (BM) a 27% (LEO e RJ), respectivamente. A análise dos coeficientes de variação das medidas da concha de *S. octona* indicou índices menores que aqueles observados para o sistema reprodutor. A média de valores para o índice espiral para o conjunto das populações foi de 9%, oscilando entre 4% em BM e 15% em RJ.

A análise da variabilidade interpopulacional de *S. octona* aos 80 dias de vida, com base na morfometria do sistema reprodutor, mostrou que os moluscos apresentaram padrão anatômico semelhante, mas com características morfométricas distintas (Tabelas 10-11 e Esquema 2). A população de BM foi a que mais apresentou diferenças significativas com as outras populações para as medidas lineares, destacando-se o *cfa* como única medida que não se diferenciou entre BM e as outras populações. CF e RJ foram as populações mais semelhantes dentre os pareamentos possíveis.

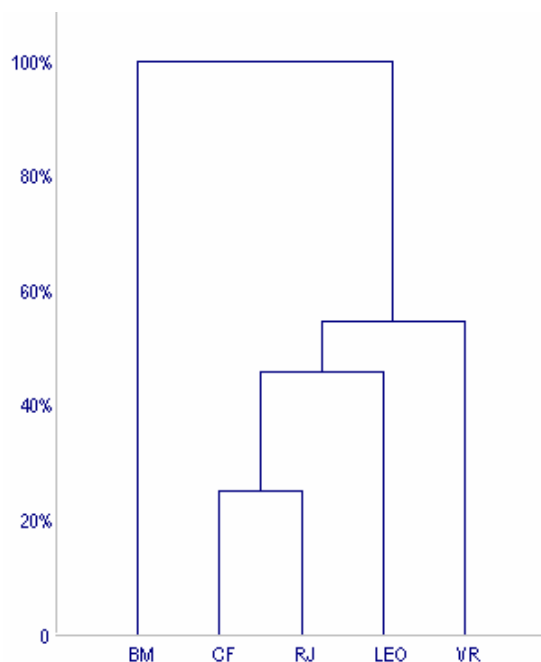
As medidas lineares que mais variaram entre pares de populações foram *ldbc*, *cbc* e *lo*, sendo, portanto, as estruturas mais robustas para diferenciar as populações; a medida menos variável foi *cfa* (Tabela 11). As razões foram menos variáveis interpopulacionalmente que as medidas lineares. Para as razões, as mais variáveis interpopulacionalmente foram  $ccp/(cdbc+cbc)$  e  $co/(cbc+cdbc)$  e a menos variável foi *ccp/ai*.

Foi possível distinguir morfotipos para cada localidade, diferenciados por no mínimo três (morfotipo CF x RJ) e no máximo 13 (morfotipo BM x LEO) das 14 medidas lineares e no mínimo três (morfotipo RJ x VR) e no máximo sete (morfotipo CF x VR) das oito razões analisadas, de acordo com os resultados do teste ANOVA (Tabela 11). O morfotipo BM se diferenciou dos demais em média por 12 medidas lineares e cinco razões; VR por nove medidas e cinco razões; LEO por sete medidas e quatro razões; CF se diferenciou por seis medidas e cinco razões e RJ por seis medidas e quatro razões. Para as medidas lineares, a população de BM apresentou-se como um grupo diferenciado em quase todas as estruturas, exceto *cfa*, *lfa* e *cfl*, para as quais se agrupou com outras populações. Assim, este foi o morfotipo mais diferenciado, tendo os maiores valores de medidas lineares dentre as populações. O pareamento mais comumente observado para medidas lineares foi entre as populações CF e RJ, que se diferenciaram somente para as medidas *ldbc*, *le* e *lo*.

Para as razões, não foi observado um padrão claro de agrupamentos, incluindo BM que deixou de formar um morfotipo individualizado conforme observado para as medidas lineares (Tabela 11). Os pareamentos mais comuns foram CF-RJ e RJ-VR. O par CF-RJ foi observado nas razões *cfl/ce*,  $cfl/(ce+cfa)$ ,  $ccp/(cdbc+cbc)$ ,  $co/(cbc+cdbc)$  e *co/lo*. O par RJ-VR foi observado nas razões  $co/(cbc+cdbc)$ , *co/lo*, *cbc/lbc*, *ccp/ai* e *lo/lfa*.

A análise de conglomerados mostrou a formação de um grupo-irmão entre as populações de CF-RJ, seguido por LEO e VR, com BM como grupo externo a todas as outras populações (Gráfico 5).

A análise da função discriminante para diferentes estruturas do sistema reprodutor de *S. octona* mostrou uma clara tendência à separação da população de BM das outras populações, com sobreposição de apenas alguns indivíduos (Gráfico 6a-d). Para a bolsa copuladora (Gráfico 6a), as populações RJ e VR apresentaram grande sobreposição no gráfico, enquanto LEO e BM apresentaram uma variação interna bastante pronunciada. Para o complexo peniano (Gráfico 6b), a variação interna foi semelhante entre as populações, sendo mais variável que para a bolsa copuladora. Para o oviduto (Gráfico 6c), BM-LEO e BM-RJ foram os únicos pares populacionais não conectados, enquanto BM e CF apresentaram considerável variação interna no gráfico. Para o conjunto *ai-ccp-co* (Gráfico 6d), todas as populações, exceto BM, mostraram grande sobreposição de indivíduos.



**Gráfico 5:** Análise de conglomerados baseada em medidas lineares e relações morfométricas de estruturas do sistema reprodutor de *Subulina octona* de cinco populações aos 80 dias de vida. BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR.

**Tabela 9:** Coeficientes de variação (%) para medidas lineares de estruturas do sistema reprodutor de *Subulina octona* de cinco populações aos 80 dias de vida.

Coeficiente de variação (%)															
	<i>cdbc</i>	<i>ldbc</i>	<i>ai</i>	<i>cbc</i>	<i>lbc</i>	<i>cfa</i>	<i>lfa</i>	<i>ce</i>	<i>le</i>	<i>cfl</i>	<i>lfl</i>	<i>ccp</i>	<i>co</i>	<i>lo</i>	Média populacional
BM	30	24	10	22	22	14	12	18	16	45	23	14	8	10	19±10
CF	32	27	15	32	31	22	29	26	23	38	30	20	16	29	26±6
LEO	37	34	16	45	37	23	21	23	16	37	24	14	15	35	27±10
RJ	32	38	12	34	59	16	31	16	16	40	21	11	12	46	27±15
VR	26	25	9	20	22	20	15	17	17	37	25	12	8	32	20±8
Média±															
Desvio padrão	31±4	30±6	12±3	30±10	34±15	19±4	22±8	20±4	17±3	39±4	25±3	14±3	12±4	31±13	
	<i>cfl/ce</i>	<i>cfl/(ce+cfa)</i>	<i>ccp/(cdbc+cbc)</i>	<i>co/(cbc+cdbc)</i>	<i>co/lo</i>	<i>cbc/lbc</i>	<i>ccp/ai</i>	<i>lo/lfa</i>	Média populacional						
BM	46	46	21	13	16	24	25	13	25±13						
CF	52	47	26	23	22	33	21	33	32±12						
LEO	49	44	29	23	33	41	32	45	37±9						
RJ	44	41	31	10	63	30	26	41	36±15						
VR	42	42	24	16	28	20	20	37	29±10						
Média±															
Desvio padrão	46±4	44±2	26±4	17±6	32±18	29±8	25±5	34±12							

**Legenda:** *ai* – altura da inserção da bolsa copuladora no oviduto; *cbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ccp* – comprimento do complexo peniano; *cdbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ce* – comprimento do epifalo; *cfa* – comprimento do falo; *cfl* – comprimento do flagelo; *co* – comprimento do oviduto; *lbc* – largura da bolsa copuladora; *ldbc* – largura do ducto da bolsa copuladora; *le* – largura do epifalo; *lfa* – largura do falo; *lfl* – largura do flagelo; *lo* – largura do oviduto.

**Tabela 10:** Medidas lineares e razões (média ± desvio padrão) de estruturas do sistema reprodutor de *Subulina octona* de cinco populações aos 80 dias de vida.

	Medidas lineares (média ± desvio padrão)							
	<i>cdbc</i>	<i>ldbc</i>	<i>ai</i>	<i>cbc</i>	<i>lbc</i>	<i>cfa</i>	<i>lfa</i>	
BM	0,39±0,12b	0,13±0,03c	2,34±0,23c	0,61±0,14d	0,34±0,07d	0,40±0,05ab	0,19±0,02d	
CF	0,25±0,08a	0,09±0,03b	1,54±0,24a	0,31±0,10b	0,14±0,04bc	0,36±0,08a	0,16±0,05bc	
LEO	0,24±0,09a	0,10±0,03b	1,48±0,24a	0,41±0,18c	0,17±0,06c	0,39±0,09ab	0,13±0,03a	
RJ	0,24±0,08a	0,07±0,03a	1,54±0,18a	0,25±0,09ab	0,12±0,07ab	0,36±0,06a	0,16±0,05b	
VR	0,26±0,07a	0,07±0,02a	1,66±0,15b	0,22±0,04a	0,12±0,03a	0,42±0,08b	0,18±0,03c	
	<i>ce</i>	<i>le</i>	<i>cfl</i>	<i>lfl</i>	<i>ccp</i>	<i>co</i>	<i>lo</i>	
BM	1,68±0,29c	0,08±0,01c	0,27±0,12c	0,07±0,02b	2,34±0,33b	2,77±0,21c	0,43±0,04d	
CF	1,09±0,28a	0,07±0,01b	0,23±0,09bc	0,05±0,01a	1,68±0,33a	1,88±0,30ab	0,25±0,07b	
LEO	1,19±0,27a	0,06±0,01a	0,19±0,07ab	0,05±0,01a	1,74±0,25a	1,80±0,26a	0,30±0,10c	
RJ	1,13±0,18a	0,06±0,01a	0,23±0,10bc	0,05±0,01a	1,72±0,19a	1,86±0,22a	0,20±0,09a	
VR	1,32±0,22b	0,06±0,01a	0,17±0,06a	0,05±0,01a	1,90±0,24b	2,00±0,16b	0,23±0,08ab	
	Razões (média ± desvio padrão)							
	<i>cfl/ce</i>	<i>cfl/(ce+cfa)</i>	<i>ccp/(cdbc+cbc)</i>	<i>co/(cbc+cdbc)</i>	<i>co/lo</i>	<i>cbc/lbc</i>	<i>ccp/ai</i>	<i>lo/lfa</i>
BM	0,16±0,07a	0,13±0,06b	2,43±0,58a	2,86±0,70a	6,47±0,87a	1,85±0,38a	1,01±0,13a	2,34±0,37b
CF	0,22±0,11c	0,16±0,08c	3,20±1,06b	3,52±0,75b	7,98±2,61a	2,22±0,57b	1,11±0,25ab	1,64±0,35a
LEO	0,17±0,08ab	0,13±0,06ab	2,93±1,19b	3,04±0,97a	6,79±3,06a	2,49±0,72b	1,22±0,28c	2,32±0,75b
RJ	0,21±0,09bc	0,16±0,07bc	3,88±1,16c	4,04±1,06c	11,36±4,67b	2,45±0,75b	1,12±0,11abc	1,36±0,85a
VR	0,13±0,06a	0,10±0,04a	4,04±0,80c	4,27±0,84c	9,77±3,65b	1,87±0,45a	1,15±0,19bc	1,30±0,37a

**Legenda:** *ai* – altura da inserção da bolsa copuladora no oviduto; *cbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ccp* – comprimento do complexo peniano; *cdbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ce* – comprimento do epifalo; *cfa* – comprimento do falto; *cfl* – comprimento do flagelo; *co* – comprimento do oviduto; *lbc* – largura da bolsa copuladora; *ldbc* – largura do ducto da bolsa copuladora; *le* – largura do epifalo; *lfa* – largura do falto; *lfl* – largura do flagelo; *lo* – largura do oviduto.

**Tabela 11:** Análise de variância ANOVA seguida de teste t entre medidas lineares e razões de estruturas do sistema reprodutor de *Subulina octona* de cinco populações aos 80 dias de vida.

Medidas lineares														
	<i>cdbc</i>	<i>ldbc</i>	<i>ai</i>	<i>cbc</i>	<i>lbc</i>	<i>cfa</i>	<i>lfa</i>	<i>ce</i>	<i>le</i>	<i>cfl</i>	<i>lfl</i>	<i>ccp</i>	<i>co</i>	<i>lo</i>
F=	17,22	21,00	97,91	50,22	82,93	3,16	13,75	28,23	16,58	6,12	15,12	30,74	103,96	42,00
Pareamentos populacionais														
	p (teste t)													
BM-CF	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
BM-LEO	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
BM-RJ	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
BM-VR	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CF-LEO	ns	ns	ns	0,0014	ns	ns	0,0039	ns	0,0426	ns	ns	ns	ns	0,0223
CF-RJ	ns	0,0074	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,0426	ns	ns	ns	ns	0,0170
CF-VR	ns	0,0152	0,0393	0,0200	ns	0,0038	ns	0,0019	0,0485	0,0164	ns	0,0034	ns	ns
LEO-RJ	ns	< 0,001	ns	< 0,001	0,0016	ns	0,0250	ns	ns	ns	ns	ns	ns	< 0,001
LEO-VR	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,0037	ns	< 0,001	0,0483	ns	ns	ns	0,0228	< 0,001	< 0,001
RJ-VR	ns	ns	0,0370	ns	ns	0,0047	0,0246	0,0120	ns	0,0154	ns	0,0229	0,0319	ns
<b>Diferenças</b>	4	8	7	8	6	2	7	7	7	4	4	7	6	8
Razões														
	<i>cfl/ce</i>	<i>cfl/(ce+cfa)</i>	<i>ccp/(cdbc+cbc)</i>	<i>co/(cbc+cdbc)</i>	<i>co/lo</i>	<i>cbc/lbc</i>	<i>ccp/ai</i>	<i>lo/lfa</i>						
F=	4,93	4,73	13,98	15,49	12,87	8,99	4,73	24,58						
Pareamentos populacionais														
	p (teste t)													
BM-CF	0,0085	0,0420	0,0025	0,0038	ns	0,0147	ns	< 0,001						
BM-LEO	ns	ns	0,0364	ns	ns	< 0,001	< 0,001	ns						
BM-RJ	0,0455	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	< 0,001						
BM-VR	ns	0,0395	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	0,0059	< 0,001						
CF-LEO	0,0285	0,0225	ns	0,0327	ns	ns	0,0328	< 0,001						
CF-RJ	ns	ns	0,0239	0,0461	< 0,001	ns	ns	ns						
CF-VR	< 0,001	< 0,001	0,0015	0,0018	0,0326	0,0280	ns	0,0295						
LEO-RJ	ns	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	ns	< 0,001						
LEO-VR	ns	ns	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	ns	< 0,001						
RJ-VR	0,0017	0,0014	ns	ns	ns	< 0,001	ns	ns						
<b>Diferenças</b>	5	5	8	8	6	6	3	7						

