

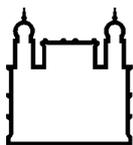
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde
Mestrado

MORFOLOGIA COMPARADA DE *ASOLENE META* (IHERING, 1915) E
ASOLENE SPIXII (D'ORBIGNY, 1838) (CAENOGASTROPODA:
AMPULLARIIDAE)

ALINE GONDAT SCHILITZ

Rio de Janeiro
Setembro de 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ALINE GONDAT SCHILITZ

Morfologia Comparada de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) (Caenogastropoda: Ampullariidae)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências (Biodiversidade e Saúde)

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Carvalho Thiengo

RIO DE JANEIRO

Setembro de 2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S334 Schilithz, Aline Gondat

Morfologia comparada de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) (Caenogastropoda: Ampullariidae) / Aline Gondat Schilithz. – Rio de Janeiro, 2013.

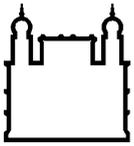
xxii, 132 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2013.

Bibliografia: f. 124-132

1. Taxonomia. 2. Morfologia. 3. *Asolene*. 4. Ampullariidae. I. Título.

CDD 594.3



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ALINE GONDAT SCHLITZ

**Morfologia Comparada de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii*
(d'Orbigny, 1838) (Caenogastropoda: Ampullariidae)**

ORIENTADORA: Dra. Silvana Carvalho Thiengo

Aprovada em: 12/09/2013

REVISOR: Dr. Ricardo Absalão – Universidade Federal do Rio de Janeiro

EXAMINADORES:

Dra. Norma C. Salgado – Museu Nacional/UFRJ (Presidente)

Dr. Alexandre D. Pimenta – Museu Nacional/UFRJ (Titular)

Dra. Sonia B. dos Santos – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Titular)

Dr. Arnaldo Maldonado – Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (Suplente)

Dra. Monica A. Fernandez - Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (Suplente)

Rio de Janeiro, 12 de setembro de 2013

“The most exciting phrase to hear in Science,
the one that heralds new discoveries, is not “eureka!” but “that’s funny...”

Isaac Asimov

“Sim, me leva para sempre, Beatriz
Me ensina a não andar com os pés no chão...”
(Chico Buarque)

À minha filha, Ana Beatriz

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Eunice e minhas irmãs Jamine e Janaina, que sempre me motivaram e estiveram ao meu lado nos melhores e piores momentos. Em especial à minha filha Ana Beatriz, minha eterna força para sempre seguir em frente.

À minha orientadora Dra. Silvana Carvalho Thiengo e a pesquisadora do Laboratório de Malacologia/IOC Dra. Monica Ammon Fernandez pelo apoio, pela oportunidade e por propiciar a infraestrutura necessária ao desenvolvimento do meu trabalho.

Ao pesquisador Dr. Kenneth Hayes da Universidade do Havaí, pelo auxílio na execução deste trabalho e principalmente pela amizade e carinho, sempre contribuindo para meu crescimento científico e pessoal.

Aos meus amigos do Laboratório de Malacologia/IOC, Patrícia Cantanhede, Aline Mattos, Fabio Buchmann, Lângia Montresor, Marta Pinto, Elizangela Feitosa, Rachel Leal e Paulo César dos Santos, pelo apoio laboratorial, pela ajuda para manter minha sanidade mental, pelas risadas e afetividade. À Aline Mattos agradeço também pelo auxílio na execução da biologia molecular, à Lângia Montresor pelo auxílio na histologia e estatística e à Marta Pinto pelo auxílio na criação dos moluscos.

Ao desenhista do Laboratório de Malacologia/IOC, Eduardo Prado, pelo carinho e pela execução e orientação dos desenhos científicos.

À Dra. Helene Barbosa e Sandra Costa do Laboratório de Biologia Estrutural/IOC pelo valioso auxílio na microscopia eletrônica de varredura da rádula.

À Dra Ester Mota pela valiosa orientação na histologia, assim como às biólogas Andrea Natividade e Tatiana e às técnicas Luiza e Luciana do Laboratório de Patologia/IOC pela preparação do material.

À equipe da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia pelo auxílio na coleta de *Asolene meta* e à pesquisadora Dra. Suzana Amato, aos biólogos Tiago e Samantha do Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia/UFRGS pelo apoio logístico e auxílio na coleta de *Asolene spixii*.

À pesquisadora Dra. Sonia Barbosa dos Santos, ao Igor Christo Miyahira, ao Luiz Eduardo de Lacerda e à Renata Maia Braga do Laboratório de Malacologia Límica

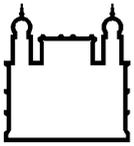
e Terrestre/Uerj pela coleta e doação dos exemplares de *Asolene meta* provenientes de Juazeiro e Casa Nova (BA). Agradeço ainda ao Luiz Eduardo de Lacerda e ao Amilcar Brum Barbosa pela imensa ajuda nas análises estatísticas.

Ao pesquisador Dr. Alexandre Pimenta e à equipe do Laboratório de Malacologia/MNRJ/UFRJ por viabilizar o acesso ao holótipo de *Asolene meta* depositado na Coleção de Moluscos do Museu Nacional MNRJ/UFRJ.

Ao Dr. Ricardo Absalão do Laboratório de Malacologia/UFRJ por ser revisor da minha dissertação e aos integrantes da banca examinadora, Dra. Norma Campos Salgado, Dr. Alexandre Dias Pimenta e Dra. Sonia Barbosa dos Santos, contribuindo substancialmente para o enriquecimento do meu trabalho.

Ao curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde e ao seu coordenador Dr. Cleber Galvão pela oportunidade de realizar esta pós-graduação. E aos amigos do mestrado, Ana Carolina Bastos, Ana Carolina Valente, Ana Paula Gomes, Carolina Dale, Caroline Fonseca, Karla Bitencourth, Renata Rocha e César Pinto pelo carinho e risadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Morfologia Comparada de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838)
(Caenogastropoda: Ampulariidae)

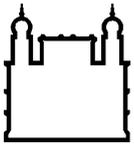
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Aline Gondat Schilithz

Ampulariídeos são gastrópodes límnicos que habitam as regiões tropicais e subtropicais das Américas, da África e da Ásia. Geralmente são os principais constituintes de ecossistemas límnicos e têm importante papel na cadeia trófica. A anatomia da maioria dos ampulariídeos é pobremente conhecida e sua classificação é baseada principalmente em caracteres conchiliológicos, geralmente variáveis, resultando em uma confusa taxonomia. Dentre os quatro gêneros que ocorrem na América do Sul, *Asolene* é um dos menos estudados. Visando contribuir para a clarificação da taxonomia de *Asolene meta* e *Asolene spixii*, bem como fornecer dados adicionais para o entendimento das relações de parentesco dentro da família, foram estudados a morfologia e aspectos moleculares de espécimes coletados no Brasil, incluindo topótipos de *A. meta*. *Asolene spixii* ocorre no norte da Argentina, Uruguai, Paraguai e sul do Brasil, enquanto *A. meta* é endêmica da bacia do rio São Francisco. As conchas de ambas as espécies são similares, mas a abertura de *A. meta* é arredondada e em *A. spixii* é mais alongada. As análises estatísticas (Teste t de Student e Análise Discriminante) revelaram que as variáveis conchiliométricas são significativamente diferentes entre as espécies, sendo a altura da abertura a que mais contribui para a discriminação entre *A. meta* e *A. spixii*. A microscopia eletrônica de varredura da rádula não revelou diferenças interespecíficas. A anatomia do estômago é similar em *A. meta* e *A. spixii*, no entanto o escudo gástrico de *A. meta* é mais desenvolvido. A anatomia externa, cavidade do manto e sistema nervoso seguem o mesmo padrão dos demais ampulariídeos. As principais diferenças anatômicas encontram-se nos caracteres do rim e da bainha do pênis. O rim anterior de *A. meta* é alongado e maior que em *A. spixii*, que é triangular. A glândula apical da bainha do pênis é maior e mais volumosa em *A. spixii*, embora

ambas as espécies apresentem duas glândulas internas que ocupam posição similar na bainha. Nas duas espécies, os ovos redondos, não calcários e sem pigmentação são depositados abaixo do nível d'água, em massas gelatinosas. Os dados obtidos com os cálculos de divergência genética confirmaram que *A. meta* e *A. spixii* são espécies distintas, porém geneticamente próximas dentro do grupo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Comparative Morphology of *Asolene meta* (Ihering, 1915) and *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838)
(Caenogastropoda: Ampullariidae)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Aline Gondat Schilithz

Ampullariidae are freshwater snails inhabiting tropical and subtropical regions in Asia, Africa and the Americas. They are often major constituents of freshwater ecosystems and play important roles in food webs. The detailed morphology of most ampullariids is poorly known and their classification is based primarily on often variable shell characters, resulting in taxonomic confusion. Among the four genera in South America, *Asolene* is one of the least studied. To clarify the taxonomy of *Asolene meta* and *Asolene spixii* and provide additional data to understand systematic relationships within the family we assessed morphological and molecular data from specimens collected in Brazil, including the type locality of *A. meta*. *A. spixii* occurs in northern Argentina, Uruguay, Paraguay and southern Brazil while *A. meta* is endemic to the basin of São Francisco river. The shells are similar in both species but the aperture of *A. meta* is rounded and in *A. spixii* it is more elongated. Statistical analysis (Test t and Discriminant Analysis) showed that the conchological variables are significantly different between the species and the aperture height contributes most to the discrimination between *A. meta* and *A. spixii*. The scanning electron microscopy didn't reveal interspecific variations. The stomach are similar in *A. meta* and *A. spixii*, although the gastric shield in *A. meta* is more developed. The external anatomy, mantle cavity and nervous system are the same as in ampullariids. There are a few anatomical differences, primarily in the characters of the kidney and the penial sheath. The elongated anterior kidney in *A. meta* is larger than that of *A. spixii*, which is triangular. The apical penis sheath gland is larger and more voluminous in *A. spixii*, although both species share two internal glands in that occupy similar positions on the sheath. In both species, the rounded, non-calcareous and unpigmented eggs are deposited below water in gelatinous masses. The genetic

distant data confirmed that *A. meta* and *A. spixii* are distinct species, however the two taxa are sister species within the genus.

ÍNDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	11
Índice	13
Lista de Figuras	15
Lista de Tabelas	21
1 Introdução	23
1.1 Considerações taxonômicas sobre Ampullariidae	23
1.2 Considerações sobre a morfologia de Ampullariidae	25
1.3 Importância ecológica, médica e econômica	28
1.4 Considerações morfológicas e taxonômicas sobre o gênero <i>Asolene</i> d'Orbigny, 1838	29
1.5 Justificativa	31
2 Objetivos.....	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3 Material e Métodos.....	33
3.1 Coleta, manutenção e fixação do material	33
3.2 Conquiliologia	39
3.3 Morfologia	41
3.4 Sequenciamento do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) de <i>Asolene meta</i> através de técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR)	42
4 Resultados.....	43
4.1 <i>Asolene</i> d'Orbigny, 1838	43
4.2 <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915)	43
4.2.1 Descrição original	44
4.2.2 Redescrição do Holótipo	44
4.2.3 Caracterização	45
4.2.3.1 Concha	45
4.2.3.2 Anatomia externa	47

4.2.3.3	Cavidade do manto	49
4.2.3.4	Sistema digestório	51
4.2.3.5	Sistema nervoso	55
4.2.3.6	Rim	57
4.2.3.7	Pericárdio.....	59
4.2.3.8	Sistema reprodutor masculino.....	61
4.2.3.9	Sistema reprodutor feminino	66
4.2.3.10	Desova.....	68
4.2.4	Análise de dimorfismo sexual	69
4.2.5	Dados moleculares	75
4.2.6	Distribuição Geográfica	79
4.3	<i>Asolene spixii</i> (d´Orbigny, 1838)	80
4.3.1	Descrição original	80
4.3.2	Caracterização	80
4.3.2.1	Concha	81
4.3.2.2	Anatomia externa	82
4.3.2.3	Cavidade do manto	84
4.3.2.4	Sistema digestório	86
4.3.2.5	Sistema nervoso	89
4.3.2.6	Rim	91
4.3.2.7	Pericárdio.....	93
4.3.2.8	Sistema reprodutor masculino.....	94
4.3.2.9	Sistema reprodutor feminino	99
4.3.2.10	Desova.....	101
4.3.3	Análise de dimorfismo sexual	102
4.3.4	Distribuição Geográfica	108
4.4	Análise conquiliométrica de <i>Asolene meta</i> e <i>Asolene spixii</i>	109
4.5	Sinopse	117
5	Discussão	118
6	Conclusões.....	123
7	Referências Bibliográficas	124

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Concha dos representantes dos gêneros de Ampullariidae incluídos no clado do Novo Mundo: A: *Asolene* d’Orbigny, 1838; B: *Felipponea* Dall, 1919; C: *Marisa* Gray, 1824; D: *Pomacea* Perry, 1810. Escala: 10 mm. Fonte: Laboratório de Malacologia/IOC..... 25
- Figura 2 – Anatomia externa de *Pomacea figulina* (Spix in Martins, 1827).. Fonte: Thiengo, 1987..... 27
- Figura 3 - Mapa da América do Sul mostrando a distribuição das espécies de *Asolene*. Fonte: Hayes, 2009. 31
- Figura 4 – Mapa da América do Sul com ênfase dos pontos de coleta de *Asolene meta* (Ihering, 1915), além da localidade tipo (vermelho), município da Barra (Bahia). 37
- Figura 5 – Biótopos de *Asolene meta* (Ihering, 1915): rio São Francisco em Propriá, Sergipe (A-B); brejo na localidade tipo, Barra, Bahia (C-D)..... 37
- Figura 6 – Mapa da América do Sul com ênfase do ponto de coleta de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838), município de Eldorado do Sul (Rio Grande do Sul). .. 38
- Figura 7 - Biótopo de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838) : plantação de arroz no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (A-B). 38
- Figura 8 - Mensurações das conchas (A) e dos opérculos (B) dos espécimes estudados..... 40
- Figura 9 – Esquema da contagem do número de voltas completas (A) e a fração de volta (B), com base em Burch, 1962. 40
- Figura 10 - Desenho da concha de *Asolene meta* (Ihering, 1915) retirado da descrição original. Fonte: Ihering, 1915. 44

Figura 11 – Holótipo por monotipia depositado na Coleção de Moluscos do Museu Nacional/ RJ (MNRJ 12861). Escala: 10 mm.....	45
Figura 12 - Conchas de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra, Bahia (A), Casa Nova, Bahia (B) e Propriá, Sergipe (C). Escala: 10 mm.....	46
Figura 13 – Opérculos de exemplares fêmea e macho de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra, Bahia. Escala: 5 mm.	47
Figura 14 – Anatomia externa de um exemplar macho de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915): foto (A) e esquema (B). Escala: 10 mm.	48
Figura 15 – Cavidade do manto de um exemplar macho de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915): foto (A) e esquema (B). Escala: 10 mm.	50
Figura 16 – Osfrádio de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915), com destaque da região anterior (A) e da região posterior (B). Escala: 1 mm.	51
Figura 17 – Sistema digestório de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) (A), bulbo bucal (B) e estômago (C-D). Escala: 1 mm.	53
Figura 18 - Rádula de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915). A: visão geral e organização dos dentes; B: dentes centrais; C: dentes laterais e marginais. Escala: 100 µm.....	54
Figura 19 - Sistema nervoso de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) (A) e gânglios cerebrais (B). Escala: 1 mm.....	56
Figura 20 – Rim de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915): dorsal (A) e ventral (B). Escala: 5 mm.....	58
Figura 21 – Vista da lateral esquerda de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) mostrando a localização do pericárdio (A – escala: 10 mm) e destaque do coração (B – escala 1 mm).....	60

Figura 22 - Sistema reprodutor masculino de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915). Escala: 10 mm.....	62
Figura 23 – Complexo peniano de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915). Escala: 1 mm.	63
Figura 24 - Pênis (A) e bainha do pênis (dorsal – B e ventral – C) de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915). Escala: 1 mm.	63
Figura 25 – Cortes histológicos do pênis de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915). A: Complexo peniano mostrando o local dos cortes histológicos. B: Histologia da bolsa do pênis corada com hematoxilina-eosina. C: Histologia do pênis corada com hematoxilina-eosina. D: Histologia do pênis corada com Reticulina de Gomori; E: Histologia do pênis de corada com PAS; setas pretas indicando região positiva.	64
Figura 26 - Cortes histológicos da glândula externa da bainha do pênis de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915). A: Complexo peniano mostrando o local dos cortes histológicos. B: Histologia da glândula basal externa corada com hematoxilina-eosina. C: Histologia da glândula basal externa corada Reticulina de Gomori. D: Histologia glândula basal externa corada com PAS. E: Histologia glândula basal externa corada com Alcian Blue pH 1,0. Escalas: A: 1 mm; B-E: 100 µm.....	65
Figura 27 - Sistema reprodutor feminino de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) (A), glândula de albúmen mostrando a posição do receptáculo seminal (B) e receptáculo seminal (C). Escala: 1 mm.....	67
Figura 28 – Desova de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) (A), detalhe dos ovos (B) e recém-eclodido (C). Escalas: 10 mm (A-B) e 1 mm (C).....	68
Figura 29 - Análise de Escalonamento Multidimensional a partir de dados conquiliométricos de fêmeas e machos de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915).	71

Figura 30 – Análise discriminante das análises conchiliométricas dos espécimes fêmeas e machos de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915).....	71
Figura 31 – A: Mapa da América do Sul com a distribuição geográfica de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) destacada em cinza escuro; B: pontos de coleta com destaque da região da Bacia do São Francisco.	79
Figura 32 – Concha de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838) proveniente do município de Eldorado do Sul, RS. Escala: 10 mm.	81
Figura 33 – Opérculos de espécimes fêmea e macho de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838) provenientes do município de Eldorado do Sul, RS. Escala: 10 mm.	82
Figura 34 - Anatomia externa de um exemplar fêmea de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838): foto (A) e esquema (B). Escala: 10 mm.	83
Figura 35 – Cavidade do manto de um exemplar fêmea de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838): foto (A), esquema (B) e detalhe do osfrádio (C). Escalas: 5 mm (A-B) e 1 mm (C).	85
Figura 36 - Sistema digestório de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838) (A), bulbo bucal (B) e estômago (C-D). Escala: 1 mm.....	87
Figura 37 – Rádula de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838): A: visão geral e organização dos dentes; B: dentes centrais; C: dentes marginais. D: dentes laterais e marginais Escala: 100 µm.....	88
Figura 38 – Sistema nervoso de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838). Escala: 1 mm.	90
Figura 39 – Rim de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838): dorsal (A) e ventral (B). Escala: 5 mm.....	92
Figura 40 – Coração de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838). Escala: 1 mm.	93

Figura 41 – Sistema reprodutor masculino de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838). Escala: 1 mm.....	95
Figura 42 - Cortes histológicos do pênis de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838). A: Complexo peniano mostrando o local dos cortes histológicos. B: Histologia da bolsa do pênis corada com hematoxilina-eosina. C: Histologia do pênis corada com hematoxilina-eosina. D: Histologia do pênis corada com Reticulina de Gomori. E: Histologia do pênis de corada com PAS. Escalas: A: 1 mm; B: 500 µm; C-E: 100 µm.....	96
Figura 43 – Bainha do pênis de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838) vista ventralmente: foto (A) e esquema (B). Escala: 1 mm.	97
Figura 44 - Cortes histológicos da glândula externa da bainha do pênis de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838). A: Bainha do pênis mostrando o local dos cortes histológicos. B-C: Histologia da glândula basal externa corada com hematoxilina-eosina. D: Histologia da glândula basal externa corada Reticulina de Gomori. E: Histologia glândula basal externa corada com PAS. F: Histologia glândula basal externa corada com Alcian Blue pH 1,0. Escalas: A: 1 mm; B: 500 µm; C-F: 100 µm.....	98
Figura 45 – Sistema reprodutor feminino de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838) (A) e destaque do receptáculo seminal (B). Escalas: 5 mm (A) e 1 mm (B). ...	100
Figura 46 - Desova de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838) <i>in situ</i> (A-B), detalhe dos ovos (C-D) e recém-eclodido (E). Escala: 5 mm.	101
Figura 47 - Análise de Escalonamento Multidimensional a partir de dados conquiométricos de fêmeas e machos de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838).	104
Figura 48 - Análise discriminante dos espécimes fêmeas e machos de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838).....	104

Figura 49 – A: Mapa da América do Sul com a distribuição geográfica de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838) destacada em cinza escuro; B: ponto de coleta e localidades citadas na literatura. 108

Figura 50 – Análise de Escalonamento Multidimensional a partir de dados conchiliométricos de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838)..... 112

Figura 51 - Análise discriminante de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838). 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Localidades, coordenadas geográficas, espécimes analisados e número de tombo de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) e <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838).....	35
Tabela 2 – Estatística básica descritiva das conchas e dos opérculos dos espécimes fêmeas e machos de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA).....	69
Tabela 3 - Análise Teste t de Student entre as variáveis conquiliométricas de conchas e opérculos de espécimes fêmeas e machos de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA).	70
Tabela 4 – Correlação de Pearson das variáveis conquiliométricas analisadas de espécimes fêmeas e machos de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA).	72
Tabela 5 - Composição de nucleotídeos do COI de dez exemplares sequenciados de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA).....	76
Tabela 6 - Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências de dez exemplares de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) e as espécies próximas depositadas no GenBank, utilizando modelo de Máxima Verossimilhança.....	77
Tabela 7 - Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências de dez exemplares de <i>Asolene meta</i> (Ihering, 1915) e as espécies próximas depositadas no GenBank, utilizando modelo <i>p-distance</i>	78
Tabela 8 – Estatística básica descritiva das conchas e dos opérculos dos espécimes fêmeas e machos de <i>Asolene spixii</i> (d’Orbigny, 1838) provenientes do município de Eldorado do Sul (RS).....	102

Tabela 9 - Análise Teste t de Student entre as variáveis conquiliométricas de espécimes fêmeas e machos de *Asolene spixii spixii* (d'Orbigny, 1838) provenientes do município de Eldorado do Sul (RS). 103

Tabela 10 - Correlação de Pearson das variáveis conquiliométricas analisadas de fêmeas e machos de *Asolene spixii spixii* (d'Orbigny, 1838) provenientes do município de Eldorado do Sul (RS). Valores maiores que 0,900 estão destacados em vermelho. 105

Tabela 11 – Estatística básica descritiva das conchas e dos opérculos de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) do município de Eldorado do Sul (RS). 110

Tabela 12 – Análise Teste t de Student entre as variáveis conquiliométricas de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) do município de Eldorado do Sul (RS). 111

Tabela 13 – Correlação de Pearson das variáveis conquiliométricas analisadas de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) do município de Eldorado do Sul (RS). 113

Tabela 14 – Função Discriminante das variáveis conquiliométricas de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) do município de Eldorado do Sul (RS). 116

Tabela 15 – Sumário das diferenças morfológicas entre *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838). 117

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações taxonômicas sobre Ampullariidae

O nome Ampullariidae foi proposto por Gray em 1824 tendo como gênero-tipo *Ampullaria* Lamarck, 1799 o qual foi, mais tarde, considerado como sinônimo de *Pila* Röding, 1798, pois *Pila* foi publicado alguns meses antes e ambos os gêneros tinham a mesma espécie tipo, *Helix ampullacea* Linnaeus, 1758. Preston (1915), reconhecendo a sinonímia destes gêneros, introduziu o nome Pilidae como substituto de Ampullariidae. Embora o nome Pilidae tenha sido citado por muitos autores, Ampullariidae continuou sendo utilizado pela maioria. Desta forma, Cowie (1997), com base no artigo 40b do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, propôs Ampullariidae como o nome válido da Família e Pilidae como seu sinônimo júnior, o que foi posteriormente aceito pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 1999a).

Ampullariidae inclui gastrópodes límnicos operculados com ampla distribuição na região tropical e subtropical da Ásia, África e Américas (Cowie & Thiengo, 2003; Cowie *et al.*, 2006). Incluída na ordem Caenogastropoda, o maior e mais diverso grupo, com aproximadamente 60% das espécies de gastrópodes recentes, a Família é originária da Gondwana e compreende duas linhagens monofiléticas: o clado do Velho Mundo – *Afropomus* Pilsbry & Bequaert, 1927, *Lanistes* Montfort, 1810, *Pila* e *Saulea* Gray, 1867 – e o clado do Novo Mundo – *Asolene* d’Orbigny, 1838, *Felipponea* Dall, 1919, *Marisa* Gray, 1824 e *Pomacea* Perry, 1810 (Figura 1) (Hayes *et al.*, 2009a). Recentemente o gênero *Pomella* Gray, 1847, anteriormente incluído no clado do Novo Mundo, foi sinonimizado com *Pomacea* (Hayes *et al.*, 2012).

A maioria das espécies foi descrita com base em caracteres conchiliológicos, muitas vezes a partir de um ou poucos exemplares, e/ou sem definição de localidade tipo (Cowie & Thiengo, 2003). No entanto, como outros gastrópodes, muitos ampulariídeos apresentam ampla variação na concha, como por exemplo, no tamanho e na espessura, dependendo do tipo de habitat (Cazzaniga, 2002), ou ainda na forma e proporção da abertura. Em alguns casos essa variação pode ser atribuída ao dimorfismo sexual, conforme observado em *Marisa cornuarietis* (Linnaeus, 1758) (Demian & Ibrahim, 1972) e *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Cazzaniga, 1990). Com isso, criou-se um grande número de espécies nominais,

resultando em uma sistemática confusa. Somente para o Brasil, são citadas cerca de 50 espécies de *Pomacea* (Cowie & Thiengo, 2003).

O estudo anatômico das espécies passou a ter mais importância a partir da década de 1950 (Cazzaniga, 2002) e com relação aos ampulariídeos neotropicais podem ser destacados: Lopes (1955, 1956a, 1956b), Hylton Scott (1958), Andrews (1964), Cazzaniga (1987), Thiengo (1987, 1989) e Thiengo *et al.* (1993), os quais contribuíram para o conhecimento anatômico principalmente de representantes do gênero *Pomacea*. No entanto, a maioria desses estudos tratou apenas de uma espécie, faltando estudos comparativos interespecíficos, o que facilitaria a discriminação dos caracteres diagnósticos específicos.

Michelson (1961) estudou a morfologia e características da desova de oito espécies dos gêneros *Pila*, *Lanistes*, *Afropomus*, *Pomacea* e *Marisa*, sendo um dos primeiros estudos visando à delimitação dos gêneros, com a discriminação das principais características dos ampulariídeos do Velho e do Novo Mundo.

Em 1991, Berthold realizou o primeiro estudo filogenético da família, unindo caracteres conchiliológicos e anatômicos, com representantes de *Afropomus*, *Lanistes*, *Saulea*, *Pila*, *Marisa* e *Pomacea*. Este autor considerou os gêneros americanos *Pomella*, *Asolene* e *Felipponea* como os mais basais, enquanto *Pomacea* e *Marisa* seriam os mais diversificados.

Bieler (1993) apresentou uma revisão dos dados de Berthold (*op. cit.*) utilizando a metodologia cladística, que resultou em uma filogenia semelhante, porém com *Marisa* e *Pomacea* formando um único clado.

Cowie & Thiengo (2003) forneceram o primeiro catálogo nomenclatural das espécies descritas de ampulariídeos neotropicais, incluindo dados sobre tipos, localidades tipo, distribuição e sinônimas, contribuindo significativamente para o entendimento da situação da sistemática de Ampullariidae.

Hayes *et al* (2009a; 2009b), unindo dados moleculares, morfológicos e comportamentais, começaram a esclarecer as relações de parentesco entre os gêneros, visando contribuir para o conhecimento filogenético desse grupo. Estes autores não reconheceram suporte para a monofilia dos gêneros neotropicais, onde *Marisa*, *Asolene* e *Felipponea* formaram um único clado basal, enquanto *Pomacea* formou um grupo parafilético mais derivado.

Apesar destes avanços, a taxonomia básica e a relação entre as espécies permanecem confusas, principalmente na região neotropical, onde se estima que a

real diversidade seja maior que a atualmente conhecida (Jørgensen *et al.*, 2008; Hayes *et al.*, 2009b).

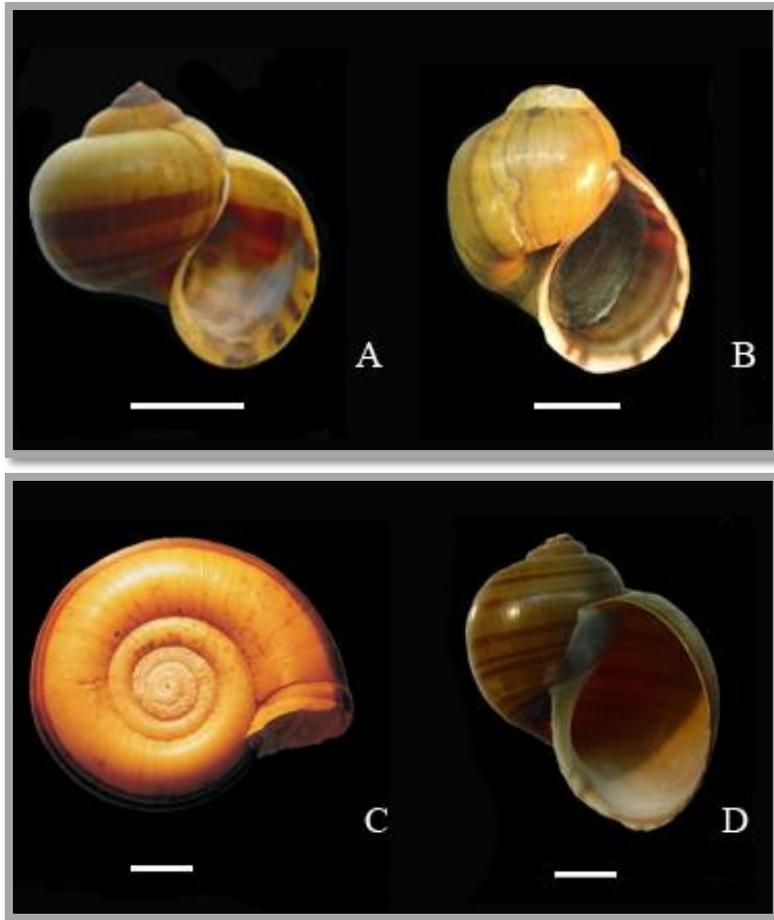


Figura 1 – Concha dos representantes dos gêneros de Ampullariidae incluídos no clado do Novo Mundo: A: *Asolene* d’Orbigny, 1838; B: *Felipponea* Dall, 1919; C: *Marisa* Gray, 1824; D: *Pomacea* Perry, 1810. Escala: 10 mm. Fonte: Laboratório de Malacologia/IOC.

1.2 Considerações sobre a morfologia de Ampullariidae

A concha da maioria dos ampulariídeos é globosa (exceto em *Marisa*, sendo planorbóide), dextrógira (exceto em *Lanistes* que é levógira) e com opérculo córneo, exceto em *Pila*, que é calcário (Thiengo *et al.*, 2011). A coloração e a ornamentação das conchas variam intra e interespecificamente, mas, geralmente, o perióstraco é de marrom escuro a amarelo esverdeado com faixas escuras variando em número e espessura (Hayes, 2009).

A morfologia externa dos ampulariídeos segue o mesmo padrão em todas as espécies (Figura 2). São os únicos gastrópodes que possuem saco pulmonar e

brânquias, podendo realizar tanto respiração aérea quanto aquática, o que os torna resistentes à dessecação e à poluição do ambiente (Thiengo, 1995). Possuem dois lobos nucais, o esquerdo forma um sifão respiratório, podendo ser pouco (e.g. *Felipponea* spp. e *Lanistes* spp.) ou altamente extensível (e.g. *Pomacea* spp.), o qual direciona o ar para o saco pulmonar quando o animal está submerso (Andrews, 1965; Hayes *et al.*, 2012). Esta característica anfíbia, acentuada principalmente em *Pomacea*, é um dos fatores que contribuiu para o sucesso e dispersão do grupo (Cowie, 2002; Hayes *et al.*, 2009b).