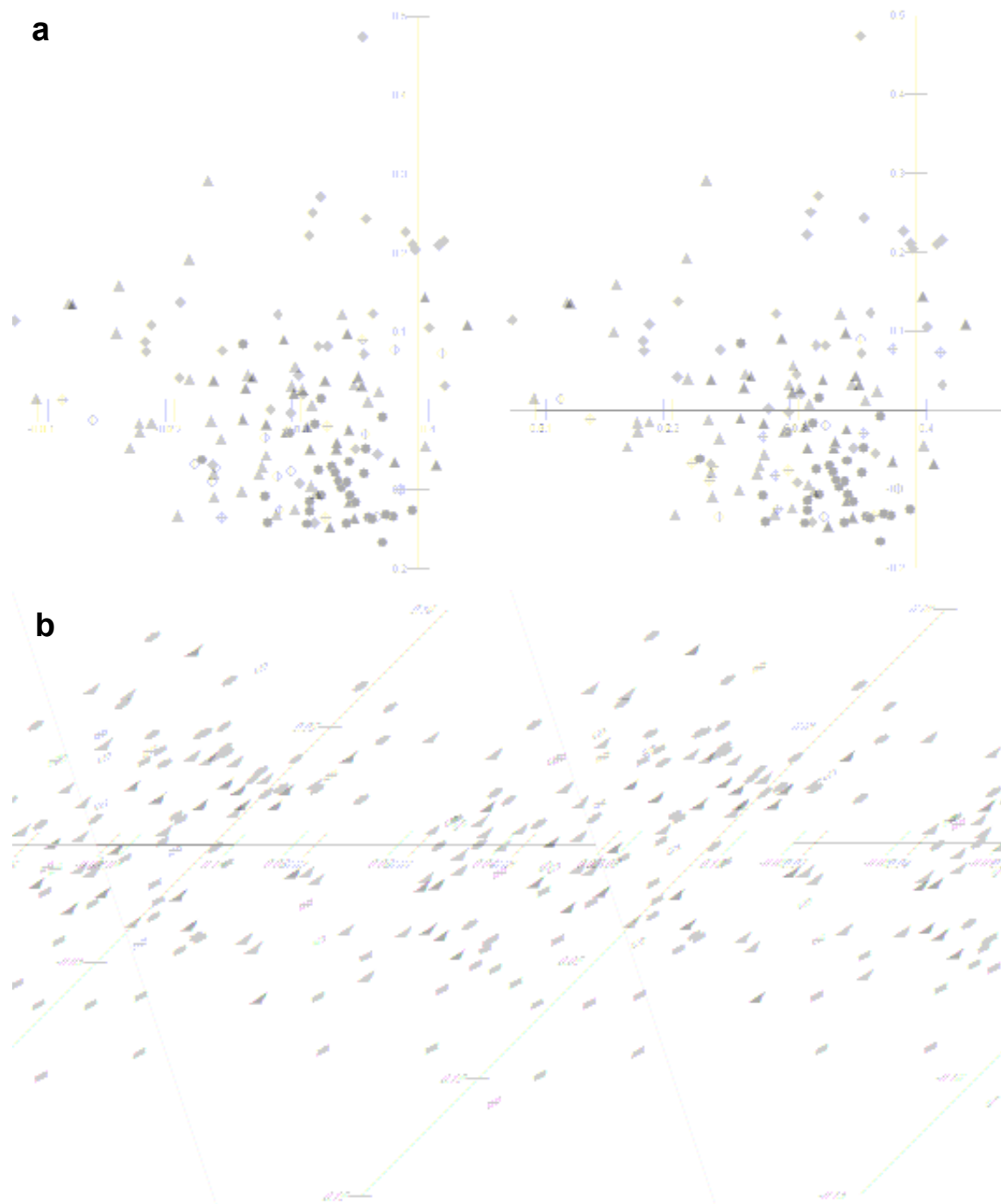
**Legenda:** *ai* – altura da inserção da bolsa copuladora no oviduto; *cbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ccp* – comprimento do complexo peniano; *cdbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ce* – comprimento do epifalo; *cfa* – comprimento do falo; *cfl* – comprimento do flagelo; *co* – comprimento do oviduto; *lbc* – largura da bolsa copuladora; *ldbc* – largura do ducto da bolsa copuladora; *le* – largura do epifalo; *lfa* – largura do falo; *lfl* – largura do flagelo; *lo* – largura do oviduto; ns – não significativo a 5%.

O Componente Principal 1, representado pela relação  $co/lo$ , explicou 82,95% da variação, enquanto o Componente Principal 2, representado pelo  $ccp/(cdbc+cbc)$ , explicou 8,07% da variação nas estruturas do sistema reprodutor de *S. octona*.

A análise de distância Euclidiana entre as medidas lineares e razões do sistema reprodutor entre as populações mostrou que o par CF-RJ apresenta a menor distância (3,13), enquanto a maior distância é entre o par BM-RJ (10,68). O teste de Mantel mostrou que o sistema reprodutor não se correlacionou com a distância geográfica entre as populações ( $r=-0,44$ ;  $p=0,22$ ) nem com a morfometria da concha ( $r=-0,33$ ;  $p=0,35$ ).

A comparação do índice espiral ( $cc/lc$ ) da concha de *S. octona* mostrou a formação de dois morfotipos distintos (Gráfico 7). BM foi a população que se destacou isoladamente com os maiores valores de índice espiral, apresentando concha mais alongada. Com menor índice espiral e, portanto, mais abauladas, agruparam-se as outras quatro populações, CF, LEO, RJ e VR.





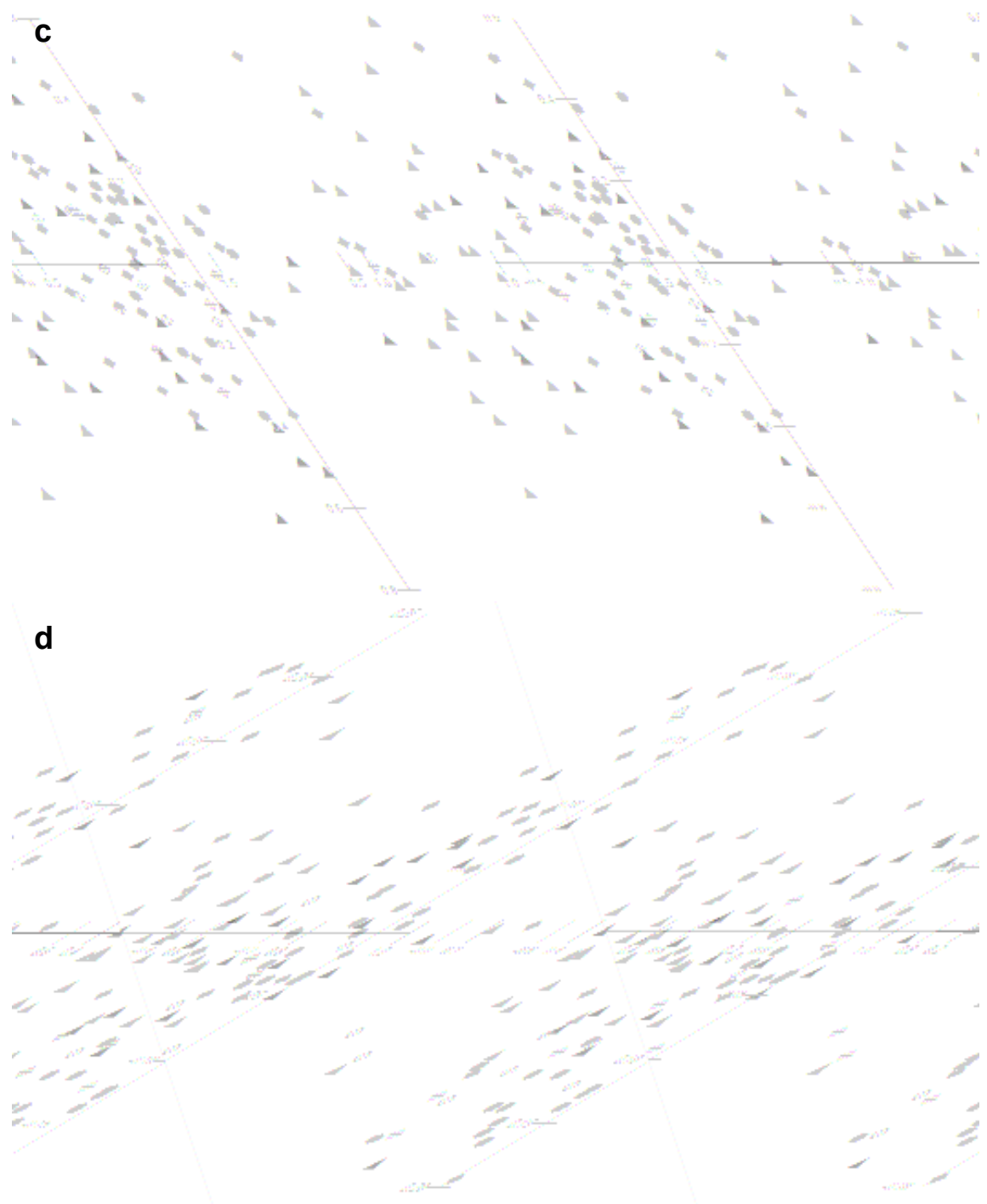
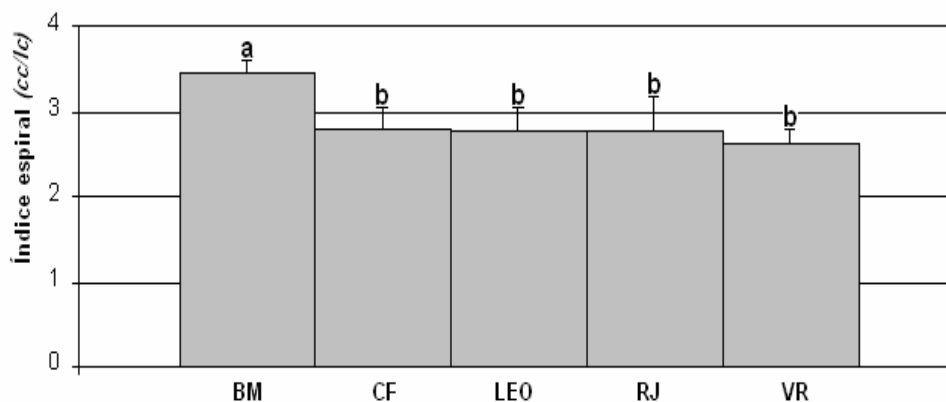


Gráfico 6: continuação



**Gráfico 7:** Índice espiral ( $cc/lc$ ) da concha de *Subulina octona* comparado entre cinco populações. BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR. Letras desiguais indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12:** Medidas lineares e razões das estruturas do sistema reprodutor de *Subulina octona* aos 80 dias de vida comparando-se indivíduos com presença e ausência de ovos no útero.

Ovo no corpo	Medidas lineares (média ± desvio padrão)						
	<i>cdbc</i>	<i>ldbc</i>	<i>ai</i>	<i>cbc</i>	<i>lbc</i>	<i>cfu</i>	<i>lfa</i>
Presente	0,35±0,12a	0,13±0,03a	2,05±0,44a	0,60±0,15a	0,29±0,10a	0,37±0,06a	0,17±0,03a
Ausente	0,25±0,09b	0,08±0,03b	1,61±0,31b	0,29±0,12b	0,14±0,07b	0,39±0,08a	0,16±0,04b
Ovo no corpo	<i>ce</i>	<i>le</i>	<i>cfl</i>	<i>lfl</i>	<i>ccp</i>	<i>co</i>	<i>lo</i>
	Presente	1,49±0,35a	0,07±0,01a	0,24±0,11a	0,06±0,02a	2,10±0,42a	2,47±0,45a
Ausente	1,23±0,31b	0,06±0,01b	0,21±0,09a	0,05±0,01b	1,82±0,32b	1,94±0,35b	0,25±0,10b
Ovo no corpo	Razões (média ± desvio padrão)						
	<i>cfl/ce</i>	<i>cfl/(ce+cfu)</i>	<i>ccp/(cdbc+cbc)</i>	<i>co/(cbc+cdbc)</i>			
Presente	0,16±0,08a	0,13±0,06a	2,27±0,58a	2,68±0,72a			
Ausente	0,18±0,09a	0,13±0,06a	3,63±1,06a	3,80±0,94b			
Ovo no corpo	<i>co/lo</i>	<i>cbc/lbc</i>	<i>ccp/ai</i>	<i>lo/lfa</i>			
	Presente	6,06±1,08a	2,19±0,74a	1,05±0,18a	2,42±0,46a		
Ausente	9,05±3,80b	2,15±0,60a	1,15±0,22b	1,63±0,69b			

**Legenda:** *ai* – altura da inserção da bolsa copuladora no oviduto; *cbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ccp* – comprimento do complexo peniano; *cdbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ce* – comprimento do epifalo; *cfu* – comprimento do fallo; *cfl* – comprimento do flagelo; *co* – comprimento do oviduto; *lbc* – largura da bolsa copuladora; *ldbc* – largura do ducto da bolsa copuladora; *le* – largura do epifalo; *lfa* – largura do fallo; *lfl* – largura do flagelo; *lo* – largura do oviduto.

Aos 80 dias de vida, somente 19% (35 indivíduos) dos indivíduos apresentaram ovos no interior do útero dissecado, sendo 13% (24 indivíduos) presentes na população de BM e 6% (11 indivíduos) em LEO. Estes indivíduos apresentaram maior comprimento e largura de concha ( $F=142,5$ ,  $p<0,001$ ;  $F=68,5$ ,  $p<0,001$ ). Nos indivíduos com ovo no útero, o comprimento médio da concha foi de  $12,89\pm 1,67$ cm e a largura média,  $3,88\pm 0,24$ cm, enquanto naqueles sem ovos estas medidas foram de  $9,40\pm 1,66$ cm e  $3,45\pm 0,31$ cm, respectivamente.

A análise comparada das estruturas do sistema reprodutor entre indivíduos com e sem ovos mostrou que *cfa*, *cfl*, *cfl/ce*, *cfl/(ce+cfa)*, *ccp(cdbc+cbc)* e *cbc/lbc* não apresentaram alteração nos valores quando da presença de ovos (Tabela 12). Dentre todas as estruturas, somente o *cfa* não foi influenciado pelo aumento no *cc* ( $r=-0,03$ ;  $p=0,76$ ) e *lc* ( $r=-0,09$ ;  $p=0,29$ ), sendo que, para todas as outras estruturas analisadas, foi verificada correlação positiva entre conquiliologia e anatomia do sistema reprodutor (Tabela 13).