A rádula dos ampulariídeos é do tipo taenioglossa (2.1.1.1.2), ou seja, com uma fileira de dentes centrais, uma de laterais e duas de dentes marginais. O valor taxonômico da rádula é controverso, porém, segundo Michelson (1961) a morfologia da rádula tem valor taxonômico abaixo do nível de família. Martín & Negrete (2007) discutem que variações na rádula podem ser observadas entre espécies de *Pomacea*.

O rim é dividido em duas regiões distintas, a câmara anterior e a câmara posterior. A câmara anterior ocupa parcialmente a cavidade do manto, enquanto a posterior encontra-se inteiramente na massa visceral (Andrews, 1964). Michelson (1961) e Berthold (1991) apontam o formato do rim como um caráter que pode auxiliar na discriminação dos gêneros.

Os ampulariídeos são animais dióicos, com fertilização interna e ovíparos. Os ovos de *Pomacea* e *Pila* são calcários e a oviposição ocorre na vegetação ou em superfícies duras, como pedras e rochas, acima do nível da água (*Pomacea*) ou no limite do nível da água (*Pila*). Nos outros gêneros, os ovos não possuem essa cobertura calcária, podendo ser pigmentados (*Marisa*) ou incolores (e.g. *Felipponea*) e são depositados em uma massa gelatinosa na vegetação submersa (Michelson, 1961; Thiengo, 1995; Cowie, 2002).

Nos machos, o testículo geralmente ocupa as três primeiras voltas da espira, formado por numerosos ductos eferentes que se reúnem para formar o canal deferente, que passa pela base da espira até o nível do estômago, onde vira para a direita para entrar na vesícula seminal. A próstata é cilíndrica e compacta, seguindo à esquerda do reto até alcançar a papila anal. O aparelho copulador, localizado ao lado direito da borda do manto, é dividido em pênis e bainha do pênis (Thiengo *et al.*, 2011). Esta última é uma estrutura alongada podendo ou não abrigar glândulas acessórias. O número, o formato e a posição dessas glândulas constituem um dos principais caracteres diagnósticos específicos. Nos gêneros do clado do Velho

Mundo, a bainha do pênis não apresenta glândulas visíveis, exceto em algumas espécies de *Pila*, que possuem uma glândula distal. O canal espermático pode ser aberto ou fechado e o pênis fica abrigado dentro da bainha. Já nos ampulariídeos neotropicais, o pênis, quando relaxado, fica enovelado dentro da bolsa do pênis, uma estrutura inexistente nos ampulariídeos do Velho Mundo. O canal espermático é fechado e a bainha do pênis é bem mais complexa, podendo ter até cinco glândulas distintas (Hayes, 2009).

Burela & Martin (2007) demonstraram a ocorrência de alimentação nupcial em *P. canaliculata* através de um muco secretado pela glândula basal externa da bainha do pênis destes animais. Alimentação nupcial é qualquer forma de transferência de nutrientes do macho para a fêmea durante ou imediatamente após a cópula, sendo esta a primeira descrição deste comportamento em gastrópodes. Os autores sugeriram que, devido ao alto nível de similaridades compartilhadas entre os ampulariídeos, este comportamento provavelmente não é exclusivo desta espécie.

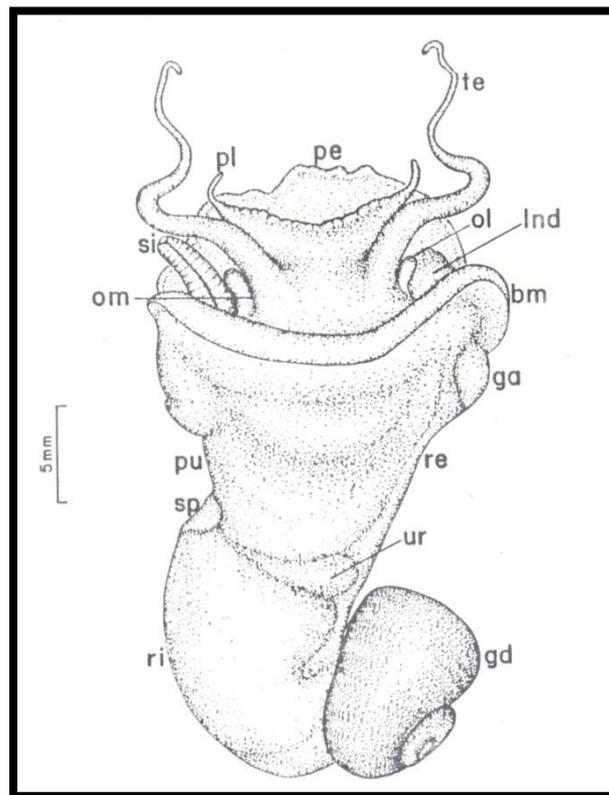


Figura 2 – Anatomia externa de *Pomacea figulina* (Spix in Martins, 1827). bm: borda do manto; ga: glândula anal; gd: glândula digestiva; Ind: lobo nuchal direito; ol: olho; om: omatóforo; pe: pé; pl: palpo labial; pu: pulmão; re: reto; ri: rim; si: sifão; sp: saco pericárdico; te: tentáculo; ur: ureter. Fonte: Thiengo, 1987.

1.3 Importância ecológica, médica e econômica

Os ampulariídeos geralmente constituem a maior parte da malacofauna límnic dos biótopos onde ocorrem e têm um papel importante na cadeia trófica, uma vez que servem de alimento para uma grande variedade de animais (aves, peixes, répteis, entre outros). Desta forma, constituem um importante elo entre as cadeias terrestres e aquáticas (Hayes, *et al.*, 2009a). Além disso, o grupo inclui o maior gastrópode límnic atual, *Pomacea maculata* Perry, 1810, podendo alcançar aproximadamente 17 cm (Cowie *et al.*, 2006).

Do ponto de vista ambiental, podem ser utilizados como bioindicadores da qualidade da água, como por exemplo, para exames de concentração de tributilestanho (TBT), um biocida utilizado em tinta anti-incrustante. Este composto age como um disruptor endócrino em gastrópodes prosobrânquios fêmeas, resultando no fenômeno de *imposex* (Schulte-Oehlmann *et al.*, 1995; Titley-O'Neal *et al.*, 2011).

Com relação à importância médica, os ampulariídeos podem atuar como hospedeiros intermediários do nematódeo *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), agente etiológico da meningoencefalite eosinofílica, zoonose endêmica do sudeste asiático. O ciclo biológico deste helminto requer um hospedeiro intermediário (gastrópodes terrestres ou límnicos) e um hospedeiro definitivo, geralmente um roedor. O ciclo pode ainda incluir um hospedeiro paratênico (peixes, anfíbios, entre outros). O homem participa deste ciclo como hospedeiro acidental e a infecção ocorre pela ingestão de alimentos (hortaliças mal higienizadas, moluscos ou peixes crus) contaminados com larvas de terceiro estágio deste nematódeo.

Dentre os moluscos que podem atuar como hospedeiros intermediários de *A. cantonensis*, destacam-se duas espécies por sua importância na transmissão: *Achatina fulica* Bowdich, 1822 e *P. canaliculata*. Esta última é responsável pela infecção humana em numerosos casos na China, facilitando a dispersão de *A. cantonensis*, uma vez que *P. canaliculata* é amplamente utilizada na alimentação humana em algumas regiões (Lv *et al.*, 2009). No Brasil, Thiengo *et al.* (2010) relataram a primeira ocorrência de um ampulariídeo infectado por *A. cantonensis*, *Pomacea lineata* (Spix in Martins, 1827), no estado de Pernambuco.

Ainda quanto à importância médica, algumas espécies foram utilizadas em programas de controle biológico de *Biomphalaria* spp., planorbídeos vetores do trematódeo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, agente etiológico da

esquistossomose. Em Guadalupe, *Pomacea glauca* (Linnaeus, 1758) e *M. cornuarietis* foram introduzidos em criadouros de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), resultando na erradicação deste molusco e do foco de esquistossomose local (Pointier & Jourdan, 2000). Já em Minas Gerais e São Paulo, espécimes introduzidos de *Pomacea haustum* (Reeve, 1956) (= *P. maculata*; Hayes *et al.*, 2012) coexistiram com estes planorbídeos sem alterar sua densidade populacional (Amaral *et al.*, 2007). Para alguns autores a predação de *Biomphalaria* por *Pomacea* não é seletiva, pois jovens e desovas são ingeridos acidentalmente junto com a vegetação aquática que serve de alimento aos ampulárideos (Thiengo, 1995).

Quanto à importância econômica, espécies sul-americanas foram introduzidas na Ásia e em regiões dos Estados Unidos da América através da aquicultura, de programas de controle biológico ou para uso na alimentação humana. Devido ao hábito alimentar voraz, espécies principalmente de *Pomacea* causaram sérios impactos em diversas plantações, como as de arroz, em países como Indonésia, China, Tailândia, Japão e Filipinas, sendo este último provavelmente o país mais afetado pelas perdas econômicas resultantes desta infestação (Cowie, 2002).

1.4 Considerações morfológicas e taxonômicas sobre o gênero *Asolene* d'Orbigny, 1838

O naturalista Alcides d'Orbigny contribuiu significativamente para o conhecimento dos ampulárideos com a publicação dos resultados de sua expedição pela América do Sul entre 1826 e 1833. Este autor propôs o nome *Asolene* (do grego: α – privado; σωλην – tubo, canal) como um subgênero de *Ampullaria* (atualmente sinonímia de *Pomacea* e *Pila*) para agrupar os ampulárideos aparentemente desprovidos de sifão respiratório e incluiu *Ampullaria platae* Maton, 1811 e *A. celebensis* Quoy & Gaimard, 1834 (esta última atualmente incluída em *Pila*).

Apesar do nome do gênero ter sido proposto devido à ausência de sifão respiratório, o animal possui um sifão respiratório pouco extensível (Hylton Scott, 1958; Thiengo, 1995). Os representantes deste gênero possuem concha globosa com umbílico largo e profundo, lábio espesso, opérculo córneo e oviposição abaixo do nível da água, com desova gelatinosa (Thiele, 1931; Tillier, 1980; Hylton Scott, *op. cit.*; Thiengo, *op. cit.*).

Devido aos poucos estudos sobre a morfologia e biologia de *Asolene*, a taxonomia deste gênero é uma das mais confusas dentro de Ampullariidae. O número de espécies nele incluídas ainda é impreciso e, portanto, adotaremos o proposto por Thiengo *et al.* (2011): *Asolene platae*, *A. pulchella* (Anton, 1838) e *A. spixii* (d'Orbigny, 1838) com ocorrência nas bacias do rio Paraná, rio da Prata e rio Uruguai; *A. crassa* (Swainson, 1823), *A. granulosa* (Sowerby, 1894) e *A. petiti* (Crosse, 1891) na Amazônia e Guianas; e *A. meta* (Ihering, 1915) na bacia do rio São Francisco (Figura 3).

Com relação aos trabalhos realizados com *Asolene*, podemos destacar: Hylton Scott (1958) que descreveu a concha e a distribuição geográfica de *A. platae*, *A. pulchella* e *A. spixii*; Bonetto & Ezcurra de Drago (1966) que forneceram observações sobre as desovas de alguns gastrópodes límnicos, entre eles *A. pulchella*; Tillier (1980) que apresentou a anatomia da cavidade palial e complexo peniano de *A. crassa* e *A. granulosa*; Martín (1984; 1987; 1988) que estudou o complexo peniano, o ciclo reprodutivo e a morfologia genital feminina de *A. platae*, respectivamente; Martin & Negrete (2007) que compararam a rádula de cinco ampulariídeos neotropicais com auxílio de microscopia eletrônica de varredura, incluindo *A. platae*; Tiecher *et al.* (2013) que estudaram o comportamento reprodutivo, oviposição e desenvolvimento embrionário de *A. pulchella*.

Dentre os trabalhos sobre *Asolene*, as espécies mais estudadas foram *A. platae* e *A. pulchella*. Embora estudos sobre *A. spixii* tenham sido realizados, sua anatomia é desconhecida, assim como a de *A. meta*. Devido ao uso de ampulariídeos na aquicultura, incluindo *Asolene* spp. com o nome popular de “Zebra apple snail”, existe uma grande possibilidade da introdução destes animais em áreas não endêmicas (Smith, 2006). Desta forma, o conhecimento anatômico para a identificação destas espécies é de suma importância.



Figura 3 - Mapa da América do Sul mostrando a distribuição das espécies de *Asolene*. Fonte: Hayes, 2009.

1.5 Justificativa

Conforme exposto, apesar da importância e ampla distribuição dos ampulariídeos, a discriminação das espécies ainda permanece confusa. A clarificação da taxonomia dos ampulariídeos permitirá elucidar dados sobre a distribuição, dispersão e diversidade destes moluscos, além de suas relações de parentesco.

Neste contexto, a revisão da taxonomia e sistemática dos ampulariídeos neotropicais constitui uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz em colaboração com os pesquisadores do Center of Conservation, Research and Training/University of Hawaii, através de estudos moleculares e morfológicos. Desta forma, o presente estudo, inserido neste projeto, visa contribuir para o conhecimento morfológico e taxonômico do gênero *Asolene*, através do estudo de duas espécies ainda muito pouco investigadas, *A. meta* e *A. spixii*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar o estudo morfológico dos ampulariídeos *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838), visando contribuir para o conhecimento da taxonomia do gênero *Asolene*.

2.2 Objetivos Específicos

- Redescrever a anatomia de *Asolene meta*, com base em material topotípico, bem como a de *Asolene spixii*, proveniente de Eldorado do Sul, RS.
- Investigar a ocorrência de dimorfismo sexual em ambas as espécies através de análises conquiliométricas;
- Discriminar os caracteres diagnósticos que auxiliem a identificação de *A. meta* e *A. spixii*.
- Avaliar a distância genética entre *A. meta* e espécies filogeneticamente próximas, com base na região citocromo oxidase subunidade I (COI).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta, manutenção e fixação do material

Para este estudo, foram utilizados exemplares de *Asolene meta* provenientes de Penedo (AL), Propriá (SE) (Figuras 4, 5A-B) e da localidade tipo, Barra (BA) (Figuras 4, 5C-D). Adicionalmente, foram obtidos exemplares provenientes de Juazeiro (BA) e Casa Nova (BA) (Figura 4) doados pela equipe do Laboratório de Malacologia Límnica e Terrestre/Uerj. Os espécimes de *A. spixii* foram coletados no município de Eldorado do Sul (RS) (Figuras 6, 7A-B). O material estudado encontra-se tombado na Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz (CMIOC) e na Coleção de Moluscos do Museu Nacional/UFRJ (MNRJ) (Tabela 1).

A coleta dos moluscos foi realizada de acordo com a técnica descrita por Fernandez *et al.* (2007) e as estações de coleta foram fotodocumentadas e georreferenciadas com aparelho GPS (Global Positioning System) (Tabela 1). Além disso, a desova de *A. spixii* foi observada *in situ*.

Os espécimes coletados foram transportados ao Laboratório de Referência Nacional em Malacologia Médica/Instituto Oswaldo Cruz, onde foram previamente anestesiados em solução de 2% de Hypnol® (Cristália, Brasil) durante 8-14 h, retirados da concha e uma amostra do pé foi preservada em álcool etílico 96% para análises moleculares. As partes moles foram preservadas em solução de Railliet-Henry (2% ácido acético, 5% formalina, 0,6% NaCl) ou álcool etílico 70% para macroanatomia ou Formalina Millonig de Carson para microanatomia. Os espécimes de *Asolene meta* provenientes de Juazeiro e Casa Nova e 32 indivíduos de *A. spixii* foram fixados com base na técnica *niku-nuki* modificada (Fukuda, *et al.*, 2008). Esta técnica consiste em alocar os espécimes em um recipiente contendo um pouco de água até que estejam em movimento. Posteriormente sacrificá-los em água quente a 100° C durante aproximadamente um minuto e fixar os exemplares em álcool etílico 96%. Após um período de no mínimo 24 horas, deve-se retirá-los da concha, onde uma amostra do tecido do pé deve ser mantida em álcool etílico 96% para estudos moleculares e o restante da anatomia em álcool 70%. Segundo Fukuda *et al.* (*op. cit.*), com esta metodologia de fixação, a preservação tanto da concha quanto da parte mole é mais bem sucedida, podendo ser aplicada a todos os moluscos com concha externa.