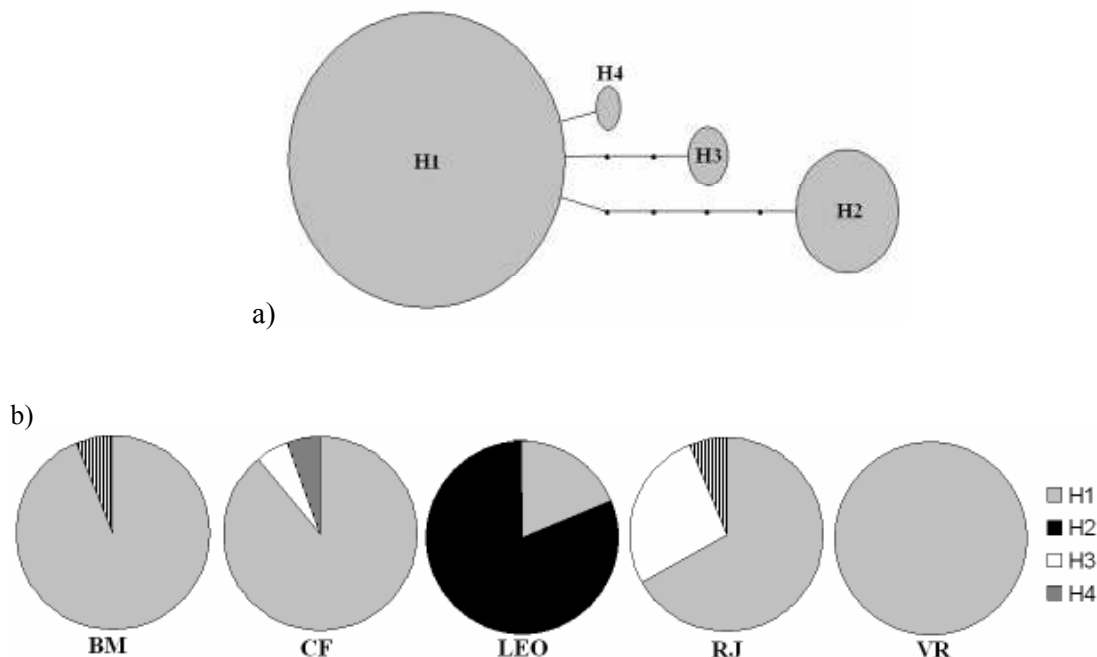
**Tabela 13:** Correlações entre medidas lineares de estruturas do sistema reprodutor e da concha de *Subulina octona*.

	<i>cdbc</i>	<i>ldbc</i>	<i>ai</i>	<i>cbc</i>	<i>lbc</i>	<i>cfa</i>	<i>lfa</i>	
<i>cc</i>	0,58*	0,63*	0,75*	0,79*	0,83*	-0,03	0,41*	
<i>lc</i>	0,55*	0,57*	0,65*	0,75*	0,75*	-0,09	0,39*	
	<i>ce</i>	<i>le</i>	<i>cfl</i>	<i>lfl</i>	<i>ccp</i>	<i>co</i>	<i>lo</i>	<i>cc</i>
<i>cc</i>	0,53*	0,56*	0,27*	0,50*	0,54*	0,78*	0,81*	
<i>lc</i>	0,45*	0,54*	0,32*	0,46*	0,47*	0,68*	0,72*	0,90*

**Legenda:** *ai* – altura da inserção da bolsa copuladora no oviduto; *cbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *cc* – comprimento da concha; *ccp* – comprimento do complexo peniano; *cdbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ce* – comprimento do epifalo; *cfa* – comprimento do falo; *cfl* – comprimento do flagelo; *co* – comprimento do oviduto; *lbc* – largura da bolsa copuladora; *lc* – largura da concha; *ldbc* – largura do ducto da bolsa copuladora; *le* – largura do epifalo; *lfa* – largura do falo; *lfl* – largura do flagelo; *lo* – largura do oviduto. \* valores significativos ( $p<0,05$ ).

### 3.3.3 Variabilidade molecular

A análise dos 374 pares de bases das sequências parciais da subunidade I da citocromo oxidase do mtDNA de cinco populações de *Subulina octona* demonstrou a presença de 4 haplótipos (Gráfico 8; Anexo 1) em 96 indivíduos analisados. O haplótipo 1 foi encontrado em todas as populações, com frequência de 69% dos indivíduos (N=66 indivíduos), sendo que a população de VR foi totalmente representada por este haplótipo. O haplótipo 2 foi encontrado em 22% dos indivíduos (N=21 indivíduos) e foi representado somente na população de LEO. O haplótipo 3 foi representado por indivíduos das populações de CF e RJ e teve frequência de



**Gráfico 8:** Rede de haplótipos (a) e frequências haplotípicas (b) considerando-se quatro diferentes haplótipos – H1, H2, H3 e H4 – em *Subulina octona* de cinco diferentes populações.

6% (N=6 indivíduos) enquanto o haplótipo 4, com 3% de frequência (N=3 indivíduos), incluiu indivíduos das populações de BM, CF e RJ.

Observou-se que a população de LEO apresentou maiores valores de diversidade nucleotídica (Tabela 14). Em seguida, as populações de RJ, CF e BM, com índices intermediários de diversidade nucleotídica e, por último, a população de VR, com índices nulos (devido à presença de um único haplótipo em todos os indivíduos). Observou-se que em LEO, apesar de o número de haplótipos ser menor que em CF e RJ, parte de sua população foi composta por um haplótipo com o maior número de passos de diferenciação em relação ao haplótipo 1, que inclui a maior parte dos indivíduos (Gráfico 8a,b).

Nas amostras analisadas, foram observados dois fenótipos para a coloração da massa cefalopodal dos moluscos, verde e creme. A distribuição dos fenótipos dentre os haplótipos foi aleatória, encontrando-se indivíduos de ambas as colorações no haplótipo 1 e 2. As populações LEO e CF foram as únicas a apresentar polimorfismo para este caráter.

O teste de Neutralidade pelo método Fu' FS (para análise da diversidade nucleotídica) indicou valores não significativos para todas as populações, indicando não ser possível rejeitar a hipótese de que as populações estejam seguindo o modelo de evolução neutra (Tabela 15).

**Tabela 14:** Índices de diversidade intrapopulacional: diversidade nucleotídica, frequência haplotípica e número médio de alelos de cinco populações de *Subulina octona*.

	BM	CF	LEO	RJ	VR
<b>Diversidade Nucleotídica</b>	0,000334 ±0,000605	0,001188 ±0,001240	0,004319 ±0,002942	0,003705 ±0,002670	0,000000 ±0,000000
<b>Frequência Haplotípica</b>	0,94 H1 0,06 H4	0,89 H1 0,055 H3 0,055 H4	0,19 H1 0,81 H2	0,67 H1 0,27 H3 0,06 H4	1,0 H1
<b>Nº médio de alelos</b>	1,003±0,052	1,011±0,103	1,013±0,115	1,011±0,103	1,000±0,000

**Legenda:** BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR.

**Tabela 15:** Teste de neutralidade pelo método Fu' FS (nível de significância 0,05) para cinco populações de *Subulina octona*.

	BM	CF	LEO	RJ	VR
<b>FS</b>	-0,70	-0,51	4,91	1,92	0,00
<b>p (FS simulado &lt;= FS observado)</b>	0,10	0,26	0,97	0,86	-

**Legenda:** BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR.

Os valores de  $F_{ST}$  par-a-par evidenciaram uma estruturação entre a população de LEO e todas as outras (Tabela 16) bem como entre RJ e BM e entre RJ e VR. Valores elevados de  $F_{ST}$  (0,69-0,77) foram observados entre a população LEO e as outras indicando que, em LEO, a diversidade interpopulacional, para todos os pares de populações formados, foi maior que a intrapopulacional. Já para os outros pares populacionais, a variabilidade foi maior entre indivíduos dentro das populações.

Foram observados valores significativos de distância genética entre os seguintes pares populacionais: LEO e cada uma das outras populações, RJ-BM e RJ-VR (Tabela 16). Pelo teste de Mantel não foi verificada correlação entre a distância geográfica e a distância genética para as populações estudadas ( $r=-0,13$ ;  $p=0,72$ ) indicando que o isolamento espacial não explica as diferenças genéticas encontradas.

O dendrograma de Máxima Verossimilhança revelou a presença de quatro agrupamentos (Dendrograma 2). Tais agrupamentos foram equivalentes aos haplótipos, observando-se que o ramo interno correspondente ao haplótipo H3 emergiu do grupo correspondente ao haplótipo H1. O haplótipo H2 formou grupo externo aos outros, com alto valor de *bootstrap*, sendo este o haplótipo com maior número de passos de diferenciação.

**Tabela 16:**  $F_{ST}$  par-a-par (abaixo da diagonal) e distância genética par-a-par (acima da diagonal) para cinco populações de *Subulina octona*.

	<b>BM</b>	<b>CF</b>	<b>LEO</b>	<b>RJ</b>	<b>VR</b>
<b>BM</b>	-	-0,007	3,231*	0,189*	0,000
<b>CF</b>	-0,028	-	3,231*	0,097	0,000
<b>LEO</b>	0,753*	0,738*	-	3,427*	3,231*
<b>RJ</b>	0,189*	0,096	0,692*	-	0,196*
<b>VR</b>	0,008	0,000	0,770*	0,221*	-

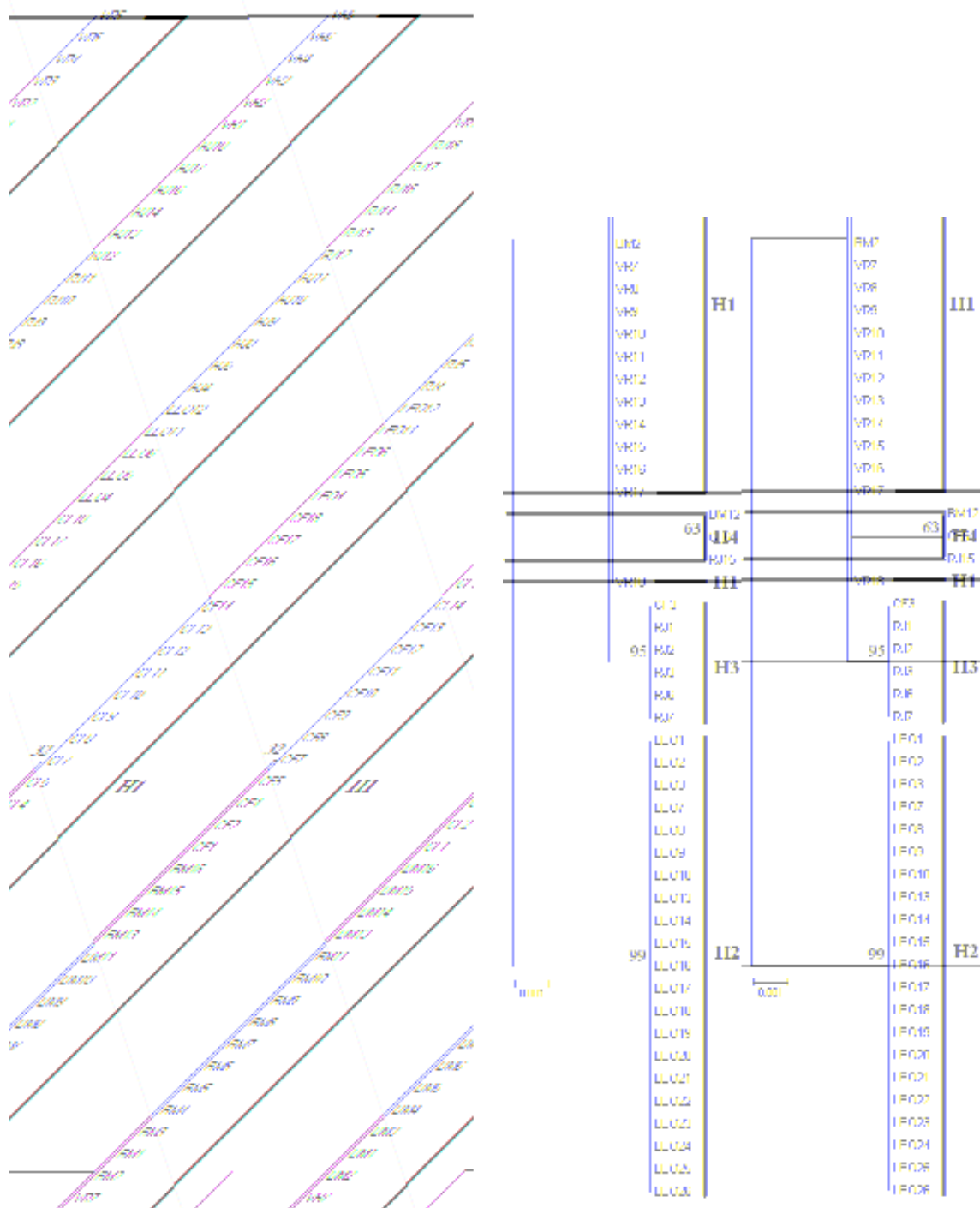
**Legenda:** BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR; \*  $p < 0,05$

A fim de verificar a influência do haplótipo H2 nas análises de  $F_{ST}$  e distância genética, procedeu-se a repetição das mesmas com a retirada deste haplótipo da amostra. Os resultados obtidos evidenciaram que o haplótipo H2 foi o responsável pela estruturação entre LEO e as outras populações uma vez que os índices deixaram de ter valores significativos para ambas as análises (Tabela 17).

**Tabela 17:**  $F_{ST}$  par-a-par (abaixo da diagonal) e distância genética par-a-par (acima da diagonal) para cinco populações de *Subulina octona*, após retirada do haplótipo H2.

	<b>BM</b>	<b>CF</b>	<b>LEO</b>	<b>RJ</b>	<b>VR</b>
<b>BM</b>	-	-0,007	0,00	0,189*	0,00
<b>CF</b>	-0,028	-	0,00	0,097	0,00
<b>LEO</b>	-0,101	-0,103	-	0,196	0,00
<b>RJ</b>	0,189*	0,096	0,075	-	0,196*
<b>VR</b>	0,008	0,000	0,000	0,221*	-

**Legenda:** BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR; \*  $p < 0,05$



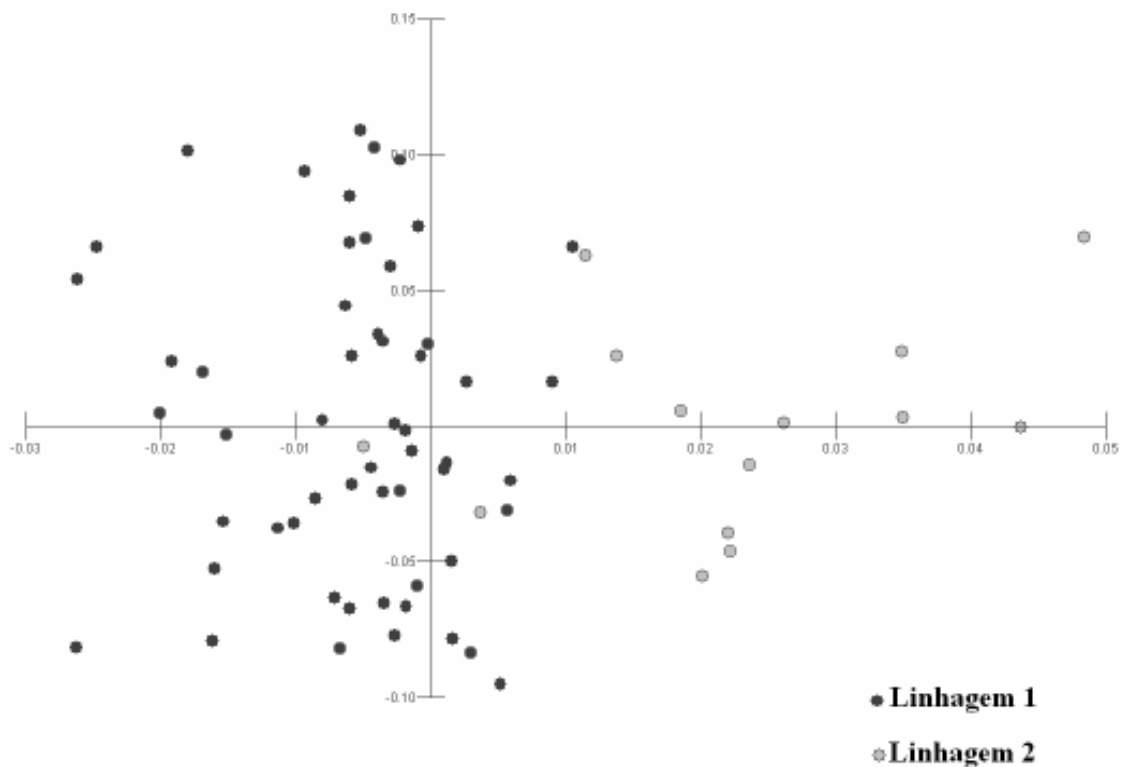
**Dendrograma 1:** Dendrograma de Máxima Verossimilhança para cinco populações de *Subulina octona*. BM – Barra Mansa-RJ; CF – Coronel Fabriciano-MG; LEO – Leopoldina-MG; RJ – Rio de Janeiro-RJ; VR – Volta Redonda-VR.



### 3.3.4 Análise morfométrica comparada entre linhagens de mtDNA em *S. octona*

Tendo em vista o resultado das análises moleculares, procedeu-se a análise comparada da morfometria do sistema reprodutor e concha entre as diferentes linhagens evolutivas observadas. A anatomia do sistema reprodutor não variou entre as linhagens, mas a morfometria permitiu diferir algumas estruturas. Das 14 medidas lineares do sistema reprodutor, cinco se mostraram robustas para diferenciar as linhagens, sendo três da porção feminina (*ai*, *cbc* e *co*) e duas da porção masculina (*lfa* e *le*) (Tabela 18). Para oito razões analisadas, cinco foram diferentes entre as linhagens:  $co/(cbc+cdbc)$ ,  $co/lo$ ,  $cbc/lbc$ ,  $ccp/ai$  e  $lo/lfa$ . As medidas conquirológicas não apresentaram diferença entre as duas linhagens.

A análise discriminante indicou uma forte tendência à separação entre as linhagens com base na morfometria, com intersecção de apenas poucos indivíduos (Gráfico 9).



**Gráfico 9:** Análise discriminante baseada em medidas lineares do sistema reprodutor de *Subulina octona* de duas diferentes linhagens: linhagem 1 (H1+H3+H4) e linhagem 2 (H2).

**Tabela 18:** Medidas lineares e razões de estruturas do sistema reprodutor e concha de *Subulina octona* de duas linhagens: linhagem 1 (H1+H3+H4) e linhagem 2 (H2).

	Medidas lineares						
	<i>cdbc</i>	<i>ldbc</i>	<i>ai</i>	<i>cbc</i>	<i>lbc</i>	<i>cfa</i>	<i>lfa</i>
<b>H1+H3+H4</b>							
Média±desvio padrão	0,28±0,11	0,10±0,04	1,78±0,45	0,36±0,17	0,19±0,12	0,40±0,09	0,17±0,04
Mínimo – Máximo	0,12-0,61	0,04-0,19	0,96-2,68	0,17-0,74	0,05-0,46	0,22-0,63	0,07-0,30
Coefficiente de variação	38	38	25	48	60	22	25
<b>H2</b>							
Média±desvio padrão	0,25±0,08	0,11±0,04	1,50±0,13	0,47±0,19	0,17±0,06	0,37±0,09	0,14±0,03
Mínimo – Máximo	0,13-0,41	0,06-0,19	1,22-1,76	0,24-0,91	0,10-0,26	0,22-0,56	0,07-0,19
Coefficiente de variação	30	35	09	41	32	23	21
* p<0,05			*	*			*
	Medidas lineares						
	<i>ce</i>	<i>le</i>	<i>cfl</i>	<i>lfl</i>	<i>ccp</i>	<i>co</i>	<i>lo</i>
<b>H1+H3+H4</b>							
Média±desvio padrão	1,30±0,38	0,07±0,01	0,20±0,08	0,05±0,02	1,89±0,40	2,13±0,49	0,28±0,12
Mínimo – Máximo	0,64-2,12	0,04-0,09	0,03-0,48	0,03-0,09	1,26-2,76	1,18-3,03	0,06-0,49
Coefficiente de variação	29	20	39	29	21	23	41
<b>H2</b>							
Média±desvio padrão	1,33±0,22	0,06±0,01	0,19±0,08	0,05±0,01	1,86±0,22	1,86±0,11	0,33±0,11
Mínimo – Máximo	0,96-1,75	0,04-0,07	0,09-0,31	0,03-0,07	1,56-2,29	1,61-2,09	0,10-0,47
Coefficiente de variação	17	21	42	24	12	06	34
* p<0,05		*				*	
	Razões						
	<i>cfl/ce</i>	<i>cfl/(ce+cfa)</i>	<i>ccp/(cdbc+cbc)</i>	<i>co/(cbc+cdbc)</i>	<i>co/lo</i>		
<b>H1+H3+H4</b>							
Média±desvio padrão	0,17±0,09	0,13±0,06	3,33±1,11	3,64±1,03	8,56±3,50		
Mínimo – Máximo	0,03-0,54	0,02-0,36	1,65-5,80	2,24-6,35	4,63-21,13		
Coefficiente de variação	53	49	33	28	41		
<b>H2</b>							
Média±desvio padrão	0,15±0,08	0,12±0,06	2,69±1,06	2,81±0,80	6,57±3,32		
Mínimo – Máximo	0,07-0,28	0,05-0,23	1,67-5,59	1,64-4,06	4,03-17,29		
Coefficiente de variação	54	48	39	28	51		
* p<0,05				*	*		
	Razões			Conquiliomorfometria			
	<i>cbc/lbc</i>	<i>ccp/ai</i>	<i>lo/lfa</i>	<i>ce</i>	<i>le</i>	<i>cc/lc</i>	
<b>H1+H3+H4</b>							
Média±desvio padrão	2,07±0,61	1,10±0,22	1,75±0,70	10,16±2,47	3,54±0,39	2,84±0,41	
Mínimo – Máximo	1,14-4,46	0,70-1,81	0,58-4,50	5,05-15,70	2,45-4,20	2,06-3,74	
Coefficiente de variação	30	20	40	24	11	15	
<b>H2</b>							
Média±desvio padrão	2,80±0,57	1,26±0,25	2,54±0,85	9,90±1,43	3,49±0,26	2,83±0,27	
Mínimo – Máximo	2,00-4,13	0,88-1,82	0,78-3,88	7,05-11,70	3,05-3,90	2,27-3,33	
Coefficiente de variação	20	20	34	14	07	10	
* p<0,05	*	*	*				

**Legenda:** *ai* – altura da inserção da bolsa copuladora no oviduto; *cbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ce* – comprimento máximo da concha; *ccp* – comprimento do complexo peniano; *cdbc* – comprimento do ducto da bolsa copuladora; *ce* – comprimento do epifalo; *cfa* – comprimento do falo; *cfl* – comprimento do flagelo; *co* – comprimento do oviduto; H – haplótipo; *lbc* – largura da bolsa copuladora; *lc* – largura máxima da concha; *ldbc* – largura do ducto da bolsa copuladora; *le* – largura do epifalo; *lfa* – largura do falo; *lfl* – largura do flagelo; *lo* – largura do oviduto.

### 3.4 Discussão

#### 3.4.1 Análise da variabilidade morfométrica

A morfologia do sistema reprodutor de *S. octona* foi semelhante entre as populações estudadas, mas a análise da morfometria permitiu observar uma considerável variabilidade entre indivíduos e entre populações.

A variabilidade intrapopulacional, verificada nos valores de coeficientes de variação, demonstrou que as estruturas da porção masculina do sistema reprodutor de *S. octona* apresentaram maiores índices que aquelas da porção feminina, assim como outros autores já observaram (CARR, 2002; KAMEDA et al., 2007). Segundo Eberhard (1985), é esperada maior divergência evolutiva na genitália masculina devido à maior elaboração e variação que esta apresenta. Espécies poliândricas tendem a uma variação ainda maior na genitália masculina do que as monândricas (ARNQVIST, 1998) sendo que aparentemente as cópulas múltiplas são mais frequentes em moluscos terrestres (TOMPA, 1984). A grande variação verificada na porção masculina do sistema reprodutor de *S. octona* pode ser reflexo da seleção sexual e ainda do sistema de acasalamento, embora não tenham sido encontrados na literatura relatos para *S. octona*.

Apesar da pequena variação observada para o *ccp*, observou-se que suas partes componentes foram mais variáveis que a medida total em todas as populações, com destaque para o *cfl* que foi a medida com maiores valores de coeficiente de variação na maioria das populações. Sabe-se que o flagelo e o epifalo são importantes componentes responsáveis pela produção do espermátóforo em algumas espécies (BREURE & ESKENS, 1977; BAMINGER & HAASE, 2000) e que o tamanho do espermátóforo produzido interfere diretamente no sucesso reprodutivo do doador (LIND, 1973). Assim, acredita-se que a seleção sexual seja mais acentuada nas partes componentes (*cfl* e *ce*) do que no tamanho do total do complexo peniano e que seja direcional, atuando em favor de moluscos com maiores flagelos e epifalos, que possibilitariam a formação de espermátóforos maiores.

Foi observada pequena variação intrapopulacional para *ccp*, *co* e *ai*, e ainda que essas estruturas estão fortemente correlacionadas no mesmo indivíduo. É esperado que, em espécies hermafroditas, o efeito da seleção sexual seja menor do que em espécies gonocóricas uma vez que estruturas masculinas e femininas não podem evoluir de forma totalmente independente (MORGAN, 1994). Nesse caso, a seleção sexual possivelmente é mais intensa na pós-cópula que na pré-cópula, alterando o sucesso reprodutivo dos indivíduos. Estudando o

comportamento de cópula de *Succinea putris*, Dillen et al. (2009) observaram que sua duração era maior que o tempo necessário para transferência do esperma. Os autores atribuíram isso à manipulação do receptor pelo parceiro doador, que introduz a ponta do pênis na entrada da bolsa copuladora impedindo a digestão do esperma, aumentando assim a sobrevivência dos espermatozoides. Se isso for válido para *S. octona* é esperado que a relação entre *ccp* e *ai* tenha influência sobre tal comportamento e, em última análise, sobre o sucesso reprodutivo.

No caso de espécies produtoras de espermatóforo, a relação entre o comprimento do complexo peniano e altura da inserção da bolsa copuladora tem importante papel como barreira reprodutiva. Caso o complexo peniano não consiga alcançar a bolsa copuladora do parceiro, a deposição do espermatóforo na luz do oviduto não permitirá sua digestão pelas enzimas da bolsa copuladora e, conseqüentemente, os espermatozoides do doador confinados no seu interior serão perdidos.

A maior variação nos valores de medidas de estruturas reprodutivas comparado às conquiliológicas vem sendo relatada por vários autores (ARNQVIST, 1998; BAMINGER & HAASE, 2000) e é uma tendência esperada para estruturas sexualmente selecionadas (ARNQVIST, 1998). Por estarem diretamente relacionadas ao sucesso reprodutivo, características favoráveis do trato reprodutivo são rapidamente fixadas na população, aumentando sua frequência dentro das populações e podendo acelerar processos de especiação.

No presente trabalho não foi possível diferenciar claramente os morfotipos populacionais com base na anatomia do sistema reprodutor a despeito da ampla variabilidade interpopulacional observada quando se analisou a morfometria. Foi verificada uma tendência à diferenciação de BM com base em análises multivariadas de estruturas reprodutivas e também no índice espiral da concha, sendo que para ambas as características esta população apresentou maiores medidas. Comparando-se as populações, observou-se que o tamanho das estruturas foi mais variável que a forma, devido ao fato de as medidas lineares terem sido mais variáveis que as razões. No entanto, tal diferenciação não foi corroborada pela análise do DNA mitocondrial.

As populações de BM e LEO foram as únicas a apresentar ovos no útero, sendo que a criação dos moluscos foi padronizada e, na idade pré-definida para dissecação (baseado em BESSA & ARAÚJO, 1995a; D'ÁVILA & BESSA, 2005b), era esperado que os moluscos estivessem maduros. Isso provavelmente aconteceu como reflexo da maior taxa de crescimento desses indivíduos. Moluscos da espécie *Neohelix major* (Binney, 1837) criados em laboratório apresentaram variação intraespecífica para o alcance da maturidade, que

também foi relacionado ao tamanho da concha, além do fato de a porção masculina ter amadurecido antes da feminina mesmo quando ambas pareciam estar maduras (CUEZZO, 1990).

O tempo de surgimento de ovos no útero de *S. octona*, de acordo com a literatura, varia de 43 (BESSA & ARAÚJO, 1995a) a 59 dias (D'ÁVILA & BESSA, 2005b) em laboratório, com variação no comprimento da concha quando do alcance da maturidade (D'ÁVILA & BESSA, 2005b) para populações da cidade de Juiz de Fora-MG. Em campo, na mesma cidade, foram encontrados ovos no corpo em moluscos com comprimento de concha de 8,3mm (ALMEIDA & MOTA, 2011), que é menor que o comprimento médio para todas as populações analisadas no presente trabalho ao término do experimento (de 8,76mm em VR a 13,93mm em BM).

Variações na história de vida e morfologia dos moluscos podem ser encontradas mesmo quando não há variação genética. Estudando diferentes populações do molusco terrestre *Oreohelix cooperi* (Binney, 1859), Anderson et al. (2007) observaram que, apesar da aparente semelhança genética (WEAVER et al., 2006), a morfologia da concha foi diferenciada. Tal observação foi atribuída às diferenças na média anual de temperatura e à densidade de conchas nos diferentes ambientes.

A diferenciação entre populações foi mais pronunciada em estruturas da porção feminina do sistema reprodutor de *S. octona* (bolsa copuladora e oviduto). Variações na bolsa copuladora podem acarretar em alterações no processo de digestão do espermatóforo pelo molusco receptor (BEESE et al., 2006b) e, conseqüentemente, no sucesso reprodutivo dos espermatozoides inseridos pelo doador. Beese et al. (2006b) atribuíram a variação no comprimento do divertículo da bolsa copuladora à coevolução antagônica entre este e o comprimento do espermatóforo, uma vez que, quanto mais próxima a ponta do espermatóforo fica do canal vaginal, maior o sucesso dos espermatozoides. Por outro lado, quanto mais longo o divertículo, maior a distância que o espermatozoide tem de percorrer até atingir a espermateca. Esta análise pode ser comparada para a bolsa copuladora uma vez que esta (e o divertículo) tem função de digestão espermática (GOMES et al., 1991) e que moluscos desprovidos de divertículo realizam todo o processo na bolsa (GOMES et al., 1991; BEESE et al., 2006b). Se a pressão de seleção é forte para estas estruturas, isso pode acarretar numa diferenciação mais rápida entre populações.