Espécimes de *A. meta*, sendo 20 provenientes de Juazeiro, 20 de Casa Nova e 26 da Barra estão sendo mantidos em aquários contendo água desclorada, substrato (areia e pedras) e plantas aquáticas, alimentados com alface fresca diariamente. Além disso, seis exemplares de *A. spixii* provenientes de ovos coletados em campo foram mantidos para a manutenção de uma colônia desta espécie em laboratório.

Tabela 1 – Localidades, coordenadas geográficas, espécimes analisados e número de tombo de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838).

Espécie	Localidade	Data de coleta	Coletores	Coordenadas Geográficas	Espécimes analisados	Estruturas analisadas	Número de tombo
<i>A. meta</i>	Penedo (AL)	17.11.06	Kenneth Hayes, Aline Mattos, Silvana Thiengo	S10°17'59.7" W36°35'02.2"	13	SRM; R; SD; PE	CMIOC 5838
<i>A. meta</i>	Propriá (SE)	17.11.06	Kenneth Hayes, Aline Mattos, Silvana Thiengo	S10°11'14.7" W36°50'53.1"	5	SRM; R; SD	CMIOC 5837 MNRJ 15463
<i>A. meta</i>	Barra (BA)	18.09.11	Aline Schilithz, Silvana Thiengo	S10°50'50.9" W43°13'49.3"	39	C; AE; CM; SRM; SRF; R; SD; PE; SN; RA;	CMIOC 7742
<i>A. meta</i>	Juazeiro (BA)	24.10.12	Igor Miyahira, Luiz Eduardo de Lacerda, Renata Braga	S09°18'50.2" W40°50'30.6"	10	AE; CM; SRM; SRF; R	CMIOC 7743
<i>A. meta</i>	Casa Nova (BA)	24.10.12	Igor Miyahira, Luiz Eduardo de Lacerda, Renata Braga	S09°10'57.4" W40°58'04.2"	10	AE; CM; SRM; SRF; R	CMIOC 7744

<i>A. spixii</i>	Eldorado do Sul (RS)	15.01.13	Aline Schilithz	S30°03'05.31" W51°31'08.16"	32	C; AE; CM; SRM; SRF; R; SD; PE; SN; RA;	CMIOC 7745
------------------	-------------------------	----------	-----------------	--------------------------------	----	--	------------

Siglas: AE: anatomia externa; C: concha; CM: cavidade do manto; CMIOC: Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz; MNRJ: Coleção de Moluscos do Museu Nacional/UFRJ; PE: pericárdio; R: rim; RA: rádula; SD: sistema digestório; SN: sistema nervoso. SRF: sistema reprodutor masculino; SEM: sistema reprodutor feminino.

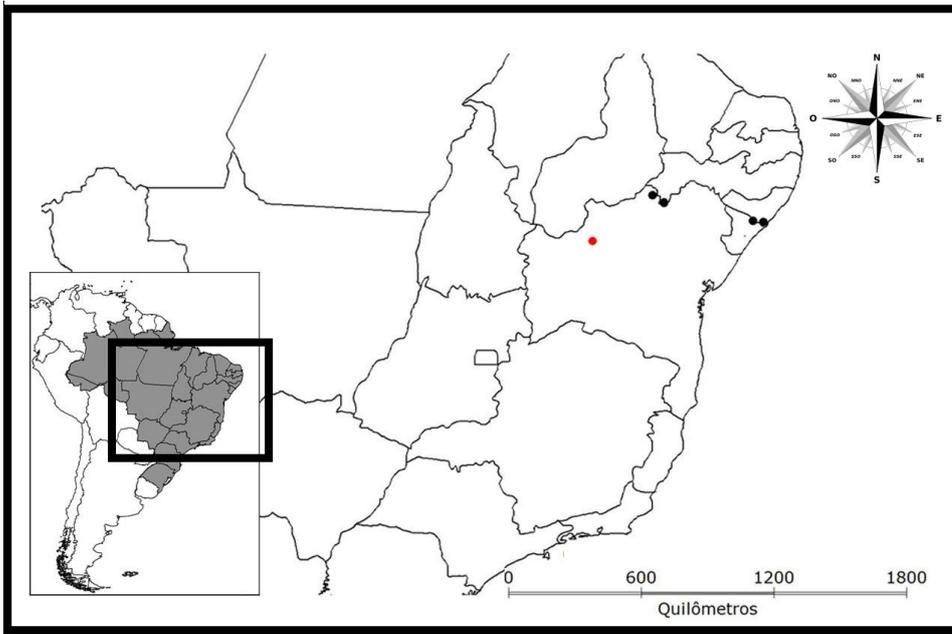


Figura 4 – Mapa da América do Sul com ênfase dos pontos de coleta de *Asolene meta* (Ihering, 1915), além da localidade tipo (vermelho), município da Barra (Bahia).



Figura 5 – Biótopos de *Asolene meta* (Ihering, 1915): rio São Francisco em Propriá, Sergipe (A-B); brejo na localidade tipo, Barra, Bahia (C-D).

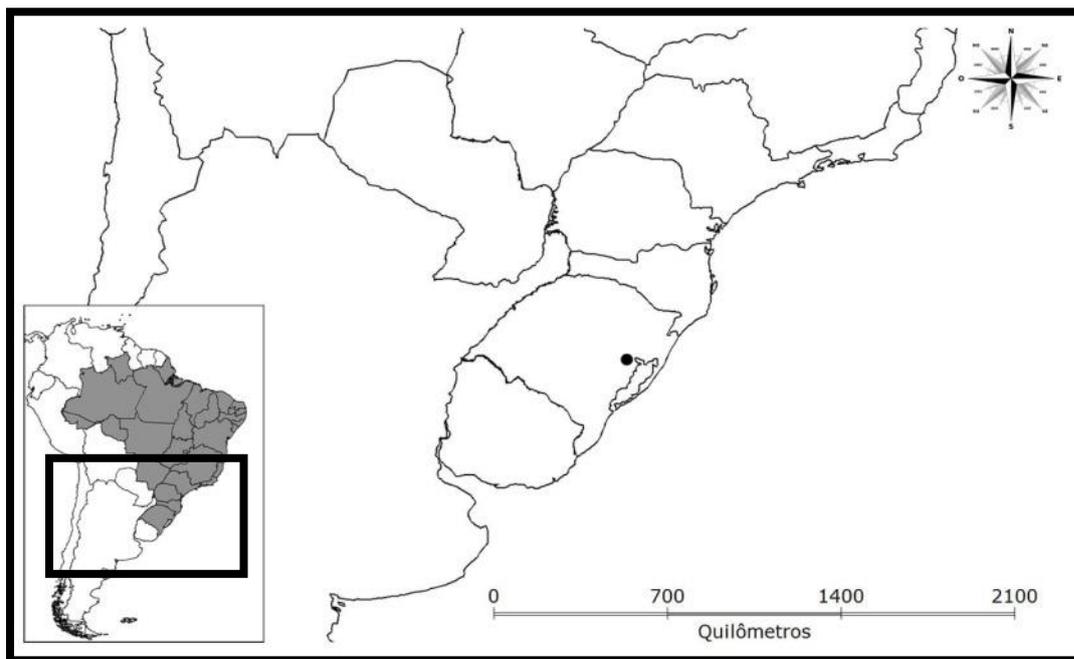


Figura 6 – Mapa da América do Sul com ênfase do ponto de coleta de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838), município de Eldorado do Sul (Rio Grande do Sul).

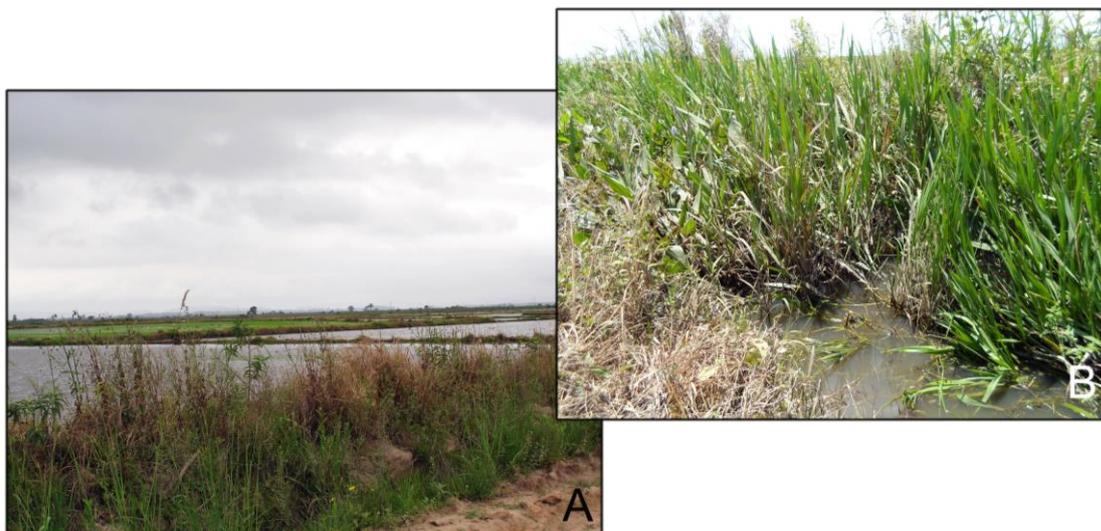


Figura 7 - Biótopo de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838) : plantação de arroz no município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (A-B).

3.2 Conquiliologia

As conchas e os opérculos de exemplares adultos foram fotografados e caracterizados quanto à forma e ornamentação. Para a conquiliometria, foram mensurados com auxílio de paquímetro digital (marca Vonder, precisão 0,01 mm), obtendo-se 13 medidas lineares: altura total da concha (At), altura da primeira volta (A1), altura da segunda volta (A2), largura total da concha (Lt), largura da primeira volta (L1), largura da segunda volta (L2), eixo columelar (Ec), volta corporal (Vc), altura da abertura (Aa), largura da abertura (La) (Figura 8A), altura total do opérculo (Ao), altura da porção anterior do opérculo (acima do núcleo) (Ao1), altura da porção posterior do opérculo (abaixo do núcleo) (Ao2) e largura do opérculo (Lo) (Figura 8B).

Adicionalmente, as voltas (VI) das conchas foram medidas de acordo com Burch (1962), onde se traça uma linha horizontal no início da sutura com o extremo da concha voltado para cima, depois se traça uma reta perpendicular à primeira, a qual determina o número de voltas completas (Figura 9A). A partir do eixo principal, cada quarto da concha é dividido em 2, 4, 8 ou 16 vezes, onde a fração de volta é contada desde a última volta completa até o limite da abertura (Figura 9B).

Além das medidas lineares e o número de voltas, 18 relações entre essas medidas foram analisadas: Lt/At , Vc/At , Vc/Lt , Aa/Lt , La/Aa , Lo/Ao , At/Aa , $A1/L1$, $A2/L2$, $Ao1/Ao2$, $Ao1/Ao$, $Ao2/Ao$, VI/At , VI/Lt , $(A1/L1)/(A2/L2)$, $(A1/L1)/(Vc/Lt)$, $(A2/L2)/(Vc/Lt)$, totalizando 31 variáveis.

Os dados obtidos foram organizados em planilhas do Excel (Microsoft Office) e as análises estatísticas foram realizadas através do programa SYSTAT 12 (versão 12.02.00). Primeiramente foi realizada a estatística descritiva básica de cada variável (mínimo, máximo, média e desvio padrão). Para verificar a normalidade das variáveis, foram utilizados os testes de Anderson-Darling (Anderson & Darling, 1952) e Shapiro Wilk (Shapiro & Wilk, 1965). As variáveis que não apresentavam distribuição normal foram transformadas utilizando logaritmo de $(X + 1)$, seno de X , cosseno de X , inverso de $1/X$ ou raiz de X e, em seguida, padronizadas (Krebs, 1998; Zar, 1999).

Para analisar se através dessas variáveis as espécies podem ser conquiliologicamente distinguidas, foram aplicados os testes estatísticos Teste t de Student, Análise de Escalonamento Multidimensional e Análise Discriminante (Arango, 2005; Engelman, 1997). Foi utilizada a Correlação de Pearson para

verificar quais variáveis são altamente correlacionadas, considerando elevadas as correlações maiores que ou iguais a 90%, as quais foram excluídas da Análise Discriminante.

Além disso, para verificar a ocorrência de dimorfismo sexual nas espécies estudadas, as mesmas análises foram aplicadas entre as medidas dos exemplares machos e fêmeas de cada espécie.

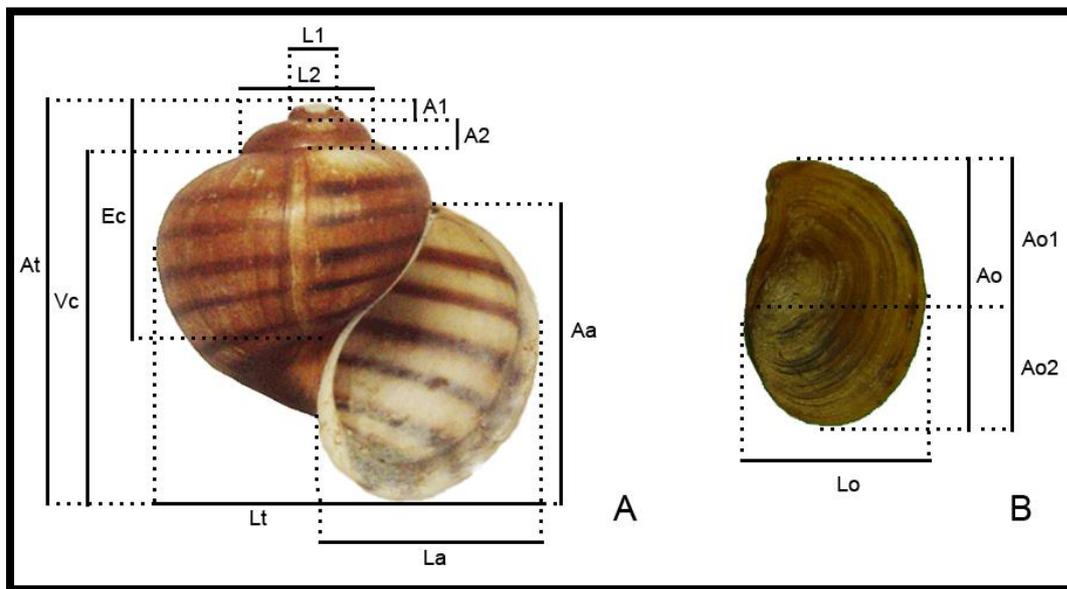


Figura 8 - Mensurações das conchas (A) e dos opérculos (B) dos espécimes estudados. Aa: altura da abertura; Ao: altura do opérculo; Ao1: altura da porção anterior do opérculo; Ao2: altura da porção posterior do opérculo; At: altura total da concha; A1: altura da primeira volta; A2: altura da segunda volta; Ec: eixo columelar; La: largura da abertura; Lo: largura do opérculo; Lt: largura total da concha; L1: largura da primeira volta; L2: largura da segunda volta; Vc: volta corporal.

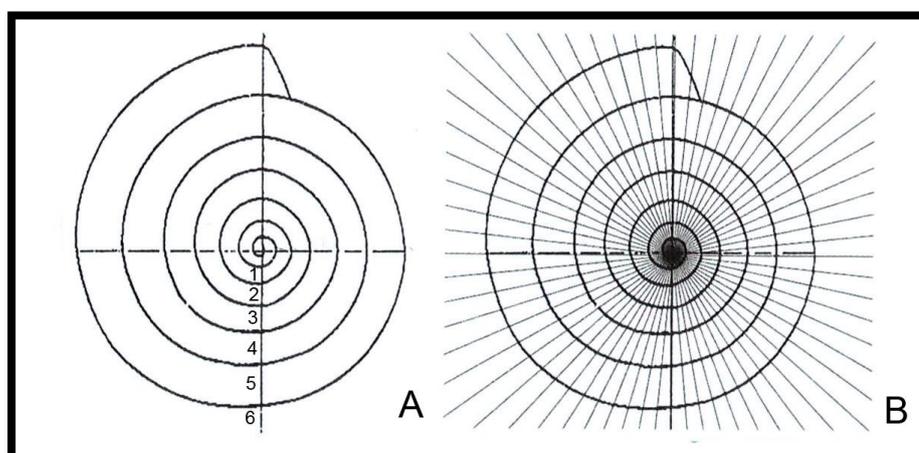


Figura 9 – Esquema da contagem do número de voltas completas (A) e a fração de volta (B), com base em Burch, 1962.

3.3 Morfologia

Para a macroanatomia, exemplares adultos (Tabela 1) foram dissecados com auxílio de microscópio estereoscópico (marca Zeiss, modelo Stemi SV11) com câmara clara acoplada. Os sistemas reprodutor, digestório e nervoso, o rim e o pericárdio foram desenhados, onde algumas estruturas foram coradas com Azul de Toluidina aquosa para melhor visualização.

Para a microanatomia, o complexo peniano de três exemplares de *A. meta* e dois de *A. spixii* foi submetido às técnicas usuais de histologia (desidratação, diafanização em xilol e inclusão em parafina). Foram realizados cortes seriados de 5 µm, corados com hematoxilina-eosina e montados em lâmina permanente com bálsamo do Canadá. Para caracterizar a constituição dos agregados hemocitários (glicoproteínas, colágenos, proteoglicanos) lâminas de cada espécie foram coradas com Alcian Blue pH 1,0 e 2,5, PAS e Reticulina de Gomori. Com a coloração Alcian Blue pH 1,0 (Lev & Spicer, 1964), proteoglicanos de alta sulfatação apresentam característica tintorial (azul escuro), enquanto na coloração Alcian Blue pH 2,5 (Lev & Spicer, *op. cit.*), são corados os proteoglicanos de baixa sulfatação e carboxilados (azul escuro). Com a coloração PAS (McManus, 1946), as glicoproteínas neutras apresentam característica tintorial em vermelho. Com a Reticulina de Gomori (Gomori, 1937), as fibras reticulares e os colágenos intersticiais são corados em negro e marrom, respectivamente. As fotomicrografias foram obtidas através de captação de imagem acoplada ao microscópio. Esta etapa foi realizada em colaboração com a Dra. Ester M. Motta do Laboratório de Patologia/Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Para o estudo da rádula, todo o bulbo bucal de seis exemplares de cada espécie foi removido, alocado em eppendorf de 1 ml contendo 600 µl de tampão de lise ATL (Qiagen, Inc.) e 400 µg de proteinase K e mantido a temperatura de 60° até a completa digestão do tecido (Hayes, *et al.*, 2012). A rádula extraída foi lavada em água destilada, levemente seca e montada em suporte de alumínio (“stub”) revestido com fita dupla-face e metalizada com 20nm de camada de ouro. As fotomicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (marca Jeol JSM-6390 LV em voltagem de 15 kV) da plataforma de Microscopia Eletrônica do Instituto Oswaldo Cruz, em colaboração com a Dra. Helene Barbosa do Laboratório de Biologia Estrutural/Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

3.4 Sequenciamento do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) de *Asolene meta* através de técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR)

O DNA genômico (gDNA) foi extraído do tecido do pé de dez exemplares de *A. meta* provenientes do município da Barra (BA), através do kit de extração DNeasy™ (Qiagen Inc.), de acordo com as instruções do fabricante. O gDNA dos exemplares de *A. spixii* não foi extraído, uma vez que foram coletados na mesma localidade dos seqüenciados por Hayes *et al.* (2009a).

Fragmentos do COI foram amplificados utilizando os iniciadores LCO e HCO (Folmer *et al.*, 1994), de acordo com o protocolo proposto por Hayes *et al.* (2009a). Os produtos da amplificação foram purificados com kit de purificação CFX PCR Dna (GE Healthcare Life Sciences Inc.) e sequenciados na Plataforma Institucional de Sequenciamento da FIOCRUZ. Os eletroferogramas foram editados e ambas as fitas foram unidas utilizando o programa SeqMan Lasergene versão 7.0 (DNASStar Inc).

As sequências obtidas foram alinhadas sem ambigüidade através do programa Mega versão 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), utilizando a sequência de aminoácidos como referência, e comparadas com as depositadas no GenBank (*Blast* server). Com base na filogenia de Hayes (2009), as sequências das espécies mais próximas de *A. meta* depositadas no GenBank foram utilizadas para as análises de divergência genética, através do programa Mega versão 5.2 com base em dois modelos, máxima verossimilhança e *p-distance*.

4 RESULTADOS

4.1 *Asolene d'Orbigny, 1838*

Asolene: d'Orbigny, 1838: 364.

Ampulloidea: d'Orbigny, 1841: 379. Novo nome proposto para o gênero.

Ampulloides: d'Orbigny, 1842: 1. Grafia incorreta de *Ampulloidea*.

Asolena: Troschel, 1838: 279; Herrmannsen, 1846: 84. Grafia incorreta de *Asolene*.

Ampullaroides: Gray, 1847: 148. Grafia incorreta de *Ampulloides*.

Espécie tipo: *Ampullaria platae* Maton, 1811 designado por Gray (1847: 148).

Diagnose: concha globosa, espessa, com umbílico largo e profundo; sem dimorfismo sexual no opérculo; sifão respiratório pouco desenvolvido; coração com ampola ovalada; desova gelatinosa com oviposição abaixo do nível da água.

4.2 *Asolene meta* (Ihering, 1915)

Ampullaria meta: Ihering, 1915: 12, figs. 6 e 7.

Pomacea meta (Ihering, 1915): Cowie & Thiengo, 2003: 69.

Pomacea meta Ihering, 1915: Simone, 2006: 55, fig. 92.

Asolene meta (Ihering, 1915): Thiengo *et al.*, 2005; Hayes, 2009: 104; Schilithz, 2010.

Localidade tipo: "Cidade da Barra, Rio S. Francisco, Bahia" (Ihering, 1915).

Holótipo: MNRJ 12861 (uma concha)

Material examinado: holótipo proveniente do município da Barra, Bahia (MNRJ, 12861), 13 espécimes de Penedo, Alagoas (CMIOC 5838), 05 de Propriá, Sergipe (CMIOC 5837, MNRJ 15463), 39 da Barra, Bahia (CMIOC), 10 de Juazeiro, Bahia (CMIOC 7742) e 10 de Casa Nova, Bahia (CMIOC 7744).

Diagnose: concha com abertura ovalada, 3 a 4 voltas; câmara anterior do rim alongada; glândula apical da bainha do pênis pregueada, ocupando $\frac{1}{4}$ da bainha e glândula mediana ovalada e lisa, localizada centralmente no lado direito da bainha.

4.2.1 *Descrição original*

“Esta pequena concha achada n’uma lagoa perto da Cidade da Barra, Rio S. Francisco, Bahia, é solida, bem conservada, com excepção do ápice que é corroído. A forma é oval alargada, a espira curta, larga. As ultimas voltas tem a parte superior ao lado das outras achatada, o umbigo é profundo e largo, em parte coberto pela margem columellar, que é reflexo. A epiderme é de côr amarella e em parte mais escura com numerosas estrias longitudinaes, que são cortadas por numerosas faixas de sulcos espiraes. Na ultima volta perto da abertura notam-se exteriormente vestígios de duas faixas escuras duplas. O labro columellar é reflexo e de cor laranja como também o labro exterior, ao passo que o resto do interior da abertura é pallido-amarella. Duas faixas escuras longitudinaes na ultima e na penúltima volta marcam perístomas antigos” (Ihering, 1915) (Figura 10).



Figura 10 - Desenho da concha de *Asolene meta* (Ihering, 1915) retirado da descrição original. Fonte: Ihering, 1915.

4.2.2 *Redescrição do Holótipo*

Concha globosa, espessa, amarelada, com discretas estrias transversais, com 28,35 mm de comprimento e 29,55 mm de largura. Sem perióstraco. Espira curta com ápice corroído. 4 $\frac{3}{4}$ voltas convexas, delimitadas por uma sutura bem evidente, levemente inclinada para a esquerda. Volta corporal com 25,6 mm e eixo columelar com 16, 1 mm. Umbílico largo e profundo. Abertura ovóide, com 21,3 mm de altura e 15,7 mm de largura, lábio bem definido com coloração branca (Figura 11).



Figura 11 – Holótipo por monotipia depositado na Coleção de Moluscos do Museu Nacional/ RJ (MNRJ 12861). Escala: 10 mm.

4.2.3 Caracterização

4.2.3.1 Concha

Concha globosa, espessa, amarela a castanho, com estrias transversais pouco evidentes e bandas espirais castanho escuras que variam em número e espessura, ausentes em alguns espécimes provenientes de Casa Nova e Juazeiro. Com $27,81 \pm 1,85$ mm de altura e $30,26 \pm 2,05$ mm de largura. Espira curta, com razão entre a espira e a altura total da concha variando de 0,05 a 0,15 ($0,09 \pm 0,02$; $n = 39$). Ápice geralmente corroído. Três a quatro voltas convexas ($3,76 \pm 0,38$), separadas por uma sutura bem definida levemente inclinada para esquerda. Volta corporal ocupando mais de $\frac{3}{4}$ da concha, com $25,21 \pm 1,61$ mm de altura. Umbílico largo e profundo. Abertura oval, lábios interno e externo bem definidos, algumas vezes apresentando uma espessa camada interna branca nos exemplares adultos, com $19,34 \pm 1,49$ mm de altura e $14,91 \pm 1,01$ mm de largura (Figura 12A-C).

Opérculo córneo com núcleo concêntrico, espesso, inflexível, castanho escuro, selando completamente a abertura, uniformemente côncavo tanto nas fêmeas quanto nos machos (Figura 13).

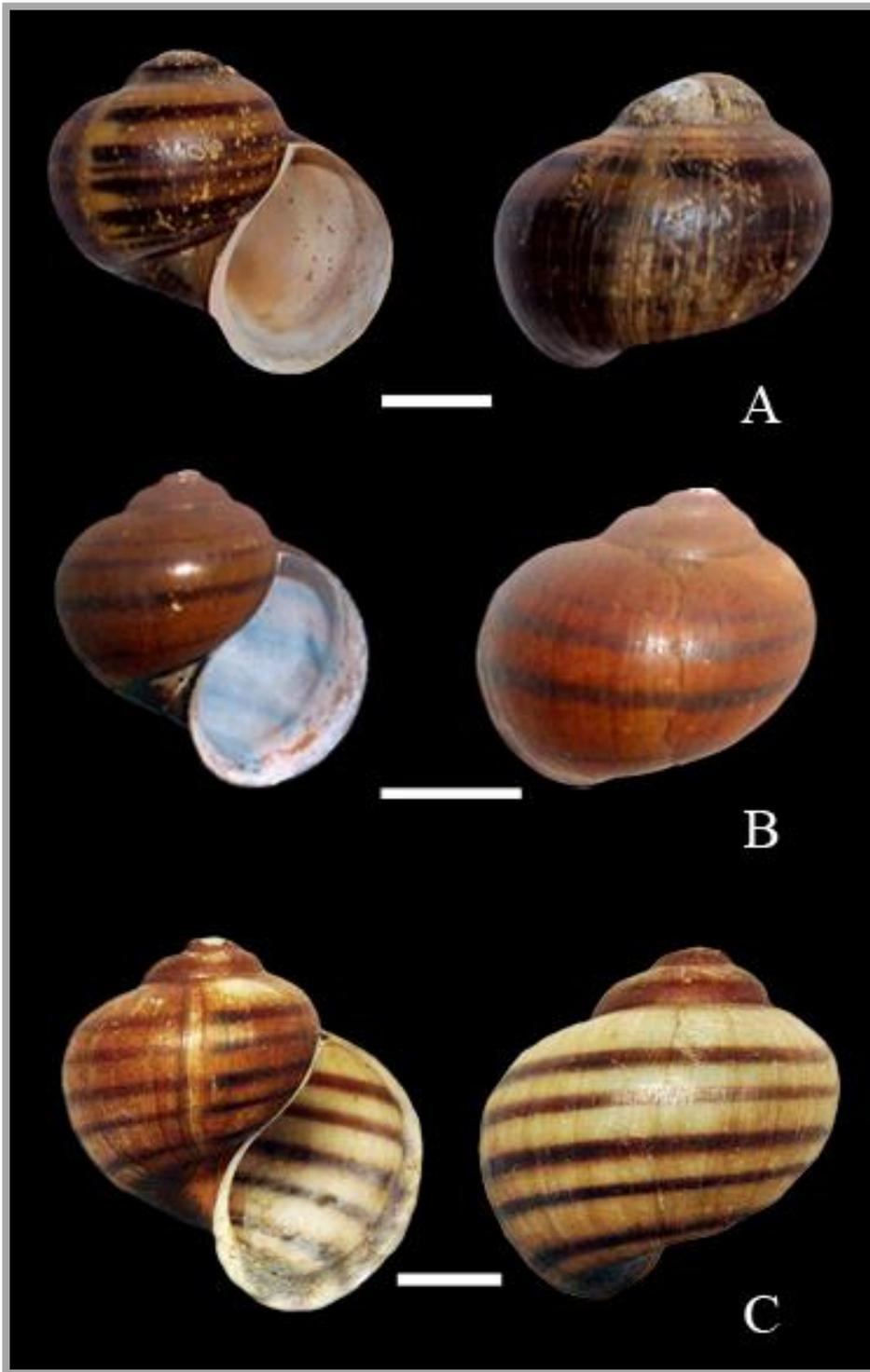


Figura 12 - Conchas de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra, Bahia (A), Casa Nova, Bahia (B) e Propriá, Sergipe (C). Escala: 10 mm.

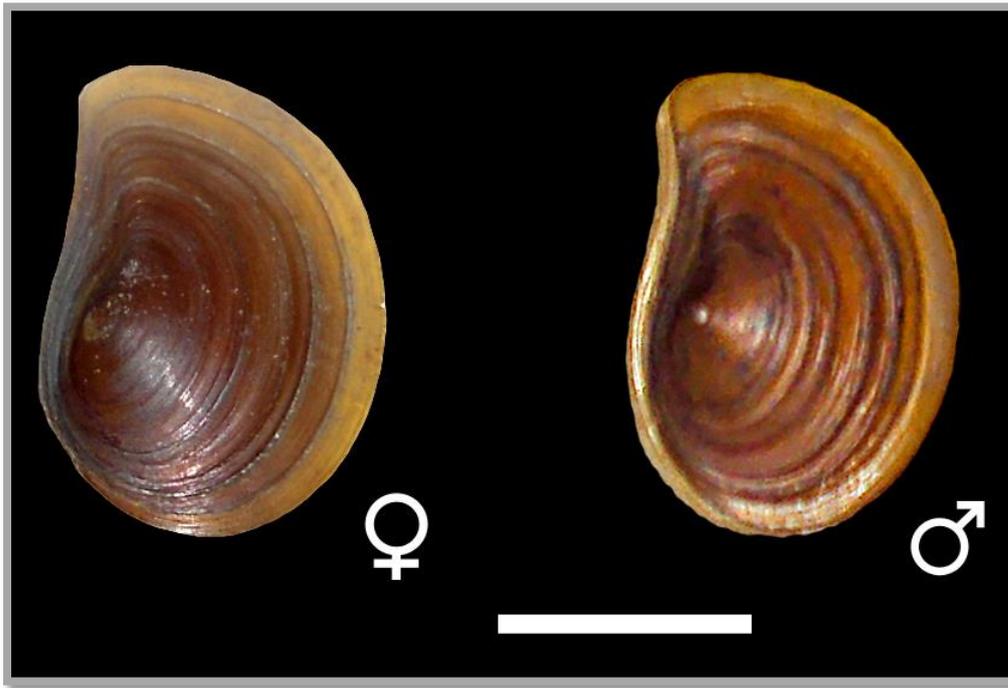


Figura 13 – Opérculos de exemplares fêmea e macho de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra, Bahia. Escala: 5 mm.