A despeito da grande variabilidade interpopulacional no oviduto, esta se trata de uma estrutura com função secundária, que não desempenha um papel primordial para o sucesso da cópula. Apesar de a largura do oviduto ter apresentado considerável variação

interpopulacional, tal estrutura apresenta um tecido flexível, que deve permitir grande expansão para a passagem dos ovos, que tem tamanho médio de 2,0x1,6mm (ARAÚJO & BESSA, 1993). Assim, acredita-se que não atue como importante barreira para a cópula. Da mesma forma, a pequena variação interpopulacional observada na razão *ccp/ai* indica não haver significativas barreiras reprodutivas estruturais que gerem incompatibilidade reprodutiva. Modificações estruturais que afetam negativamente o sucesso reprodutivo contribuem para o isolamento reprodutivo interpopulacional e podem culminar em especiação (MILLER & PITNICK, 2002).

Além do isolamento por barreiras reprodutivas estruturais, o isolamento reprodutivo pode ter ainda um aspecto comportamental. Apesar da semelhança morfológica do sistema reprodutor, e consequente compatibilidade (que seria o caso, por exemplo, do par CF-RJ) é possível que mecanismos comportamentais atuem na identificação de indivíduos de diferentes origens populacionais. Em *Arianta arbustorum* (Linnaeus, 1758), espécie hermafrodita auto-incompatível, foi observada tendência à preferência por cópulas intrapopulacionais sendo que, em alguns casos de cópulas interpopulacionais, foi verificada redução na fertilidade (BAUR & BAUR, 1992). Outras espécies como *Archachatina marginata* (Swainson, 1821) de diferentes populações também apresentaram padrão de preferência heterotípica para cruzamentos (OGBU & UGWU, 2011), mas isso pode não acontecer da mesma maneira para outras espécies. Tais diferenças à propensão para cópula são consideradas por alguns autores como um primeiro estágio para isolamento reprodutivo (MEFFERT & BRYANT, 1991).

### 3.4.2 Análise da variabilidade molecular

A análise dos haplótipos do mtDNA das cinco populações de *S. octona* estudadas evidenciou considerável variabilidade, fornecendo indícios de como se distribui nas populações naturais. Os índices de diversidade revelaram diferenças entre e dentro das populações de *S. octona*. A variabilidade intrapopulacional, bastante marcada na população de LEO, é consequência principalmente da maior diferenciação de um dos haplótipos (H2) em relação aos demais.

O teste de Neutralidade mostrou que não se pode descartar a possibilidade de as populações estarem seguindo o modelo de evolução neutra proposto por Kimura (1983). Segundo este modelo, grande parte das diferenças observadas entre sequências de nucleotídeos seria resultado da fixação de mutações neutras por deriva gênica. Conforme esperado para genes que codificam para funções mitocondriais, as substituições aconteceram

na terceira posição do códon (CARLINI et al., 2001). As mutações ocorridas nas sequências do gene COI de *S. octona* não alteram a produção de aminoácidos, sendo consideradas mutações silenciosas.

Além da ação da deriva gênica, é necessário considerar o sistema de reprodução da espécie. *Subulina octona* é uma espécie hermafrodita que apresenta elevada taxa de autofecundação e viabilidade da prole (BESSA & ARAÚJO, 1995a,b; D'ÁVILA & BESSA, 2005a), caracterizando um grau máximo de endogamia, embora não se saiba se há alteração do *fitness* reprodutivo devido à depressão endogâmica. O hábito agregativo (D'ÁVILA et al., 2006) e a reduzida dispersão ativa observados reduzem a contribuição da recombinação nos mecanismos que geram variabilidade, pois aumentam a chance de acasalamento entre indivíduos aparentados. Tais características, aliadas ao grande potencial colonizador de novos ambientes (LODGE, 1993), permitiram a ampla distribuição da espécie ao redor do mundo.

Se por um lado a deriva genética estaria atuando nas populações associada à endogamia elevada, por outro se verifica a formação de novos sítios colonizados por um ou poucos indivíduos e onde é prevista baixa diversidade devido ao efeito do fundador (DLUGOSCH & PARKER, 2008). No entanto, outras espécies da mesma família, como *R. decollata*, que realizam autofecundação a níveis expressivos, apresentam significativo sucesso em colonizações a despeito da reduzida variabilidade observada (SELANDER & KAUFMAN, 1973).

Acredita-se que a distribuição das frequências alélicas nas populações analisadas tenha sido influenciada por vários fatores não mutuamente excludentes: (i) tempo de colonização (espécie nativa ou introduzida?) *versus* colonização da área por indivíduos de diferentes origens ou de colonizações múltiplas; (ii) autofecundação alterando os padrões de homo/heterozigose e, aliada à evolução neutra, de diversidade; (iii) uso de geração F1 para montagem do experimento.

(i) Levando-se em conta a localidade tipo de *S. octona* ser o Caribe (BRUGÜIÈRE, 1792), não se sabe se é uma espécie introduzida no Brasil ou se sua distribuição original é mais ampla, incluindo também a América do Sul. Sua presença vem sendo relatada ainda em outros continentes como Europa, África e Austrália (PILSBRY, 1946; HERBERT, 2010). A dispersão passiva no território nacional amplia a distribuição e permite o fluxo gênico entre as populações. Conforme relatado por Dlugosch & Parker (2008), existem poucos dados confiáveis na literatura sobre a origem das espécies invasoras e suas populações, sendo necessárias investigações da variação molecular a fim de comparar diferentes localidades.

Considerando-se a possibilidade de *S. octona* ser uma espécie introduzida na região estudada, a variabilidade encontrada poderia ser consequência de múltiplas introduções, que trouxeram alelos diferentes do *pool* gênico da população de origem ou de um maior número de colonizadores (DLUGOSCH & PARKER, 2008). Quando a colonização se dá em um único evento, a variabilidade esperada para a área colonizada deve ser menor que a da área de origem (STEPIEN et al., 2002), mas aparentemente nem todas as espécies colonizadoras/invasoras se comportam da mesma forma (FACON et al., 2003; DLUGOSCH & PARKER, 2008). Não foi possível traçar uma comparação para *S. octona* pois não foram encontrados trabalhos na literatura que elucidam a variabilidade morfológica e molecular de *S. octona*, nem no Brasil, nem no Caribe.

Pinceel et al. (2005) realizaram a identificação molecular da lesma francesa introduzida nos Estados Unidos, *Arion subfuscus* (Draparnaud, 1805) e verificaram que, dos cinco haplótipos presentes nas populações francesas, somente um foi identificado na nova colônia. A baixa variabilidade devido ao efeito do fundador levou à compreensão de que a introdução é recente, podendo ter ocorrido de outras partes dos EUA e não diretamente da Europa, e que o transporte passivo está expandindo ainda mais a área de ocupação da espécie (MC DONNELL et al., 2011).

Considerando-se a possibilidade de a espécie *S. octona* ser nativa na região estudada, a variabilidade encontrada poderia estar subestimada pela reduzida extensão geográfica analisada tendo em vista sua ampla dispersão no território nacional. Apesar da baixa vagilidade da espécie, o fluxo gênico entre as populações é observado, e a variabilidade encontrada em número de haplótipos (quatro, no total), foi aproximada ao encontrado por Pinceel et al. (2005) para a população de origem de *A. subfuscus* na França (cinco, no total). Dessa forma, não se pode descartar a hipótese de que a espécie *S. octona* seja nativa do continente sul-americano de fato.

Considerando-se qualquer uma das possibilidades acima discutidas (*S. octona* como espécie colonizadora ou como espécie nativa), deve-se analisar se o que se conhece como *S. octona*, no Brasil e ao redor do mundo, trata-se da mesma espécie. Deve-se considerar ainda a possibilidade de que se trate de um complexo de espécies ou mesmo de diferentes subespécies ainda não elucidados na literatura, sendo esta a primeira análise de tal variabilidade. Segundo Facon et al. (2003), uma espécie invasora pode incluir várias espécies similares em morfologia. Para Puillandre et al. (2010), os mecanismos que levam à especiação, principalmente os recentes, nem sempre resultam em espécies morfológicamente distintas.



(ii) É esperado que a autofecundação reduza a variabilidade nas populações (MC CRACKEN & BRUSSARD, 1980). Sabe-se que o tempo para alcance da maturidade em *S. octona* foi semelhante para moluscos isolados e agrupados (BESSA & ARAÚJO, 1995a), mas não se sabe se aqueles mantidos em grupos realizaram de fato fecundação cruzada, nem se o *fitness* reprodutivo é o mesmo para as diferentes estratégias. Se a autofecundação e fecundação cruzada em *S. octona* conferirem o mesmo sucesso reprodutivo, é possível que a primeira estratégia seja utilizada como forma de agrupar e conservar genomas adaptativos (MC CRACKEN & SELANDER, 1980) ou que a última seja preferível por conferir maior variabilidade (MC CRACKEN & BRUSSARD, 1980).

A escolha da estratégia a ser adotada poderá também depender da presença de parceiro para cópula. Para alguns moluscos terrestres, como exemplo, *Tridopsis albolabris* (Say), o isolamento (e conseqüente autofecundação) não só reduziu a variabilidade como também retardou o alcance da maturidade, diminuiu drasticamente o sucesso reprodutivo e a taxa de eclosão da prole (MC CRACKEN & BRUSSARD, 1980). Nesta espécie, indivíduos em populações estabelecidas só realizam autofecundação quando a chance de encontro de parceiro no futuro é muito reduzida. Por outro lado, algumas espécies realizam autofecundação mesmo quando existem parceiros disponíveis. É o caso, por exemplo, do subulinídeo *R. decollata*, um dos moluscos introduzidos com maior sucesso nos Estados Unidos que, apesar da reduzida variabilidade, apresenta uma ampla distribuição no território e um grande número de indivíduos (SELANDER & KAUFMAN, 1973). Esta espécie apresenta hábito e hábitat semelhantes ao de *S. octona*, e mesmo quando não realiza autofecundação, a fecundação cruzada envolve indivíduos proximamente aparentados.

Chen (1993) também encontrou efeito significativo da depressão endogâmica em *A. arbustorum* comparando cópula entre indivíduos aparentados e entre não-aparentados. O autor verificou que, apesar de o número de ovos ter sido semelhante, a eclodibilidade e a sobrevivência dos eclodidos em ambiente natural foi menor na prole de aparentados. A cópula em *S. octona* nunca foi observada devido ao comportamento críptico dos indivíduos que vivem a maior parte do tempo enterrados, além de seu reduzido tamanho. Assim, torna-se necessário analisar com outras ferramentas, como, por exemplo, teste de paternidade, se em *S. octona* existe preferência entre as diferentes estratégias reprodutivas.

(iii) O uso da geração F1 para montagem do experimento pode ter comprometido de alguma forma a distribuição da variabilidade nas populações estudadas. No entanto, tal metodologia foi utilizada visando padronizar as condições experimentais, bem como trabalhar com animais de idades conhecidas a fim de permitir comparações sobre a biologia dos

moluscos estudados. Sabe-se, por exemplo, que a densidade populacional pode interferir na distribuição da variabilidade intrapopulacional para sistema reprodutor e concha (BAMINGER & HAASE, 2000). Além disso, por ser um estudo preliminar sobre a espécie no que diz respeito à abordagem molecular, buscou analisar a viabilidade da utilização da citocromo oxidase I como marcador da variabilidade na espécie.

Em moluscos terrestres, devido à baixa capacidade de dispersão, é comum a formação de estruturas populacionais fortes (PFENNINGER & MAGNIN, 2001). A análise do  $F_{ST}$  e da distância genética demonstraram uma estruturação entre as populações, com significativa separação de LEO das outras populações. Os valores de  $F_{ST}$  entre as outras populações, assim como a presença do haplótipo 1 em todas as populações estudadas e com a maior frequência (69% dos indivíduos) demonstram a ocorrência de fluxo gênico a despeito da distância geográfica entre elas. A exceção é entre os pares populacionais RJ-BM e RJ-VR, cujos valores encontrados ( $F_{ST}=0,189$  e  $F_{ST}=0,221$ , respectivamente) são considerados altos (BALLOUX & LUGON-MOLIN, 2002), indicando um fluxo gênico reduzido. Observou-se que, mesmo dentro da mesma linhagem de COI (Linhagem 1), foi encontrada variação significativa na anatomia do sistema reprodutor, indicando o potencial de diferenciação das populações.

Segundo Hedrick (2005), os padrões de variação entre populações podem resultar de fatores como o tempo de isolamento das populações, o fluxo gênico entre elas, ocorrência de deriva genética e/ou as pressões de seleção que atuam em ambas. A ausência de correlação entre distância geográfica e a distância genética para as populações de *S. octona* estudadas indicam que outros fatores devem estar modelando a evolução dessas populações.

O dendrograma de Máxima Verossimilhança correspondeu ao padrão de distribuição haplotípica do DNA mitocondrial, destacando-se duas linhagens distintas: uma composta pelos haplótipos H1, H3 e H4 (Linhagem 1) e a outra pelo H2 (Linhagem 2), sendo que este último teve 95% de sustentação. A análise da variabilidade intrapopulacional de LEO, do  $F_{ST}$  e da distância genética em relação a outras populações, bem como sua distribuição no dendrograma de Máxima Verossimilhança permite levantar uma questão: seria esta população composta por dois grupos genéticos distintos ou dois táxons diferenciados? Balloux & Lugon-Moulin (2002) assinalaram que variações no  $F_{ST}$  entre 0 e 0,05 indicam pouca diferenciação genética; entre 0,05 e 0,15, indicam diferenciação moderada; entre 0,15 e 0,25, indicam grande diferenciação e maiores que 0,25 indicam uma diferenciação muito grande.

Assim, de acordo com esta classificação, os valores de  $F_{ST}$  encontrados no presente trabalho poderiam sustentar a presença de duas espécies do gênero *Subulina* dentre as

populações estudadas, com base nos índices da população de LEO. A presença de duas linhagens distintas seria sustentada ainda por diferenças morfométricas em várias estruturas do sistema reprodutor, tornando-se assim um forte argumento em favor da separação taxonômica dos grupos observados.

A variação intraespecífica para o DNA mitocondrial em moluscos, em torno de 10-30%, é maior que para outros organismos (THOMAZ et al., 1996). Segundo Chiba (2003), a distância genética média entre algumas espécies, ou até mesmo gêneros de moluscos terrestres, pode ser menor que os níveis máximos de distância genética intraespecífica encontrada em várias espécies. Por isso, como não existem outros trabalhos para *S. octona* que permitam uma comparação mais detalhada, os valores aqui encontrados devem ser vistos com cuidado.

A aparente ausência de barreira reprodutiva entre as populações, tendo em vista a semelhança anatômica do sistema reprodutor (até o nível aqui analisado), e o fluxo gênico entre populações devido ao transporte passivo desses animais, dificultariam uma classificação específica para cada linhagem identificada segundo o conceito biológico de espécies (QUEIROZ, 2005). Torna-se necessário verificar a viabilidade de híbridos férteis oriundos de cruzamentos entre linhagens para *S. octona*. Segundo o conceito evolutivo de espécie, linhagens com identidade independente das outras linhagens e com tendência evolutiva própria (WILEY, 1978) poderiam ser tratadas como espécies.