4.2.3.2 Anatomia externa

Pé oval alongado, com as bordas arredondadas, coloração de cinza a amarelada, geralmente pigmentado. Cabeça bem definida com tentáculos cefálicos longos e altamente extensíveis. Pedúnculos oculares na base dos tentáculos cefálicos abrigando os olhos. Probóscide curta, retangular, com a extremidade anterior elaborada em palpos labiais tentaculiformes extensíveis com função sensorial. Em ambos os lados da nuca do animal encontram-se os lobos nucais. O lobo nucal direito, ou sifão exalante, é ligeiramente côncavo e o lobo nucal esquerdo, ou sifão inalante, é pouco extensível, formando um canal em forma de colher, utilizado para direcionar o ar atmosférico para o saco pulmonar. Borda do manto espessa com faixas pigmentadas. A região do manto sobre o saco pulmonar e as brânquias até parte do rim anterior é fortemente pigmentada de preto, sendo delgada sobre a massa visceral (Figuras 14A-B).

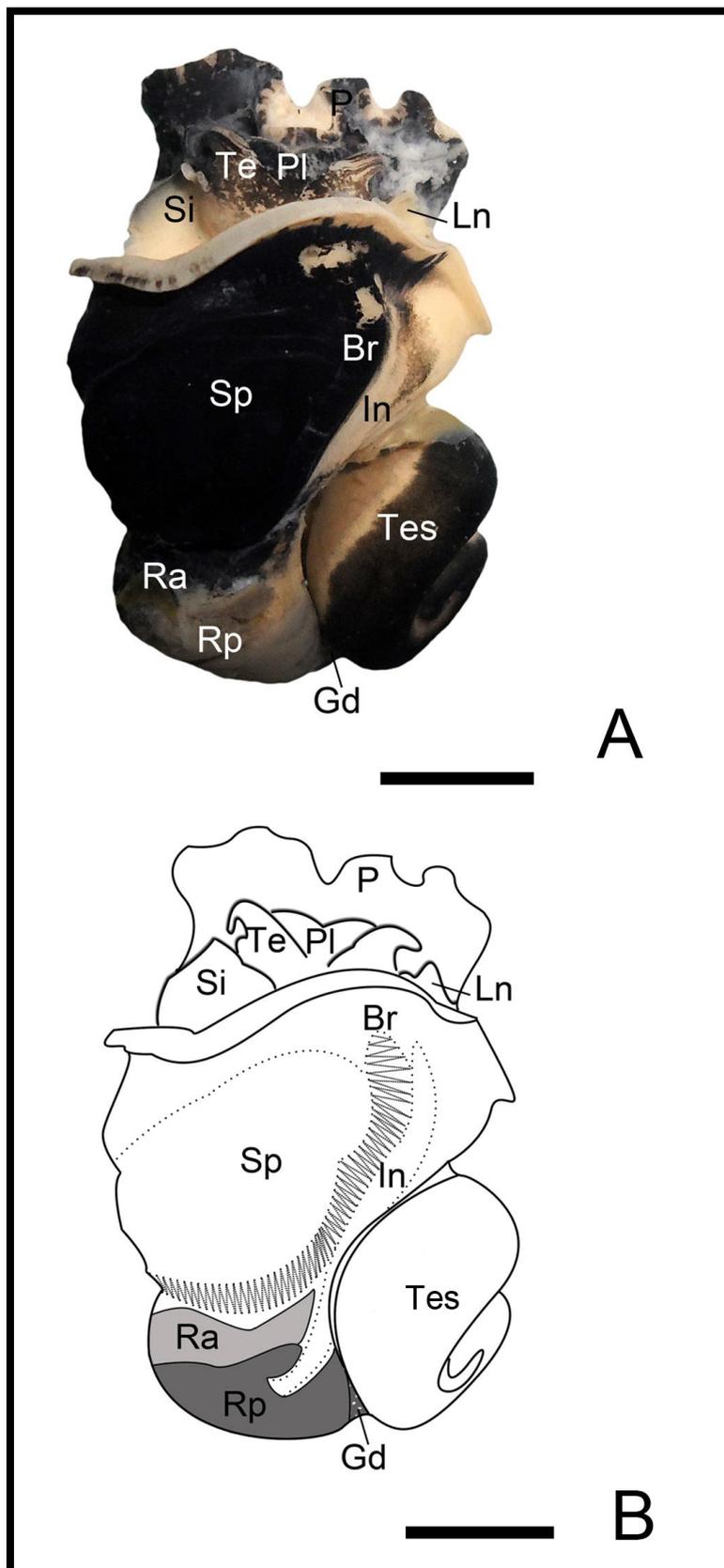


Figura 14 – Anatomia externa de um exemplar macho de *Asolene meta* (Ihering, 1915): foto (A) e esquema (B). Br: brânquias; Gd: glândula digestiva; In: intestino; Ln: lobo nuchal direito; P: pé; Pl: palpos labiais; Ra: rim anterior; Rp: rim posterior; Si: sifão inalante; Sp: saco pulmonar; Te: tentáculo; Tes: testículo. Escala: 10 mm.

4.2.3.3 Caverna do manto

A caverna do manto (Figuras 15A-B) é ampla, ocupando em torno de 1/3 da volta corporal, abrigando o saco pulmonar e o osfrádio no lado esquerdo e as brânquias e partes dos sistemas reprodutor e digestório no lado direito. Saco pulmonar volumoso, com pneumóstoma localizado centralmente na porção anterior. Osfrádio (Figuras 16A-B) anterior ao saco pulmonar, próximo ao sifão inalante e acima do pneumóstoma, oval alongado com uma crista bipectinada na porção posterior, seguindo uma única crista central com cristas longitudinais.

Brânquias formadas por pequenas lamelas triangulares, com uma longa extensão desde a base da borda do manto até o pericárdio, seguindo ao longo do saco pulmonar. Glândula hipobranquial estreita localizada entre as brânquias e o intestino. Nos machos, o complexo peniano encontra-se na base da borda do manto. Dobra palial cruzando a base da caverna do manto, começando abaixo do lobo nugal direito, sobrepondo à direita acima da próstata ou oviduto palial e seguindo até a base da caverna do manto. Abaixo da caverna do manto, localizam-se o pericárdio à esquerda e o rim à direita. Músculo columelar curto (Figuras 15A-B).

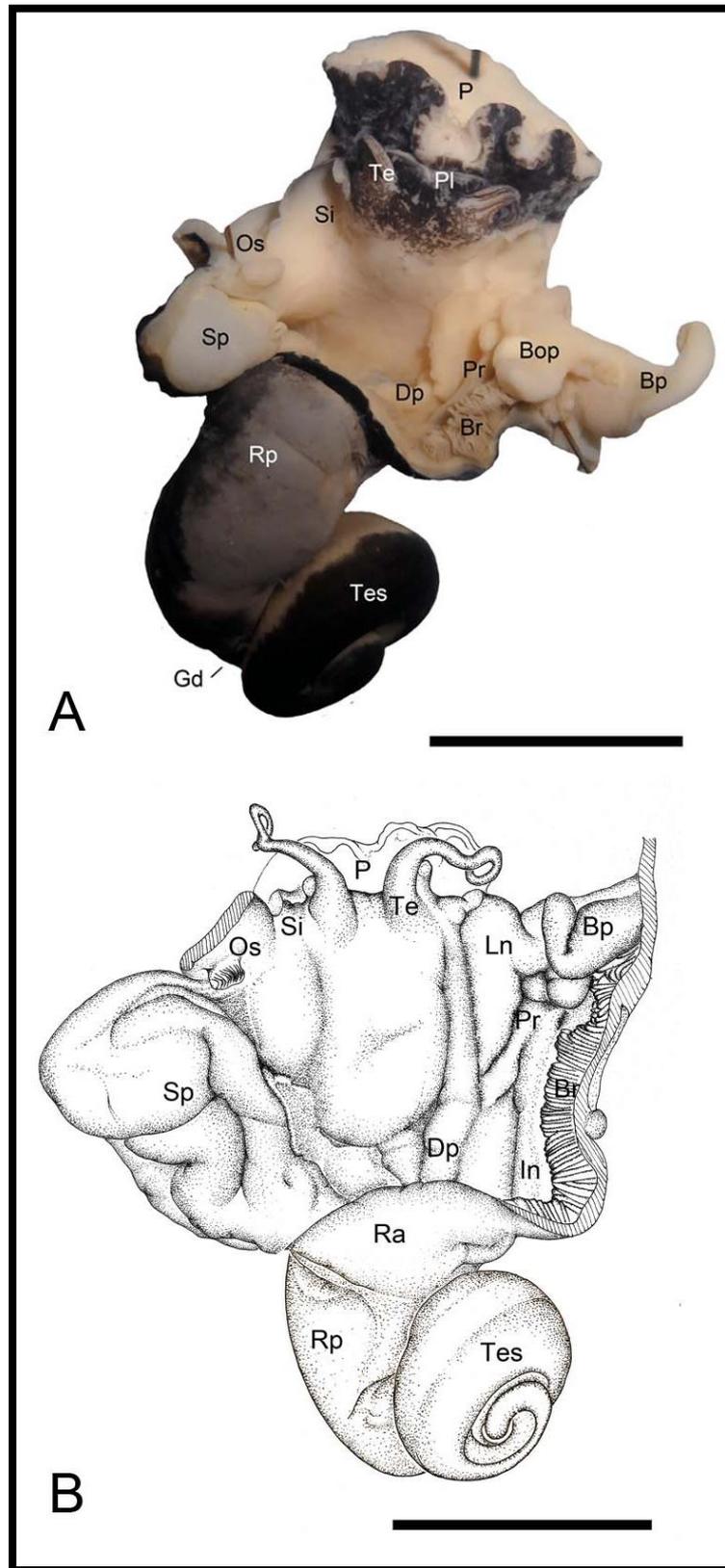


Figura 15 – Cavity do manto de um exemplar macho de *Asolene meta* (Ihering, 1915): foto (A) e esquema (B). Bop: bolsa do pênis; Bp: bainha do pênis; Br: brânquias; Dp: dobra palial; Gd: glândula digestiva; In: intestino; Ln: lobo nugal direito; Os: osfrádio; P: pé; Pl: palpo labial; Pr: próstata; Ra: rim anterior; Rp: rim posterior; Si: sifão inalante; Sp: saco pulmonar; Te: tentáculo; Tes: testículo. Escala: 10 mm.

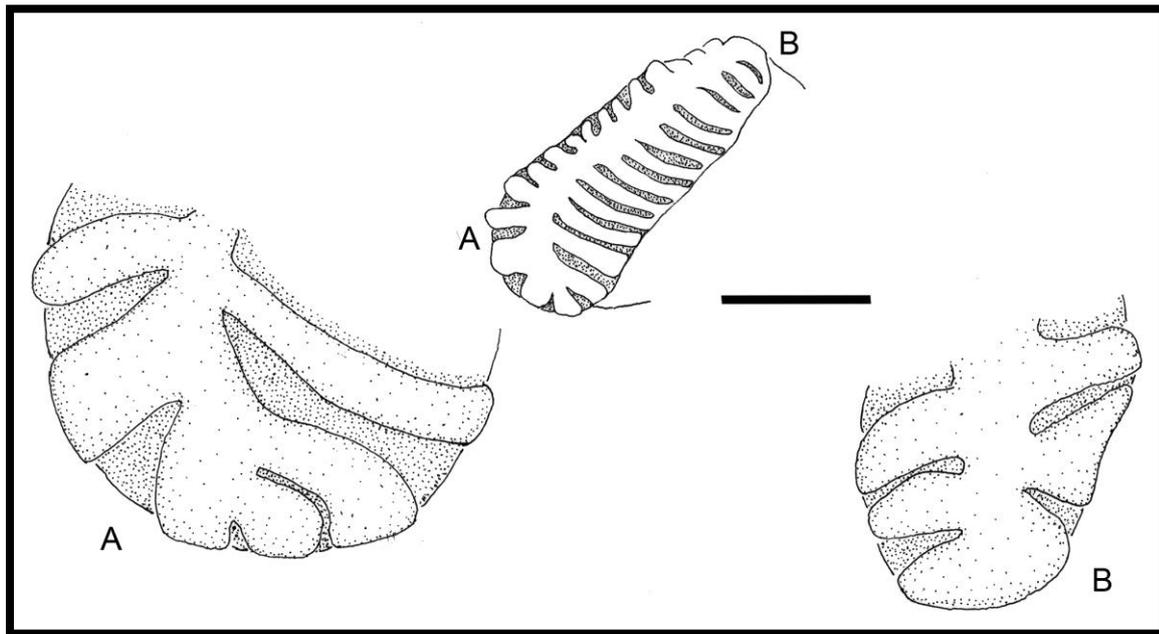


Figura 16 – Osfrádio de *Asolene meta* (Ihering, 1915), com destaque da região anterior (A) e da região posterior (B). Escala: 1 mm.

4.2.3.4 Sistema digestório

O sistema digestório dos ampulariídeos é dividido em três regiões: anterior, média e posterior. A região anterior compreende o aparato bucal e o esôfago, a região média o estômago, enquanto a região posterior compreende o intestino médio e o reto (Figura 17A).

A boca pregueada encontra-se situada na probóscide, na extremidade anterior da cabeça. O bulbo bucal é oval, fortemente muscular e abriga a rádula e a mandíbula. Sobre o bulbo bucal encontram-se os gânglios bucais, as glândulas salivares e sacos esofágicos (Figura 17B). Odontóforo largo ocupando grande parte da cavidade bucal.

Rádula (Figura 18A) do tipo taenioglossa, com média de 32 fileiras de dentes ($n = 6$). Dente central retangular com base côncava, cúspide central triangular e três a quatro cúspides pontiagudas menores de cada lado. A cúspide central é a maior, terminando em uma proeminência arredondada em alguns dentes ou pontiaguda em outros (Figura 18B). Dente lateral com base longa e ápice convexo, com quatro cúspides, sendo três menores e uma maior, triangulares e com as pontas afiladas. Alguns exemplares apresentaram cinco cúspides no dente lateral. Dentes marginais

alongados, com duas cúspides cada, uma maior e uma menor, triangulares e pontiagudos (Figura 18C).

Par de mandíbulas quitinosas, amarelas no centro e brancas na margem, rodeando a boca dorsalmente. Glândulas salivares esbranquiçadas e rugosas, atrás do gânglio bucal, sobrepondo os nervos bucais posteriores. Bolsa esofágica circundando o aparato bucal, amarelada, rugosa e massiva. Saco radular arredondado, saindo ventralmente ao bulbo bucal (Figura 17B). Seguindo o bulbo bucal encontra-se o papo, uma estrutura alargada e arredondada. Posteriormente ao papo, segue o esôfago (Figura 17A), cilíndrico, abaixo da base da cavidade do manto, desembocando na câmara gástrica.

Estômago altamente muscular, oval alongado, localizado à esquerda do animal, ao lado do rim posterior, com coloração branca na sua face externa. Câmara gástrica ampla, com inúmeras dobras em todo seu interior. Septo vertical alto, emergindo da abertura do esôfago e desembocando no profundo vestíbulo. Acima do vestíbulo encontra-se uma estrutura sacular, o escudo gástrico, com a extremidade anterior passando por baixo do septo vertical. Extremidade posterior da tiflossole maior elaborada em uma dobra arredondada, na parede anterior do vestíbulo. Bolsa gástrica formada por duas pequenas depressões, separadas por uma fina divisão, localizada no limite anterior do saco do estilete. Acima da bolsa gástrica segue a tiflossole menor, separada da tiflossole maior por uma fina dobra que desemboca na bolsa gástrica. Tiflossole maior emergindo da parede do vestíbulo (Figuras 17C-D).

O intestino dobra bruscamente a esquerda, seguindo ao longo do estômago para entrar abaixo do rim posterior, onde encontra-se enrolado em quatro voltas unidas por um fino mesentério. O intestino, então, emerge à direita do rim posterior e entra na cavidade do manto, seguindo o reto entre as brânquias e o oviduto palial nas fêmeas ou próstata nos machos até o ânus (Figura 17A).

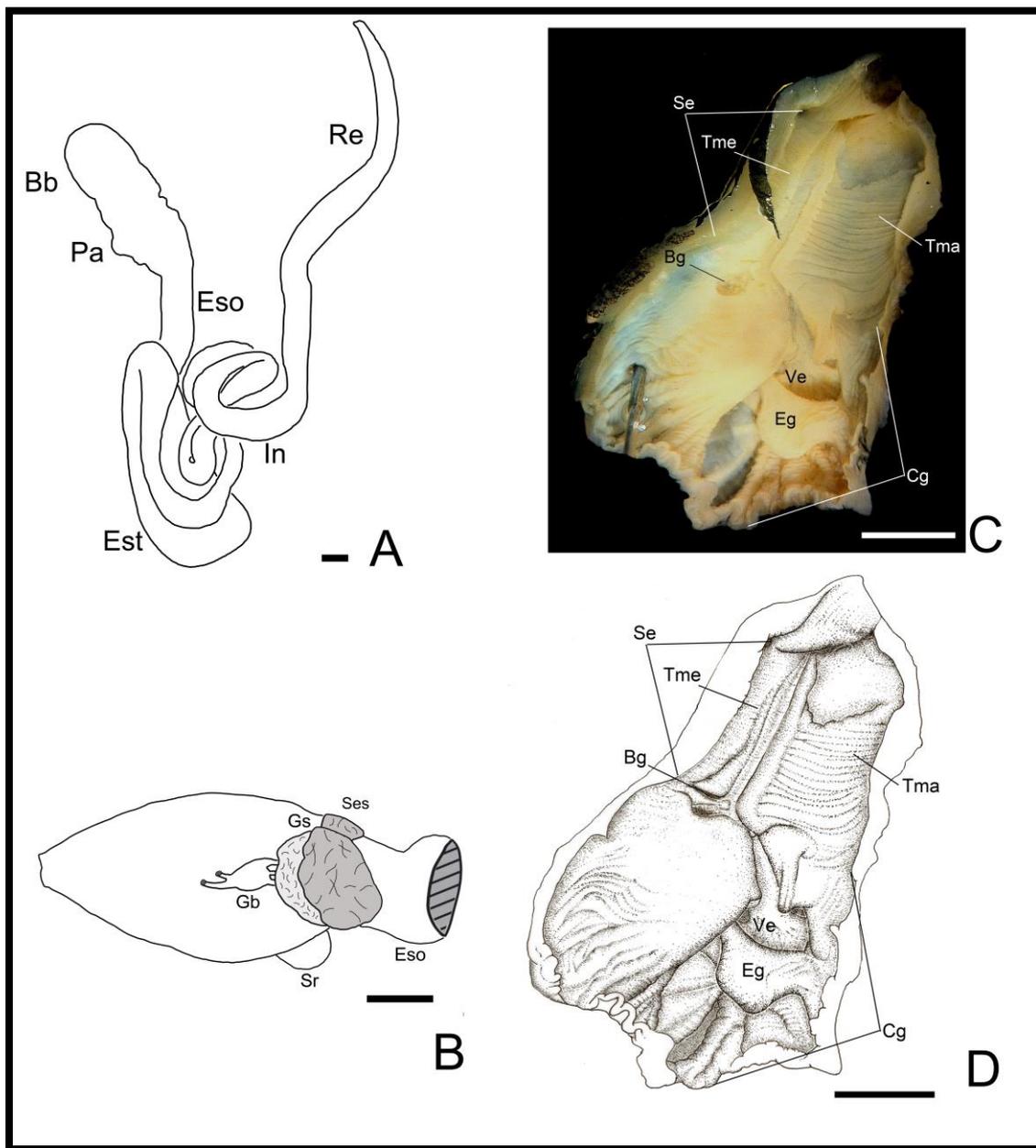


Figura 17 – Sistema digestório de *Asolene meta* (Ihering, 1915) (A), bulbo bucal (B) e estômago (C-D). Bb: bulbo bucal; Bg: bolsa gástrica; Cg: câmara gástrica; Eg: escudo gástrico; Eso: esôfago; Est: estômago; Gb: gânglio bucal; Gs: gândula salivar; In: intestino; Pa: papo; Re: reto; Se: saco do estilete; Ses: saco esofágico; Sr: saco radular; Tma: tiflossole maior; Tme: tiflossole menor; Ve: vestibulo. Escala: 1 mm.

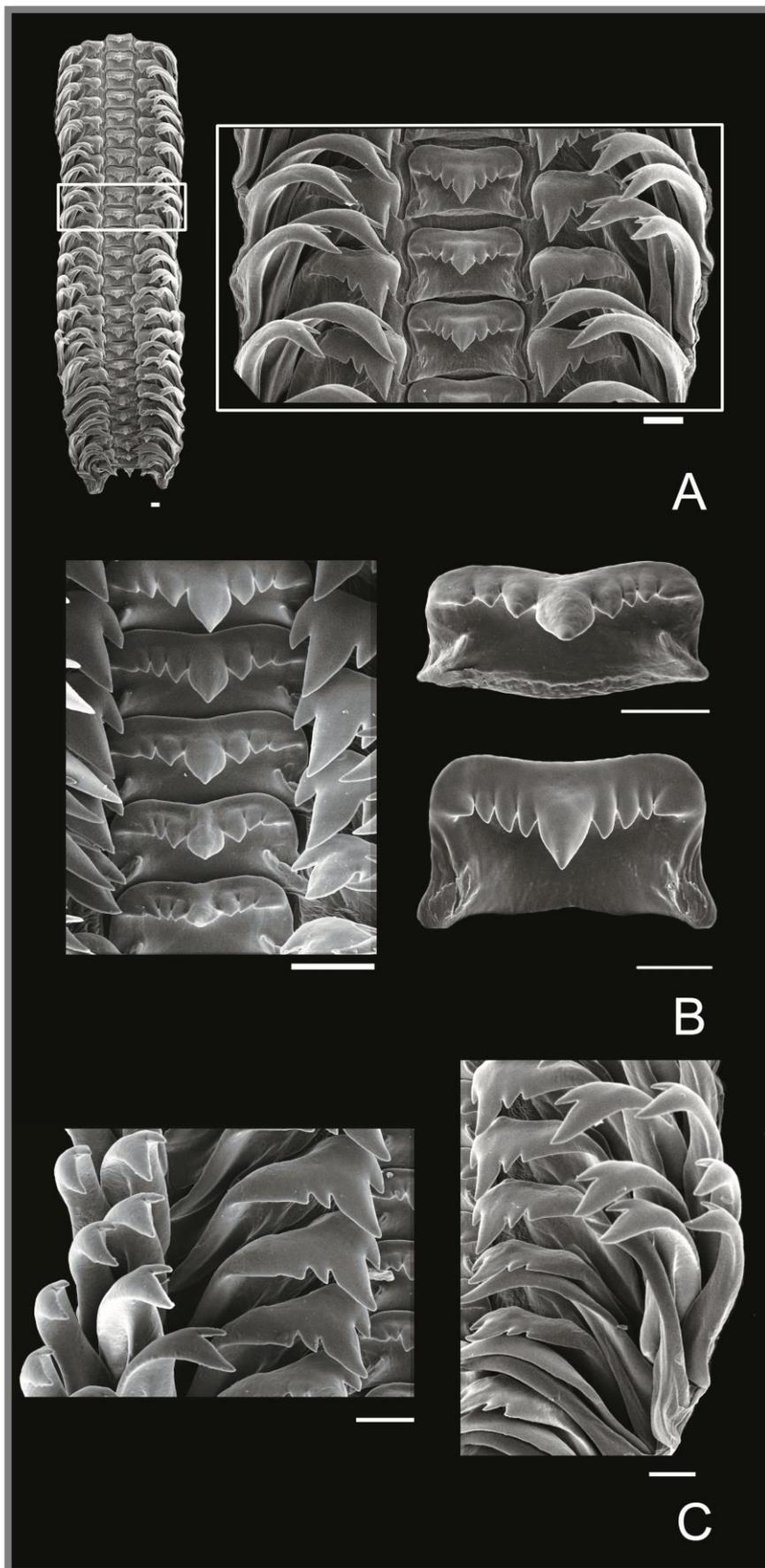


Figura 18 - Rádula de *Asolene meta* (Ihering, 1915). A: visão geral e organização dos dentes; B: dentes centrais; C: dentes laterais e marginais. Escala: 100 μ m.

4.2.3.5 Sistema nervoso

Sistema nervoso hipoatroide (Figura 19A), com quatro pares de gânglios: glânglios cerebrais, gânglios bucais, gânglios pediosos e gânglios pleurais. Os glânglios cerebrais, pedais e pleurais constituem o anel nervoso. Os gânglios cerebrais (Figura 19B) são conectados entre si pela comissura cerebral sobrepondo o aparato bucal, cada um com um nervo tentacular, um nervo ocular e sete a oito nervos labiais, alguns podendo ser ramificados. Gânglios bucais com quatro nervos innervando o aparato bucal, conectados ao gânglio cerebral pelo conectivo cerebro-bucal (Figura 17B).

Dorsalmente ao aparato bucal encontram-se os gânglios pediosos e pleurais. Os gânglios pediosos estão conectados entre si pela comissura pediosa e conectados a cada gânglio cerebral pelo conectivo cerebro-pedioso. Gânglios pleurais posteriores aos gânglios pediosos, conectados entre si pela comissura pleural e ao gânglio cerebral pelo conectivo cerebro-pleural. Gânglio pleural direito fundido ao gânglio subintestinal, conectado ao gânglio suprainestinal pelo conectivo pleuro-suprainestinal. Seguem ambos os gânglios conectados ao gânglio visceral pelos conectivos viscero-subintestinal e viscero-suprainestinal, respectivamente (Figura 19A).

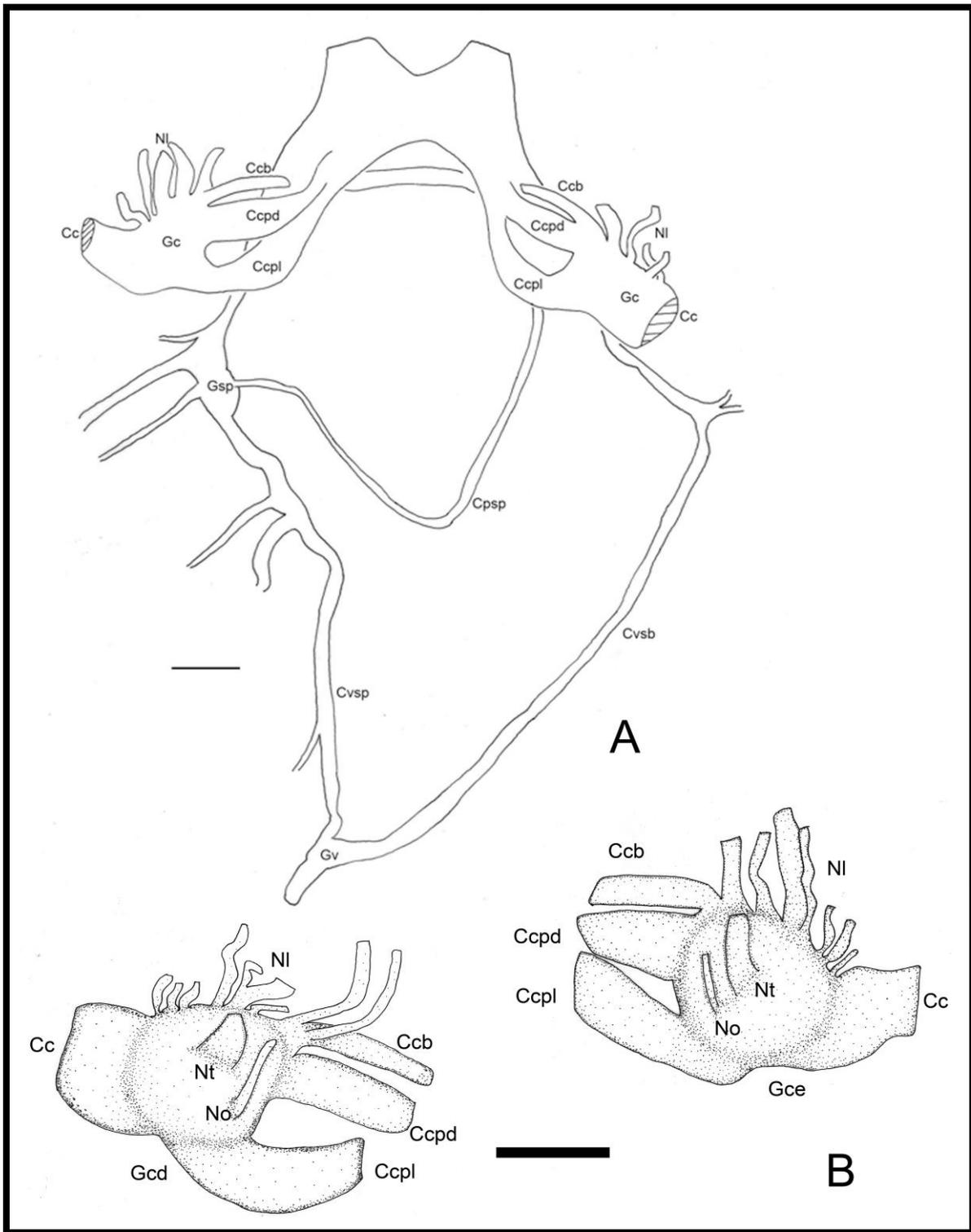


Figura 19 - Sistema nervoso de *Asolene meta* (Ihering, 1915) (A) e gânglios cerebrais (B). Cc: comissura cerebral; Ccb: conectivo cerebro-bucal; Ccpd: conectivo cerebro-pedal; Ccpl: conectivo cerebro-pleural; Cpsp: conectivo pleuro-supraintestinal; Cvsb: conectivo viscero-subintestinal; Cvsp: conectivo viscero-supraintestinal; Gc: gânglio cerebral; Gcd: gânglio cerebral direito; Gce: gânglio cerebral esquerdo; Gsp: gânglio supraintestinal; Gv: gânglio visceral; NI: nervos labiais; No: nervo ocular; Nt: nervo tentacular. Escala: 1 mm.

4.2.3.6 Rim

Rim formado por duas câmaras interconectadas, o rim anterior e o rim posterior. A câmara anterior encontra-se localizada abaixo das brânquias e à direita do pericárdio. É amarelada, densa e alongada, com as bordas arredondadas (Figura 20A), sendo geralmente recoberta em parte pela camada pigmentada do manto. Internamente é formada por fileiras regulares de lamelas ocupando todo o seu lúmen, arranjadas transversalmente em ambos os lados da veia renal aferente anterior. As lamelas são recobertas por uma fina camada de tecido. A veia renal aferente anterior entra na base do rim anterior à esquerda, adjacente à cavidade pericárdica, se estendo a direita e dando origem a dois grandes ramos que suplementam a área dorsal e ventral à veia renal aferente anterior (Figura 20B).

A câmara posterior do rim, localizada acima o intestino, é maior que a câmara anterior e mais delgada, com coloração cinza. Internamente é formada por lamelas irregulares ao longo dos ramos de dois grandes vasos, que ocupam grande parte do teto do rim posterior, o vaso renal aferente posterior e o vaso renal eferente. O vaso renal aferente posterior é maior que o vaso renal aferente anterior, seguindo na região central do rim posterior, subdividindo-se em inúmeros ramos ao longo de sua extensão. A veia renal eferente segue a esquerda da veia renal aferente posterior ao longo do teto do rim posterior, igualmente subdividindo-se em inúmeros ramos. Na região anterior, emerge seguindo no teto da cavidade pericárdica para entrar na aurícula (Figuras 20A-B).