A análise morfométrica do sistema reprodutor comparado entre as duas linhagens demonstrou significativa diferenciação. Conforme discutido no item 3.4.1 sobre a variabilidade morfométrica, diferenças nas estruturas reprodutivas entre as linhagens poderiam inviabilizar a cópula ou reduzir o sucesso de fecundação, principalmente levando-se em conta a simpatria das linhagens 1 e 2 na população de LEO. Destaca-se aqui a importante relação entre complexo peniano e altura da inserção da bolsa copuladora. Embora a primeira estrutura tenha sido semelhante (na média) entre as linhagens, a segunda não foi, refletindo na diferença na relação entre *ccp/ai*. A diferenciação entre as linhagens ficou ainda mais evidenciada pela análise discriminante, reforçando a idéia de evolução independente das linhagens.

Um fato que chama atenção é que todos os indivíduos da população de LEO que apresentaram ovos no corpo aos 80 dias de vida foram representados pelo haplótipo H2. Tal fato pode estar refletindo uma diferença genética para o alcance da maturidade entre os indivíduos dos diferentes haplótipos, mas deve ser melhor investigada.

Para algumas espécies, a diferenciação morfológica pode ser mínima. É o caso, por exemplo, de lesmas do gênero *Phyllocaulis* Colosi, 1922 analisadas por Gomes et al. (2010). Em uma abordagem filogenética e morfológica, os autores verificaram que duas espécies-irmãs, *P. renschi* Thomé, 1965 e *P. soleiformis* (Orbigny, 1835), a diferença só foi encontrada acessando-se os caracteres radulares. Outro estudo, com espécies de subulinídeos do gênero *Rumina* mostrou que, para *R. decollata* Linnaeus, 1758 e *R. saharica* Pallary, 1901, a única diferença morfológica encontrada foi na forma das lamelas internas do pênis dos moluscos (CARR, 2002). Para outras espécies, a despeito da variação conquiliológica e anatômica, os autores tem verificado a presença de linhagens distintas com base em divergências genéticas. É o caso, por exemplo, do complexo de espécies *Iberus* Montfort, 1810, para o qual Elejalde et al. (2008) conseguiram identificar a presença de quatro diferentes espécies suportadas pela alta divergência genética: *I. gualtieranus* Linnaeus, 1758, *I. carthaginensis* (Rossmassler, 1854), *I. campesinus* (Ezquerria in Pfeiffer, 1846) e *I. alonensis* (Férrusac, 1801).

Não foi encontrada relação direta entre polimorfismo da coloração corporal e as diferenças genéticas observadas nas populações estudadas, nem nos haplótipos de mtDNA. O polimorfismo encontrado somente em CF e LEO não reflete a situação das populações matrizes uma vez que RJ também era polimórfica, sendo que os indivíduos que compuseram o experimento foram obtidos ao acaso na prole das populações matrizes. Segundo Forsman et al. (2008), o polimorfismo da coloração confere vantagens aos heterozigotos e aumenta o sucesso ecológico das espécies. Da mesma forma, populações polimórficas tenderiam a ter mais sucesso se comparadas às populações monomórficas devido à utilização de recursos mais diversificados do ambiente, maior estabilidade populacional e persistência, maior sucesso de colonização e taxa de expansão, que culminam no aumento do potencial evolutivo e de especiação. Tais características podem estar se refletindo nos maiores índices de diversidade encontrados principalmente na população de LEO. São necessárias metodologias adequadas para compreensão da distribuição e herança da coloração corporal nas populações de *S. octona* a fim de explicar sua influência na variabilidade genética.

O ambiente de desenvolvimento pode ter efeito sobre características como a forma da concha (D'ÁVILA & BESSA, 2005b), da rádula (ANDRADE & SOLFERINI, 2006) ou mesmo sobre aspectos da biologia das espécies (D'ÁVILA & BESSA, 2005a,b; KISS et al., 2005). Variações fenotípicas podem ser observadas como resultado da variabilidade genética, da plasticidade fenotípica, ou de ambas (ANDRADE & SOLFERINI, 2006). No entanto, Conde-Padín et al. (2009), verificaram que moluscos provenientes de um determinado ambiente mantiveram as características da concha do ecótipo de origem mesmo quando se

desenvolveram em ambiente diferente. De acordo com estes autores, as diferenças observadas podem ocorrer pela interação entre herança genética e resposta plástica, sendo difícil determinar se tal resposta seria adaptativa. A metodologia utilizada no presente estudo, no entanto, não permitiu analisar se ocorreu alteração plástica na forma da concha de *S. octona* em relação às características de origem de cada população. Foi possível, a partir do presente estudo, verificar que, mesmo criados sobre as mesmas condições, moluscos de diferentes populações apresentaram diferenças na forma da concha e sistema reprodutor, bem como em aspectos da biologia, ao que se pode relacionar às diferenças genéticas intra e interpopulacionais.

A diferenciação morfométrica entre BM e VR não foi corroborada pela análise do mtDNA, uma vez que estas apareceram como grupos-irmãos no dendrograma de Máxima Verossimilhança, além de serem compostas quase que totalmente pelo mesmo haplótipo (H1) e terem distâncias genéticas nulas. Acredita-se que a separação de BM das outras populações com base na morfometria do sistema reprodutor seja reflexo do rápido amadurecimento da porção feminina comparado às outras populações. As populações podem ter respondido de maneira diferente às condições de criação. Além disso, somente a análise da COI pode não ter sido suficiente para explicitar as características da variabilidade da concha e sistema reprodutor nas populações analisadas, que sofrem efeito de genes nucleares. Assim, a análise de outros marcadores, inclusive nucleares, poderia elucidar os padrões observados e melhorar a qualidade das análises.

#### 4 CONCLUSÃO

No presente estudo a conchiliomorfometria permitiu acessar a variabilidade intra e interpopulacional em *S. octona*. O fato de tanto os padrões de crescimento quanto a forma final da concha na idade adulta terem variado entre as populações mesmo que os indivíduos tenham sido criados em condições idênticas, demonstra o importante papel da determinação genética. Uma vez detectada a variabilidade nos padrões conchiliológicos para *S. octona*, torna-se necessário conhecer as características das populações em condições naturais, relacionando-as ao microhabitat, a fim de detectar como pressões ambientais atuam influenciando a forma da concha nesta espécie.

O presente estudo buscou realizar uma primeira abordagem acerca da variabilidade morfológica e molecular apresentada pelo molusco terrestre *S. octona*. A análise da citocromo oxidase I do mtDNA de *S. octona* evidenciou considerável variabilidade genética, mas é interessante que seja associada a outros marcadores a fim de tornar as análises mais robustas. Estudos futuros devem ser conduzidos a fim de detectar variação morfológica em outros sistemas entre as diferentes linhagens, corroborando uma possível diferenciação taxonômica, desvendar a influência da autofecundação na distribuição da variabilidade e compreender os mecanismos envolvidos na evolução de *S. octona*.

## 5 REFERÊNCIAS

ALICATA, J.E. The life cycle of *Posthannostomum galinum* the cecal fluke of poultry. **Journal of Parasitology**, v. 26, n.2, p. 135-143, 1940.

ALICATA, J.E. Parasitic infections of man and animals in Hawaii. **Agricultural Experiment Station University of Hawaii Technical Bulletin**, v. 61, p. 1-138, 1964.

ALMEIDA, M.N.; BESSA, E.C.A. Efeito da densidade populacional sobre o crescimento e a reprodução de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae) e *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 2, n. 1, p. 97-104, 2000.

ALMEIDA, M.N.; MOTA, G.G. Conquiliomorfofometria, ciclo de vida, crescimento alométrico da concha (*Subulina octona* Bruguière, 1789) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de campo. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 5, n. 1, p. 141-151, 2011.

ANDERSON, T.K.; WEAVER, K.F.; GURALNICK, R.P. 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, p. 129-137, 2007.

ANDRADE, S.C.S.; SOLFERINI, V.N. Fine-scale genetic structure overrides macro-scale structure in a marine snail: nonrandom recruitment, demographic events or selection? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 91, p. 23-36, 2007.

ANDRADE, S.C.S.; SOLFERINI, V.N. Transfer experiment suggests environmental effects on the radula of *Littoraria flava* (Gastropoda: Littorinidae). **Journal of Molluscan Studies**, v. 72, p. 111-116, 2006.

ANGELONI, L. Sexual selection in a simultaneous hermaphrodite with hypodermic insemination: body size, allocation to sexual roles and paternity. **Animal Behavior**, v. 66, p. 417-426, 2003.

ANGELONI, L.; BRADBURY, J.W.; CHARNOV, E.L. Body size and sex allocation in simultaneously hermaphroditic animals. **Behavioral Ecology**, v. 13, n. 3, p. 419-426, 2002.

ANTHES, N.; SCHULENBURG, H.; MICHIELS, N.K. Evolutionary links between reproductive morphology, ecology and mating behavior in opisthobranch gastropods. **Evolution**, v. 62, n. 4, p. 900-916, 2007.

ARAÚJO, J.L.B.; BESSA, E.C.A. Moluscos de importância econômica no Brasil. II Subulinidae, *Subulina octona* (Bruguière) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Stylommatophora). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 10, n. 3, p. 489-497, 1993.

ARMBRUSTER, G.F.J.; BERNHARD, D. Taxonomic Significance of Ribosomal ITS1 Sequence Markers in Self-fertilizing Land Snails of *Cochlicopa* (Stylommatophora, Cochlicopidae). **Mitteilungen des Museum für Naturkunde Berlin, Zoologische Reihe**, v. 76, n. 1, p. 11-18, 2000.

- ARMBRUSTER, G.F.J.; HOFER, M.; BAUR, B. Effect of cliff connectivity on the genetic population structure of a rock-dwelling land snail species with frequent self-fertilization. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 325-333, 2007.
- ARNQVIST, G. Comparative evidence for the evolution of genitalia by sexual selection. **Nature**, v. 393, p. 734-736, 1998.
- ARNQVIST, G. The evolution of animal genitalia: distinguishing between hypotheses by single species studies. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 60, p. 365-379, 1997.
- ARRUDA, J.O.A.; GOMES, S.R.; RAMÍREZ, R.; THOMÉ, J.W. Morfoanatomia de duas espécies do gênero *Omalonyx* (Mollusca, Pulmonata, Succineidae) com novo registro para Minas Gerais, Brasil. **Biociências**, v. 14, n. 1, p. 61-70, 2006.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat versão 5.0.– Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. 2007. Disponível em: [www.mamiraua.org.br/downloads/programas](http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas).
- BACKELJAU, T.; BAUR, A.; BAUR, B. Population and conservation genetics. In: BARKER, G.M. (Ed). **The biology of terrestrial molluscs**. London: CABI Publishing, 2001. p. 383-412.
- BAKER. F. The land and fresh-water mollusks of the Stanford Expedition to Brazil. **Proceedings of the Academy Natural Sciences of Philadelphia**, v. 65, p. 618-672, 1913.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 155-165, 2002.
- BAMINGER, H.; HAASE, M. Variation in spermathecal morphology and amount of sperm stored in populations of the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. **Journal of Zoology, London**, v. 249, p. 165-171, 1999.
- BAMINGER, H.; HAASE, M. Variation of distal genitalia in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Pulmonata, Stylommatophora) caused by sexual selection? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 71, p. 599-613, 2000.
- BARKER, G.M. 2001. Gastropods on land: phylogeny, diversity and adaptive morphology. In: BARKER, G.M. (Ed). **The biology of terrestrial molluscs**. London: CABI Publishing, 2001.
- BAUR, B. Patterns of dispersion, density and dispersal in alpine populations of the land snail *Arianta arbustorum* (L.) (Helicidae). **Holarctic Ecology**, v. 9, p. 117-125, 1996.
- BAUR, B. Reproductive biology and mating conflict in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. **American Malacological Bulletin**, v. 23, p. 157-172, 2007.



BAUR, B. Sperm Competition in Molluscs. In: BIRKHEAD, T.R.; MØLLER, A.P. (Eds.) **Sperm Competition and Sexual Selection**. San Diego: Academic Press, 1998. Disponível em: <<http://www.books.google.com.br>> Acesso em: 12 dez. 2011.

BAUR, B.; BAUR, A. Reduced reproductive compatibility in *Arianta arbustorum* (Gastropoda) from distant populations. **Heredity**, v. 69, p. 65-72, 1992.

BEESE, K.; ARMBRUSTER, G.F.J.; BEIER, K.; BAUR, B. Evolution of female sperm-storage organs in the carrefour of stylommatophoran gastropods. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 47, n. 1, p. 49-60, 2008.

BEESE, K.; BAUR, B. Expandable spermatheca influences sperm storage in the simultaneously hermaphroditic snail *Arianta arbustorum*. **Invertebrate Reproduction and Development**, v. 49, n.1-2, p. 93-101, 2006.

BEESE, K.; BEIER, K.; BAUR, B. Bursa tract diverticulum in the hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum* (Stylommatophora: Helicidae): Morphology, function, and evolutionary implications. **Journal of Morphology**, v. 267, p. 940-953, 2006a.

BEESE, K.; BEIER, K.; BAUR, B. Coevolution of male and female reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 19; p. 410-418, 2006b.

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

BESSA, E.C.A.; ARAÚJO, J.L.B. Oviposição, tamanho de ovos e medida do comprimento da concha em diferentes fases do desenvolvimento de *Subulina octona* (Bruguière) (Pulmonata, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 12, n. 3, p. 647-654, 1995b.

BESSA, E.C.A.; LIMA, W.S.; DAEMON, E.; CURY, M.C.; ARAÚJO, J.L.B. Desenvolvimento biológico de *Angiostrongylus vasorum* (Baillet) Kamensky (Nematoda, Angiostrongylidae) em *Subulina octona* Bruguière (Molusca, Subulinidae) em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 1, p. 29-41, 2000.

BOER, H.H.; JOOSSE, J. Endocrinology. In: **Pulmonates: Functional and Physiology**. FRETTER, V.; PEAKE, (Eds.) London: Academic Press, 1975. 1 v., p. 245-307.

BOJAT, N.C.; DIIRRENBARGER, M.; HAASE, M. 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.

BOJAT, N.C.; HAASE, M. Sperm storage in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. **Journal of Zoology, London**, v. 258, p. 497-503, 2002.

BOJAT, N.C.; SAUDER, U.; HAASE, M. Functional anatomy of the sperm storage organs in Pulmonata: the simple spermatheca of *Bradybaena fruticum* (Gastropoda, Stylommatophora). **Zoomorphology**, v. 121, p. 243-255, 2002.

- BRANDOLINI, S.V.P.B.; AMATO, S.B. Desenvolvimento larval de *Paratanaisia bragai* (Santos) (Digenea, Eucotylidae) sob condições experimentais. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, p. 1097-1100, 2006.
- BRANDOLINI, S.V.P.B.; AMATO, S.; PEREIRA, A.A. Relacionamento de *Tanaisia bragai* (Digenea, Eucotylidae) e seu hospedeiro intermediário, *Subulina octona* (Gastropoda, Subulinidae) sob condições experimentais. **Parasitología al día**, v. 21, n. 3-4, 1997.
- BREURE, A.S.H.; ESKENS, A.A.C. Observations on the formation of spermatophores in a Bulimulid land snail, *Drymaeus canaliculatus* (Pfeiffer, 1845) (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). **Netherlands Journal of Zoology**, v. 27, n. 3, p. 271-276, 1977.
- BROWN, W.M. The mitochondrial genome of animals. In: MAC INTYRE, R.J. (Ed.) **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Plenus Press, 1985. p. 95-130.
- BRUGÜIÈRE, J.G. **Encyclopédie méthodique**: Histoire naturelle des vers. Tome premier. [ABE-CON]. - pp. [1-3], j-xviii [= 1-18], 1-757. Paris: Panckoucke, 1792.
- BUSO, G.S.C. **Marcadores moleculares e análise filogenética**. Documentos, 137. Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 22p, 2005.
- CAIN, A.J.; CURREY, J.D. Area effects in *Cepaea*. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B**, v. 246, p. 1-81, 1963.
- CALDEIRA, R.C.; VIDIGAL, T.H.D.A.; MATINELLA, L.; SIMPSON, A.J.G.; CARVALHO, O.S. 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.
- CALDEIRA, R.L.; MENDONÇA, C.L.G.F.; GOVEIA, C.O.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W.S.; MOTA, E.M.; PECORA, I.L.; MEDEIROS, A.M.Z.; CARVALHO, O.S. First record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (Nematoda: Metastrongylidae) in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 887-889, 2007.
- CAMERON, R.A.D. Functional aspects of shell geometry in some British land snails. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 16, p. 157-167, 1981.
- CARLINI, D.B.; CHEN, Y.; STEPHAN, W. The relationship between third-codon position nucleotide content, codon bias, mRNA secondary structure and gene expression in the drosophilid alcohol dehydrogenase genes Adh and Adhr. **Genetics**, v. 159, p. 623-633, 2001.
- CARR, R. Geographical variation o taxa in the genus *Rumina* (Gastropoda: Subulinidae) from the Mediterranean region. **Journal of Conchology**, v. 37, n. 5, p. 569-577, 2002.
- CARVALHO, C.M. **História de vida e variabilidade morfológica e molecular de *Leptinaria unilamellata* (d'Orbigny, 1835) (Mollusca, Pulmonata, Subulinidae)**. 2009.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal)– Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

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, p. 211-222, 2009.

CHEN, A.-H; LI, Z.; FENG, G. Phylogenetic relationships of the genus *Meretrix* (Mollusca: Veneridae) based on mitochondrial COI gene sequences. **Zoological Research**, v. 30, n. 3, p. 233-239, 2009.

CHEN, X. Comparison of inbreeding and outbreeding in hermaphroditic *Arianta arbustorum* (L.) (land snail). **Heredity**, v. 71, p. 456-461, 1993.

CHIBA, S. Character displacement, frequency-dependent selection, and divergence of shell colour in land snails *Mandarina* (Pulmonata). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 66, p. 463-479, 1999.

CHIBA, S. Ecological and morphological patterns in communities of land snails of the genus *Mandarina* from the Bonin Islands. **Journal of Evolutive Biology**, v. 17, p. 131-143, 2004.

CHIBA, S. Species diversity and conservation of *Mandarina*, an endemic land snail of the Ogasawara islands. **Global Environmental Research**, v. 7, p. 29-37, 2003.

CHIBA, S.; DAVISON, A. 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.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS : a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.

CONDE-PADÍN, P.; CABALLERO, A.; ROLÁN-ALVAREZ, E. Relative role of genetic determination and plastic response during ontogeny for shell-shape traits subjected to diversifying selection. **Evolution**, v. 63, n. 5, p. 1356-1363, 2009.

COOK, L.M.; JAFFAR, W.N. Spire index and preferred surface orientation in some land snails. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 21, p. 307-313, 1984.

COWIE, R.H. Climatic selection on body colour in the land snail *Theba pisana* (Pulmonata: Helicidae). **Heredity**, v. 65, p. 123-126, 1990.

COWIE, R.H.; JONES, J.S. Climatic selection on body colour in *Cepaea*. **Heredity**, v. 55, p. 261-267, 1985.

CUEZZO, M.G. Maturation of the reproductive tract of *Neohelix major* (Binney) (Gastropoda: Polygyridae). **American Malacological Bulletin**, v. 8, n. 1, p. 19-24, 1990.

D'ÁVILA, S.; BESSA, E.C.A. Influência do substrato sobre a reprodução de *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 1, p. 197-204, 2005a.

D'ÁVILA, S.; BESSA, E.C.A. Influência do substrato sobre o crescimento de *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 1, p. 205-211, 2005b.

D'ÁVILA, S.; DIAS, R.J.P.; BESSA, E.C.A. Comportamento agregativo em *Subulina octona* (Brugüière) (Mollusca, Subulinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 2, p. 357-363, 2006.

D'ÁVILA, S.; DIAS, R.J.P.; BESSA, E.C.A.; DAEMON, E. Resistência à dessecação em três espécies de moluscos terrestres: aspectos adaptativos e significado para o controle de helmintos. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 6, n. 1, p. 115-127, 2004.

DAVISON, A. The ovotestis: an underdeveloped organ of evolution. **BioEssays**, v. 28, p. 642-650, 2006.

DILLEN, L.; JORDAENS, K.; BACKELJAU, T. Sperm transfer, sperm storage, and sperm digestion in the hermaphroditic land snail *Succinea putris* (Gastropoda, Pulmonata). **Invertebrate Biology**, v. 128, n. 2, p. 97-106, 2009.

DILLEN, L.; JORDAENS, K.; BRUYN, L.; BACKELJAU, T. Fecundity in the hermaphroditic land snail *Succinea putris* (Pulmonata: Succineidae): does body size matter? **Journal of Molluscan Studies**, v. 76, p. 376-383, 2010.

DLUGOSCH, K.M.; PARKER, I.M. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 431-449, 2008.

EBERHARD, W.G. **Sexual selection and the evolution of animal genitalia**. Cambridge: Harvard University Press, 1985.

EBERHARD, W.G.; CORDERO, C. Sexual selection by cryptic female choice on male seminal products - a new bridge between sexual selection and reproductive physiology. **Tree**, v. 10, n. 12, p. 493-496, 1995.

ELEJALDE, M.A.; MADEIRA, M.J.; MUÑOZ, B.; ARRÉBOLA, J.R.; GÓMEZ-MOLINER, B.J. Mitochondrial DNA diversity and taxa delineation in the land snails of the *Iberus gualtieranus* (Pulmonata, Helicidae) complex. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 154, p. 722-737, 2008.

EVANNO, G.; MADEC, L. Variation morphologique de la spermathèque chez l'escargot terrestre *Cantareus aspersus*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 330, p. 722-727, 2007.

EVANNO, G.; MADEC, L.; ARNAUD, J.-F. Multiple paternity and postcopulatory sexual selection in a hermaphrodite: what influences sperm precedence in the garden snail *Helix aspersa*? **Molecular Ecology**, v. 14, n. 3, p. 805-812, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; BALDING, D. Gametic phase estimation over large genomic regions using an adaptive window approach. **Human Genomics**, v. 1, p. 7-19, 2003.

- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. **Arlequin ver 3.1 An integrated software package for population genetics data analysis**. Computational and Molecular Population Lab CMPG, Zoological Institute, University of Berne. 2006. Disponível em: <http://www.cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. Acesso em: 21/06/2011.
- FACON, B.; POINTIER, J.P.; GLAUBRECHT, M.; POUX, C.; JARNE, P.; DAVID, P. A molecular phylogeography approach to biological invasions of the New World by parthenogenetic Thiarid snails. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3027-3039, 2003.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4 ed. Edinburgh: Addison Wesley Longman Ltd., 1996.
- FERREIRA, P.; SOARES, G.L.G.; D'ÁVILA, S.; BESSA, E.C.A. The influence of caffeine and thymol on the survival, growth and reproduction of *Subulina octona* (Brugüiere, 1789) (Mollusca, Subulinidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n. 4, p. 945-952, 2009.
- 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, p. 359-370, 2008.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEN, W.; LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, p. 294-299, 1994.
- FOLTZ, D.W.; OCHMAN, H.; JONES, J.S.; EVANGELIST, S.M.; SELANDER, R.K. Genetic population structure and breeding systems in arionid slugs (Mollusca: Pulmonata). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 17, p. 225-241, 1982.
- FONTANILLA, I.K.C. ***Achatina (Lissachatina) fulica* Bowdich: its molecular phylogeny, genetic variation in global populations, and its possible role in the spread of the rat lungworm *Angiostrongylus cantonensis* (Chen)**. 2010. Thesis (Phylosophy's Doctor)–University of Nottingham, 2010.
- FORD, E.B. Polymorphism. **Biological Reviews**, v. 20, p. 73-88, 1945.
- FORSMAN, A.; AHNESJÖ, J.; CAESAR, S.; KARLSSON, M. A model of ecological and evolutionary consequences of color polymorphism. **Ecology**, v. 89, n. 1, p. 34-40, 2008.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- FREITAS, J.S.; PAULA, D.P.; CARIELLO, M.O. The influence of self-fertilization performance and copulation behaviour in reproduction by cross-fertilization in groups of *Biomphalaria tenagophila* (Mollusca, Planorbidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 6, p. 739-743, 1997.
- FURTADO, M.C.V.; BESSA, E.C.A.; CASTANÕN, M.C.M.N. Ovoteste de *Bradybaena similaris* (Férussac, 1821) (Mollusca, Xanthonychidae): histologia e produção de gametas. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 6, n. 1, p. 7-17, 2004.

- FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.
- GAREFALAKI, M.-E.; TRIANTAFYLLIDIS, A.; ABATZOPOULOS, T.J.; STAIKOU, A. The outcome of sperm competition is affected by behavioural and anatomical reproductive traits in a simultaneously hermaphroditic land snail. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, p. 966-976, 2010.
- GOMES, B.J.; ÂNGULO, E.; ZUBIAGA, A.M. Ultrastructural analysis of the morphology and function of the pulmonate slug *Arion subfuscus*. **Tissue Cell**, v. 23, p.357-365, 1991.
- GOMES, S.R.; SILVA, F.B.; MENDES, I.L.V.; THOMÉ, J.W.; BONATTO, S.L. Molecular phylogeny of the South American land slug *Phyllocaulis* (Mollusca, Soleolifera, Veronicellidae). **Zoologica Scripta**, v. 39, n. 2, p. 177-186, 2010.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001. Disponível em: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm).
- HARRISON, R.G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 6-11, 1989.
- HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of Molecular Evolution**, v. 22, n. 2, p. 160-174, 1985.
- HAUSDORF, B. Is the interspecific variation of body size of land snails correlated with rainfall in Israel and Palestine? **Acta Oecologica**, v. 30, p. 374-379, 2006.
- HAYASHI, M.; CHIBA, S. Intraspecific diversity of mitochondrial DNA in the land snail *Euhadra peliomphala* (Bradybaenidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 70, p. 391-401, 2000.
- HEDRICK, P.W. **Genetics of populations**. Third Edition. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 2005.
- HELLER, J. Hermaphroditism in molluscs. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 48, p. 19-42, 1993.
- HELLER, J. Life history strategies. In: BARKER, G.M. (Ed). **The biology of terrestrial molluscs**. London: CABI Publishing, 2001.
- HERBERT, D.G. **The introduced terrestrial Mollusca of South Africa**. SANBI Biodiversity Series 15. Pretoria: South Africa National Biodiversity Institute, 2010.
- HERSHLER, R.; LIU, H.-P.; LANG, B.K. Genetic and morphologic variation of the Pecos assimineae, an endangered mollusk of the Rio Grande region, United States and Mexico (Caenogastropoda: Risssooidea: Assimineidae). **Hydrobiologia**, v. 579, p. 317-335, 2007.

HYMAN, L.H. **The invertebrates: Mollusca I.** New York: McGraw-Hill Book Company, 1967. v. 6.

HYMAN, I.T.; HO, S.Y.W.; JERMIIN, L.S. Molecular phylogeny of Australian Helicarionidae, Euconulidae and related groups (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) based on mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p. 792-182, 2004.

JABBOUR-ZAHAB, R.; POINTIER, J.P.; JOURDANE, J.; JARNE, P.; OVIEDO, J.A.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S.; ANGLES, R.; PERERA, G.; BALZAN, C.; KHALLAAYOUNE, K.; RENAUD, R. Phylogeography and genetic divergence of some lymnaeid snails, intermediate hosts of human and animal fascioliasis, with special reference to lymnaeids from the Bolivian Altiplano. **Acta Tropica**, v. 64, p. 191-203, 1997.

JARNE, P.; DELAY, B. Inbreeding depression and self-fertilization in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata). **Heredity**, v. 64, p. 169-175, 1990.

JORDAENS, K.; VAN DONGEN, S.; TEMMERMAN, K.; BACKELJAU, T. Resource allocation in a simultaneously hermaphroditic slug with phally polymorphism. **Evolutionary Ecology**, v. 20, p. 535-548, 2006.

JUŘIČKOVÁ, L. *Subulina octona* (Bruguière, 1798) – a new greenhouse species for the Czech Republic (Mollusca: Gastropoda: Subulinidae). **Malacologica Bohemoslovaca**, v. 5, p. 1-22, 2006.

KAMEDA, Y.; KAWAKITA, A.; KATO, M. Cryptic genetic divergence and associated morphological differentiation in the arboreal land snail *Satsuma (Luchuhadra) largillierti* (Camaenidae) endemic to the Ryukyu Archipelago, Japan. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45, p. 519-533, 2007.

KIMURA, M. **The neutral theory of molecular evolution.** Cambridge: Cambridge University Press, 1983. Disponível em: <<http://books.google.com.br/>>. Acesso em: 21/09/2011.

KISS, L.; LABAUNE, C.; MAGNIN F.; AUBRY, S. Plasticity of the life cycle of *Xeropicta derbentina* (Krynicky, 1836), a recently introduced snail in Mediterranean France. **Journal of Molluscan Studies**, v. 71, p. 221-231, 2005.

KOEMTZOPOULOS, E.; STAIKOU, A. 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.

KOENE, J.M. Tales of two snails: sexual selection and sexual conflict in *Lymnaea stagnalis* and *Helix aspersa*. **Integrative and Comparative Biology**, v. 46, n. 4, p. 419-429, 2006.

KOENE, J.M.; MONTAGNE-WAJER, K.; ROELOFS, D.; MAAT, A.T. The fate of received sperm in the reproductive tract of a hermaphroditic snail and its implications for fertilization. **Evolutionary Ecology**, v. 23, p. 533-543, 2009.

KÖHLER, F.; DAMES, C. Phylogeny and systematics of the Pachychilidae of mainland South-East Asia – novel insights from morphology and mitochondrial DNA (Mollusca, Caenogastropoda, Cerithioidea). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.157, p. 679-699, 2009.

KUPFERNAGEL, S.; RUSTERHOLZ, H.-P.; BAUR, B. Variation in multiple paternity and sperm utilization patterns in natural populations of a simultaneous hermaphrodite land snail. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, p. 350-361, 2010.

LAM, P.K.S.; CALLOW, P. Intraspecific life-history variation in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata). I. Field study. **Journal of Animal Ecology**, v. 58, p. 571-588, 1989.

LEONARD, J.L. Sexual selection: lessons from hermaphrodite mating systems. **Integrative and Comparative Biology**, v.46, n.4, p. 349-367, 2006.

LIND, H. The functional significance of the spermatophore and the fate of spermatozoa in the genital tract of *Helix pomatia* (Gastropoda: Stylommatophora). **Journal of Zoology, London**, v. 169, p. 39-64, 1973.

LODGE, D.M. Biological invasions – lessons for ecology. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 133-137, 1993.

MAURO, A; ARCULEO, M.; PARRINELLO, N. Morphological and molecular tools in identifying the Mediterranean limpets *Patella caerulea*, *Patella aspera* and *Patella rustica*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 295, p. 131-143, 2003.

MC CRACKEN, G.F.; BRUSSARD, P.F. Self-fertilization in the white-lipped land snail *Triodopsis Albolabris*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 14, p. 429-434, 1980.

MC CRACKEN, G.F.; SELANDER, R.K. Self-fertilization and monogenic strains in natural population of terrestrial slugs. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v. 77, p. 684-688, 1980.

MC DONNELL, R.J.; RUGMAN-JONES, P.; BACKELJAU, T.; BREUGELMANS, K.; JORDAENS, K.; STOUTHAMER, R.; PAINE, T.; GORMALLY, M. Molecular identification of the exotic slug *Arion subfuscus* sensu stricto (Gastropoda: Pulmonata) in California, with comments on the source location of introduced populations. **Biological Invasions**, v. 13, p. 61-66, 2011.

MEIRELES, L.M.O. **Seleção alimentar e influência de diferentes dietas sobre o crescimento, a reprodução e a sobrevivência de *Bulimulus tenuissimus* (d'orbigny, 1835) (Mollusca, Bulimulidae) em condições de laboratório.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal)–Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2009.

MEIRELES, L.M.O.; SILVA, L.C.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. The influence of diet and isolation on growth and survival in the land snail *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca: Bulimulidae) in laboratory. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 2, p. 224-227, 2008.



MEFFERT, L.M.; BRYANT, E.H. Mating propensity and courtship behavior in serially bottlenecked lines of the housefly. **Evolution**, v. 45, p. 293-306, 1991.

MELO, A.G.C. **Estudos genético-populacionais em *Crassostrea gasar* de cinco estados da costa brasileira baseados em sequências do gene mtDNA COI**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Ambiental) – Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Pará, 2008.

MILLER, G.T.; PITNICK, S. Sperm-female coevolution in *Drosophila*. **Science**, v. 298, p. 1230-1233, 2002.

MINORETTI, N.; BAUR, B. Among- and within-population variation in sperm quality in the simultaneously hermaphroditic land snail *Arianta arbustorum*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 60, p. 270-280, 2006.

MORAIS, A.S.; MARRELLI, M.T. Citocromo c Oxidase I em subespécies do complexo *Culex pipiens* sul americano. In: **Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética**. 30 de agosto a 02 de setembro de 2009, Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort, Águas de Lindóia, SP, Brasil. Disponível em: <<http://www.sbg.org.br>> Acesso em: 26/09/2010.

MORGAN, M.T. Models of sexual selection in hermaphrodites, especially plants. **American Naturalist**, v. 144, p. S100-S125, 1994.

MORITZ, C.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.N. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 269-292, 1987.

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

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. 2012. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> Acesso em: 05 jan. 2012.

NEVO, E.; BAR-EL, C.; BAR, Z. Genetic diversity, climatic selection and speciation of *Sphincterochila* landsnails in Israel. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 19, p. 339-373, 1983.

OGBU, C.C.; UGWU, S.O.C. Evaluation of pre-mating reproductive isolation in *Archachatina marginata* from three populations in the humid tropics. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 65, p. 14669-14677, 2011.

OLIVEIRA, M.P.; ALMEIDA, M.N. **Malacologia**. Juiz de Fora, MG: Editar Editora Associada, 2000.

OZGO, M. Rapid evolution in unstable habitats: a success story of the polymorphic land snail *Cepaea nemoralis* (Gastropoda: Pulmonata). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 102, p. 251-262, 2011.

- OZGO, M.; KINNINSON, M.T. Contingency and determinism during convergent contemporary evolution in the polymorphic land snail, *Cepaea nemoralis*. **Evolutionary Ecology Research**, v. 10, p. 721-733, 2008.
- PADILLA, D.K. Form and function of radular teeth of herbivorous molluscs: Focus on the future. **American Malacological Bulletin**, v. 18, n. ½, 2003.
- PERRY, R.; ARTHUR, W. Environmental effects on adult shell size in *Cepaea hortensis*. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 43, p. 273-279, 1991.
- PETERS, R.H. **The ecological implications of body size**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. Disponível em: [www.books.google.com.br](http://www.books.google.com.br). Acesso em: 05/10/2011.
- PFENNINGER, M.; MAGNIN, F. Phenotypic evolution and hidden speciation in *Candidula unifasciata* ssp. (Helicellinae, Gastropoda) inferred by 16S variation and quantitative shell traits. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2541-2554, 2001.
- PFENNINGER, M.; EPPENSTEIN, A.; MAGNIN, F. Evidence for ecological speciation in the sister species *Candidula unifasciata* (Poiret, 1801) and *C. rugosiuscula* (Michaud, 1831) (Helicellinae, Gastropoda). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 79, p. 611-628, 2003.
- PILSBRY, H.A. **Land mollusca of North America (North of Mexico)**. 2 v., part 1. Monographs. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1946.
- PINCEEL, J.; JORDAENS, K.; BACKELJAU, T. Extreme mtDNA divergences in a terrestrial slug (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae): accelerated evolution, allopatric divergence and secondary contact. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 18, p. 1264-1280, 2005.
- POINTIER, J.P.; CAZZANIGA, N.J.; GONZÁLEZ-SALAS, C.; GUTIÉRREZ, A.; ARENAS, J.A.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. Anatomical studies of sibling species within Neotropical lymnaeids, snail intermediate hosts of fascioliasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 431-435, 2006.
- POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.
- PULLANDRE, N.; CRUAUD, C.; KANTOR, Y.I. Cryptic species in *Gemmuloborsonia* (Gastropoda: Conoidea). **Journal of Molluscan Studies**, v. 76, p. 11-23, 2010.
- QUEIROZ, K. Ernst Mayr and the modern concept of species. **PNAS**, v. 102, n. 1, p. 6600-6607, 2005.
- RUNHAM, N.W.; LARYEA, A.A. Studies on the maturation of the reproductive system of *Agriolimax reticulatus* (Pulmonata: Limacidae). **Malacologia**, v. 7, n. 1, p. 93-108, 1968.
- SALGADO, N.C.; COELHO, A.C.S. Moluscos terrestres do Brasil (Gastrópodes operculados ou não, exclusive Veronicellidae, Milacidae e Limacidae). **Revista de Biologia Tropical**, v. 51, n. 3, p. 149-189, 2003.

- SAMADI, S.; ROUMEGOUX, A.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S.; YONG, M.; POINTIER, J.P. Morphological studies of lymnaeid snails from the human fascioliasis endemic zone of Bolivia. **Journal of Molluscan Studies**, v. 66, p. 31-44, 2000.
- SCHILTHUIZEN, M.; VAN TIL, A.; SALVERDA, M.; LIEW, T-S.; JAMES, S.S.; BIN ELAHAN, B.; VERMEULEN, J.J. Microgeographic evolution of snail shell shape and predator behavior. **Evolution**, v. 60, n. 9, p. 1851-1858, 2006.
- SELANDER, R.K.; KAUFMAN, D.W. Self-fertilization and genetic population structure in a colonizing land snail. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 70, n. 4, p. 1186-1190, 1973.
- SHEA, M. Exotic snails and slugs found in Australia. **Newsletter of the Malacological Society of Australasia**, v. 131, p. 3-11, 2007.
- SILVA, L.C.; MEIRELES, L.M.O.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. Development and reproduction in *Bulimulus tenuissimus* (Mollusca: Bulimulidae) in laboratory. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n. 2, p. 220-223, 2008.
- SILVA, L.; MEIRELES, L.; VARGAS, T.; JUNQUEIRA, F.O.; BESSA, E.C.A. Life history of the land snail *Habroconus semenlini* (Stylommatophora: Euconulidae) under laboratory conditions. **Revista de Biología Tropical**, v. 57, n. 4, p. 1217-1222, 2009.
- SIMONE, L.R.L. **Land and Freshwater Molluscs of Brazil**. São Paulo, SP: FAPESP, 2006.
- SPRUELL, P.; HEMMINGSEN, A.R.; HOWELL, P.J.; KANDAL, N.; ALLENDORF, F.W. Conservation genetics of bull trout: geographic distribution of variation at microsatellite *loci*. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 17-29, 2003.
- STEPIEN, C.A.; TAYLOR, C.D.; DABROWSKA, K.A. Genetic variability and phylogeographical patterns of a nonindigenous species invasion: a comparison of exotic vs. native zebra and quagga mussel populations. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 15, p. 314-328, 2002.
- TAJIMA, F. Measurement of DNA polymorphism. In: TAKAHATA, N.; CLARK, A.G. (Eds.). **Mechanisms of Molecular Evolution: Introduction to Molecular Paleopopulation Biology**. Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., 1993. p. 37-59.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted), 2011.
- TESHIMA, H.; DAVISON, A.; KUWAHARA, Y.; YOKOYAMA, J.; CHIBA, S.; FUKUDA, T.; OGIMURA, H.; KAWATA, M. The evolution of extreme shell shape variation

in the land snail *Ainohelix editha*: a phylogeny and hybrid zone analysis. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1869-1878, 2003.

THOMAZ, D.; GUILLER, A.; CLARKE, B. Extreme divergence of mitochondrial DNA within species of pulmonate land snails. **Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 263, p. 363-368, 1996.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOMPA, A.S. Land snails (Stylommatophora). In: TOMPA, A.S.; VERDONK, N.H.; VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. (Eds.). **The Mollusca**: Reproduction. Orlando: Academic Press, 1984. 7 v.

TRYON, G.W.; PILSBRY, M.A. **Manual of Conchology**: Structural and systematic. Philadelphia: Academy of Natural Sciences, 1906.

VALENTINE, J.W. **On the origin of Phyla**. Chicago: The University of Chicago Press, 2004.

VIANEY-LIAUD, M.; JOLY, D.; DUSSART, G. Sperm competition in the simultaneous hermaphrodite freshwater snail *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata). **Journal of Molluscan Studies**, v. 62, p. 451-457, 1996.

WADE, C.M.; MORDAN, P.B.; CLARKE, B. A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). **Proceedings of the Royal Society (London): Biological Sciences**, v. 268, p. 413-422, 2001.

WATANABE, Y.; CHIBA, S. High within-population mitochondrial DNA variation due to microvicariance and population mixing in the land snail *Euhadra quaesita* (Pulmonata: Bradybaenidae). **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2635-2645, 2001.

WEAVER, K.; ANDERSON, T.; GURALNICK, R. Combining phylogenetic and ecological niche modeling approaches to determine distribution and historical biogeography of Black Hills Mountain Snails (Oreohelicidae). **Diversity and Distributions**, v. 12, p. 756-766, 2006.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WELTER-SHULTES, F.W. The pattern of geographical and altitudinal variation in the land snail *Albinaria idaea* from Crete (Gastropoda: Clausiliidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 71, p. 237-250, 2000.

WILEY, E.O. The evolutionary species concept reconsidered. **Systematic Zoology**, v. 27, p. 17-26, 1978.

WILSON, A.C.; CANN, R.L.; GEORGE, S.M.; GYLLENSTEN, U.B.; HELM-BYCHOWSKI, K.M.; HIGUCHI, R.G.; PALUMBI, S.R.; PRAGER, E.M.; SAGE, R.D.;

STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics.  
**Biological Journal of the Linnean Society**, v. 26, p. 375-400, 1985.

**ANEXO 1**

## Sequências codificadoras dos haplótipos

## Haplótipo H1

CTGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTTTATGGTGATACCTATTATAAATTGGAGGA  
TTTGGGAATTGGATAGTTCCTTTGCTTATTGGGGCTCCTGATATAAGATTTCCGCG  
TATGAATAATATAAGGTTTTGGTTGTTACCTCCTTCATTTTTATTATTAATTTTATC  
TAGAATAGTGGAAGGTGGTGCTGGTACTGGTTGAACAGTTTATCCACCTTTAAGT  
AGAATTATAGGTCATGCTGGGGCTTCAGTTGATCTTGCTATTTTTCTTTGCATTT  
AGCGGGAATGTCTTCTATTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACTACTGTATTTAATA  
TACGTTCTTCTGGTTTATCTATAGAACGAGTTAGATTG

## Haplótipo H2

CTGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTTTATGGTAATACCTATTATAAATTGGAGGA  
TTTGGGAATTGAATAGTTCCTTTGCTTATTGGGGCTCCTGATATAAGATTTCCGCG  
TATGAATAATATAAGGTTTTGGTTGTTACCTCCTTCATTTTTATTATTAATTTTATC  
TAGAATAGTGGAAGGTGGTGCTGGTACTGGTTGAACAGTTTATCCACCTTTAAGC  
AGAATTATAGGTCATGCTGGGGCTTCAGTTGATCTTGCTATTTTTCTTTGCATTT  
AGCAGGAATGTCTTCTATTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACTACTGTATTTAATA  
TACGTTCTTCTGGTTTATCAATAGAACGAGTTAGATTG

## Haplótipo H3

CTGCTCATGCATTTGTTATAATTTTTTTTTATGGTGATACCTATTATAAATTGGAGGA  
TTTGGGAATTGGATAGTTCCTTTGCTTATTGGGGCTCCTGATATAAGATTTCCGCG  
TATGAATAATATAAGGTTTTGGTTGTTACCTCCTTCATTTTTATTGTTAATTTTATC  
TAGAATAGTGGAAGGTGGTGCTGGTACTGGTTGAACAGTTTATCCACCTTTAAGT  
AGAATTATGGGTCATGCTGGGGCTTCAGTTGATCTTGCTATTTTTCTTTGCATTT  
AGCGGGAATGTCTTCTATTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACTACTGTATTTAATA  
TACGTTCTTCTGGTTTATCTATAGAACGAGTTAGATTG

## Haplótipo H4

CTGCTCATGCATTTGTTATGATTTTTTTTTATGGTGATACCTATTATAAATTGGAGGA  
TTTGGGAATTGGATAGTTCCTTTGCTTATTGGGGCTCCTGATATAAGATTTCCGCG  
TATGAATAATATAAGGTTTTGGTTGTTACCTCCTTCATTTTTATTATTAATTTTATC  
TAGAATAGTGGAAGGTGGTGCTGGTACTGGTTGAACAGTTTATCCACCTTTAAGT  
AGAATTATAGGTCATGCTGGGGCTTCAGTTGATCTTGCTATTTTTCTTTGCATTT  
AGCGGGAATGTCTTCTATTTTAGGTGCAATTAATTTTATTACTACTGTATTTAATA  
TACGTTCTTCCGGTTTATCTATAGAACGAGTTAGATTG