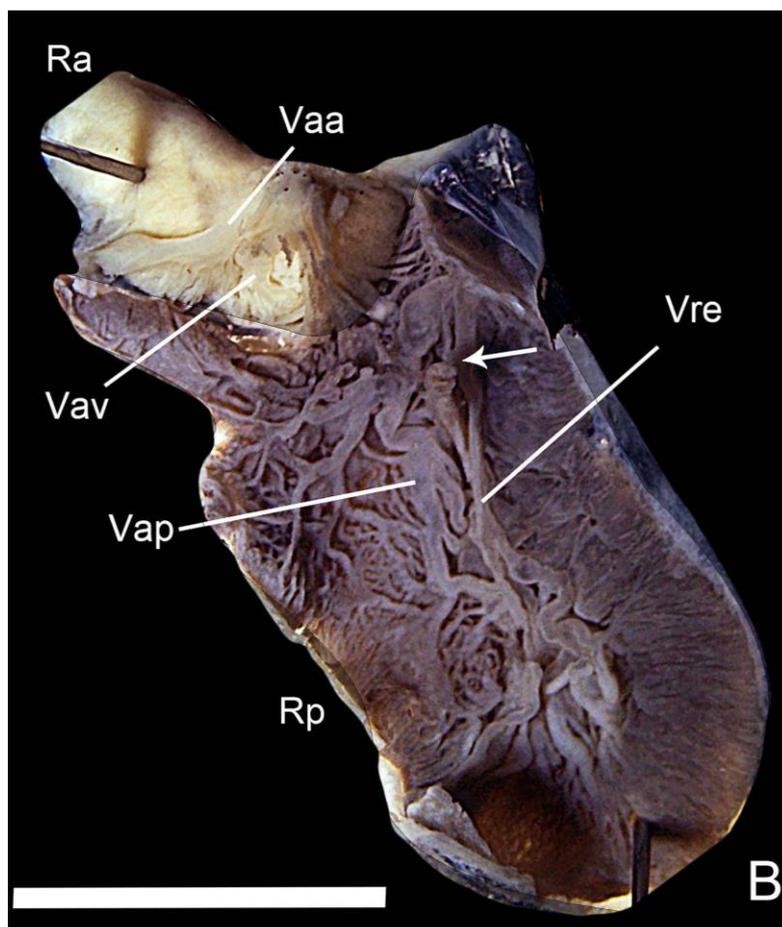
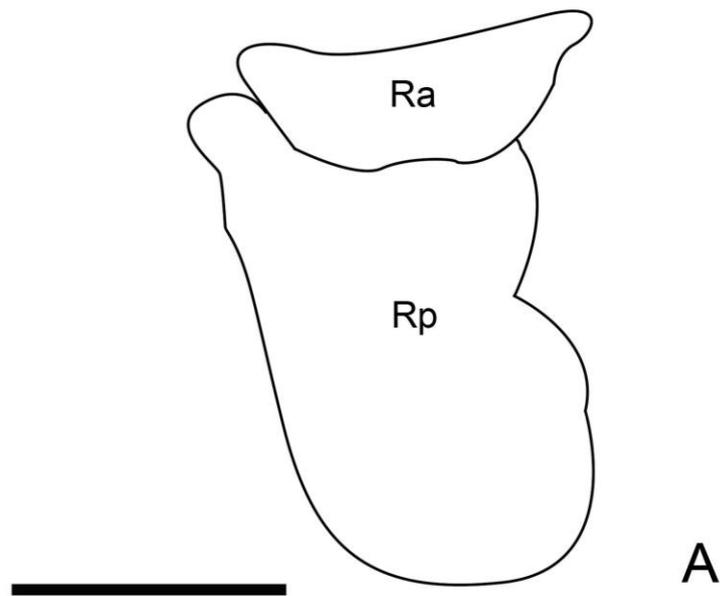


Figura 20 – Rim de *Asolene meta* (Ihering, 1915): dorsal (A) e ventral (B). Ra: rim anterior; Rp: rim posterior; Vaa: veia renal aferente anterior; Vap: veia renal aferente posterior; Vav: ramo ventral da veia renal aferente anterior; Vre: veia renal eferente. Seta indica a veia renal eferente emergindo em direção ao pericárdio. Escala: 5 mm.

4.2.3.7 Pericárdio

Pericárdio pequeno, com uma fina camada de tecido abrigando a aurícula, o ventrículo e a ampola. Localiza-se na lateral esquerda do animal, à esquerda do rim e acima do estômago (Figura 21A). Aurícula ovalada, de coloração clara e paredes finas, com duas veias bem distintas, a veia branquial-pulmonar eferente, localizada na lateral esquerda da aurícula, e a veia renal eferente, na porção superior, a qual se conecta com o rim posterior. Conecta-se ao ventrículo através da válvula átrio-ventricular. O ventrículo é quadrangular, maior que a aurícula e mais denso. Conecta-se ao tronco arterioso, que se divide formando as aortas anterior e posterior. Ampola volumosa, oval alongada, seguindo a partir da aorta anterior e estendendo-se na base na cavidade pericárdica (Figura 21B).

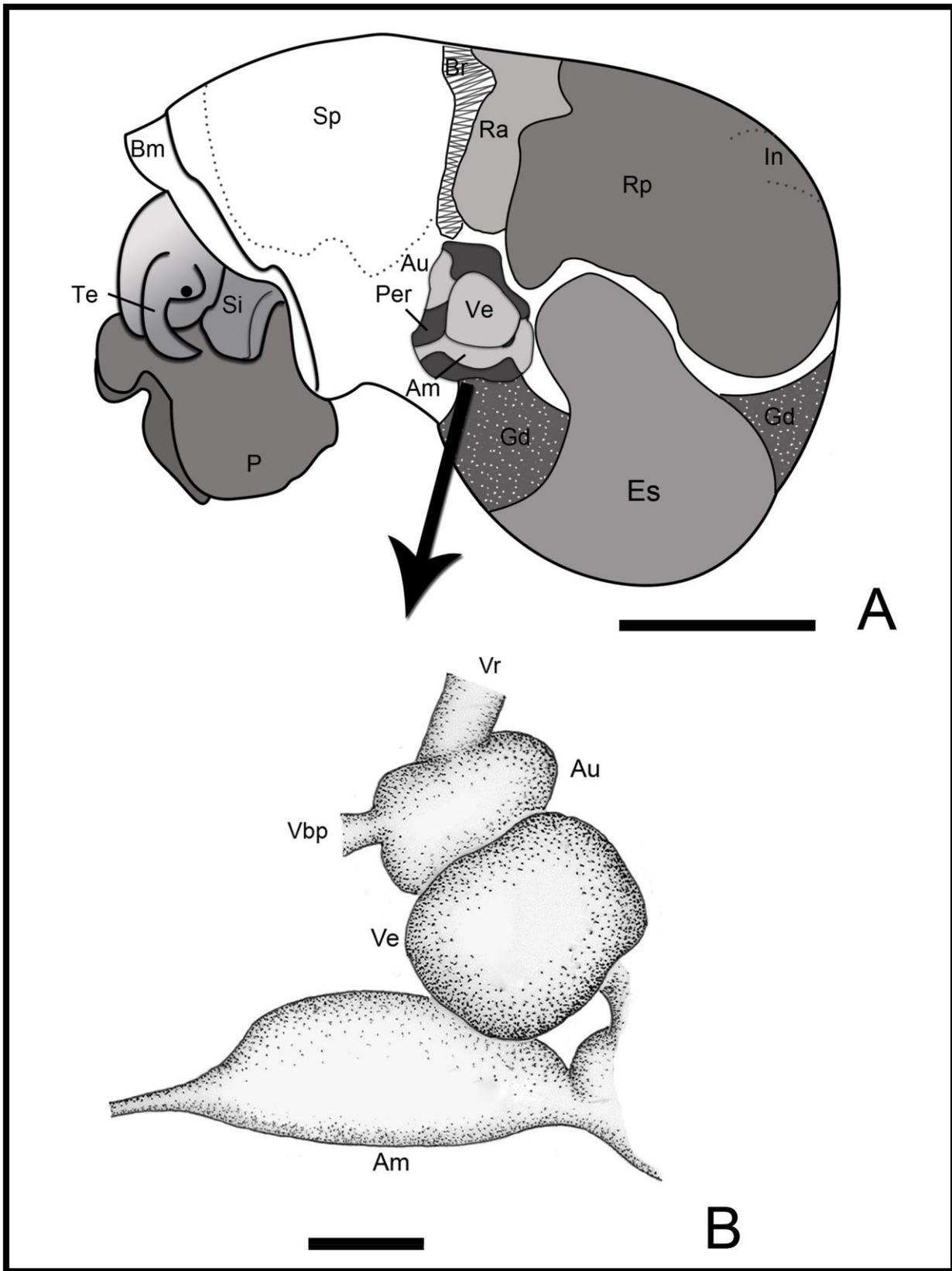


Figura 21 – Vista da lateral esquerda de *Asolene meta* (Ihering, 1915) mostrando a localização do pericárdio (A – escala: 10 mm) e destaque do coração (B – escala 1 mm). Am: ampola; Au: aurícula; Bm: borda do manto; Br: brânquias; Es: estômago; Gd: glândula digestiva; In: intestino; P: pé; Per: pericárdio; Ra: rim anterior; Rp: rim posterior; Si: sifão; Sp: saco pulmonar; Te: tentáculo; Vbp: veia branquial-pulmonar eferente; Ve: ventrículo; Vr: veia renal eferente.

4.2.3.8 Sistema reprodutor masculino

Testículo volumoso, de cor creme, ocupando as três primeiras voltas da espira, acima da glândula digestiva. Canal deferente delgado, emergindo ventralmente ao testículo até a vesícula seminal arredondada, localizada na base da cavidade do manto. Próstata cilíndrica sem circunvoluções, seguindo ao lado do reto no lado direito da cavidade do manto, terminando na goteira seminal, onde se curva para a esquerda. Bolsa do pênis ovalada e de paredes finas, contendo o pênis enovelado quando retraído, abrindo para o canal mediano dorsal à bainha do pênis, permitindo passagem do pênis durante a cópula (Figuras 22, 23). Pênis cilíndrico e longo, diminuindo o diâmetro gradualmente desde a base ao ápice (Figura 24A), formado por um epitélio simples com células cúbica e uma extensa camada de fibras musculares (Figuras 25A-C). Canal espermático fechado (Figuras 25A,B). A coloração Reticulina de Gomori mostrou feixes reticulares entre as células adiposas (corados em preto) e fibras de colágeno concêntrico do tipo I em torno do canal espermático (corados em marrom) (Figuras 25A,D). A coloração PAS mostrou que o epitélio do pênis e no interior do canal espermático é rico em glicoproteínas (corado em vermelho) (Figura 25A,E). As lâminas do pênis coradas em Alcian Blue pH 1,0 e pH 2,5 foram negativas para estas colorações.

Bainha do pênis curvada para a direita, pouco volumosa, com a largura diminuindo gradativamente da base até o ápice. O canal mediano é formado por duas dobras, a esquerda sobrepondo a direita, iniciando na base da bainha do pênis até próximo à glândula apical. A bainha apresenta três glândulas: uma apical pregueada, ocupando cerca de 1/4 da bainha do pênis; uma interna mediana, lisa e arredondada, localizada centralmente à direita da bainha, próxima ao canal mediano; e uma externa basal, com um pequeno orifício (Figuras 24B-C). A glândula basal externa é formada por tecido conjuntivo com células redondas a ovoides, inúmeros ductos e um ducto central, circundado por um conjunto de ácidos (Figuras 26A-C). Com a coloração Reticulina de Gomori, foram evidenciados inúmeros feixes reticulares (corados em preto), além de feixes colagênicos do tipo I (corados em marrom) (Figuras 26A,C). A coloração PAS revelou uma camada de revestimento no interior dos ductos rico em glicoproteínas (corado em vermelho) (Figuras 26A,D). A coloração Alcian Blue pH 1,0 revelou a presença de proteoglicanos de alta sulfatação principalmente no interior dos ductos (Figuras 26A,E). Glândula basal externa negativa para a coloração Alcian Blue pH 2,5.

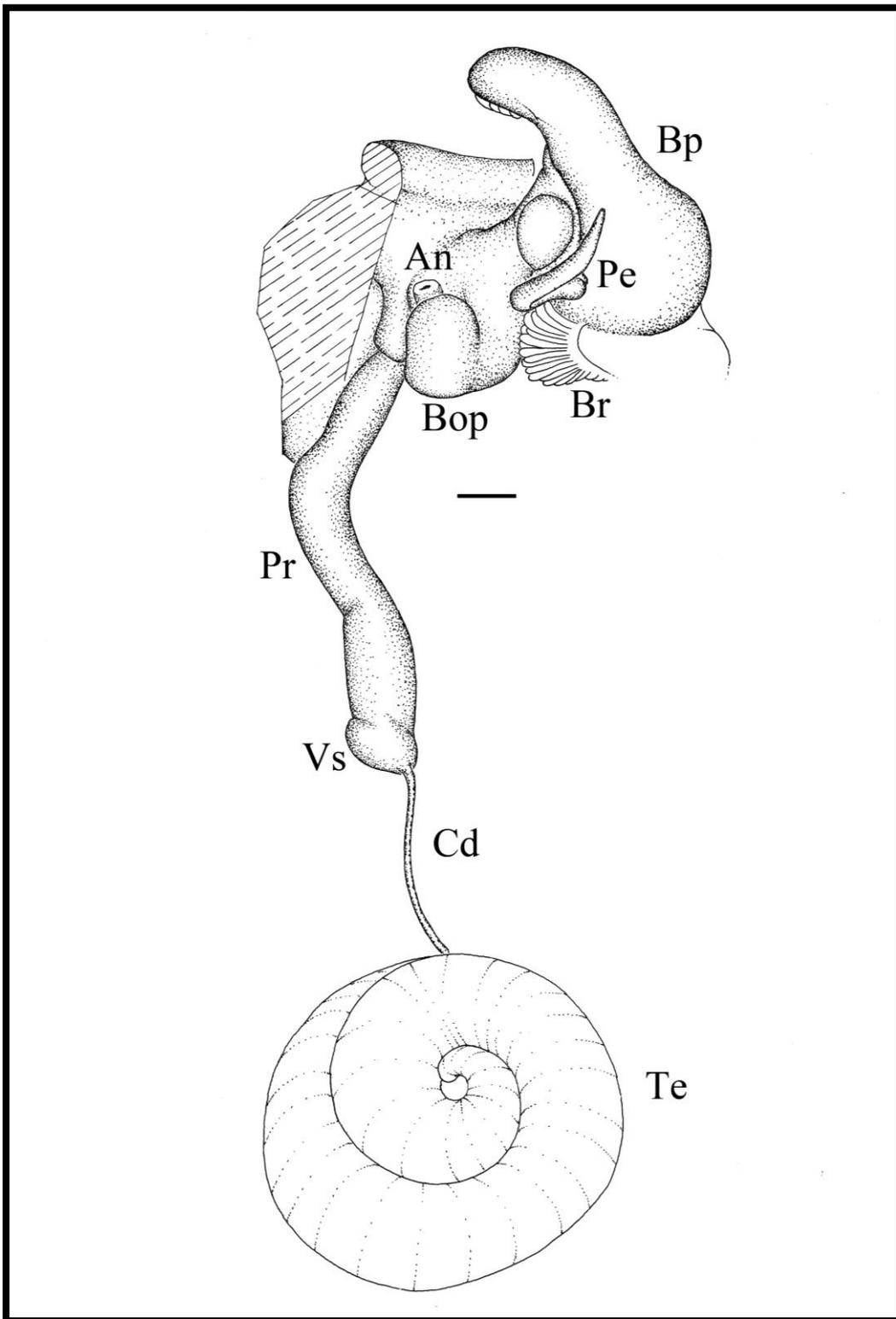


Figura 22 - Sistema reprodutor masculino de *Asolene meta* (Ihering, 1915). An: ânus; Bop: bolsa do pênis; Bp: bainha do pênis; Br: brânquias; Cd: canal deferente; Pe: pênis; Pr: próstata; Te: testículo; Vs: vesícula seminal. Escala: 10 mm.

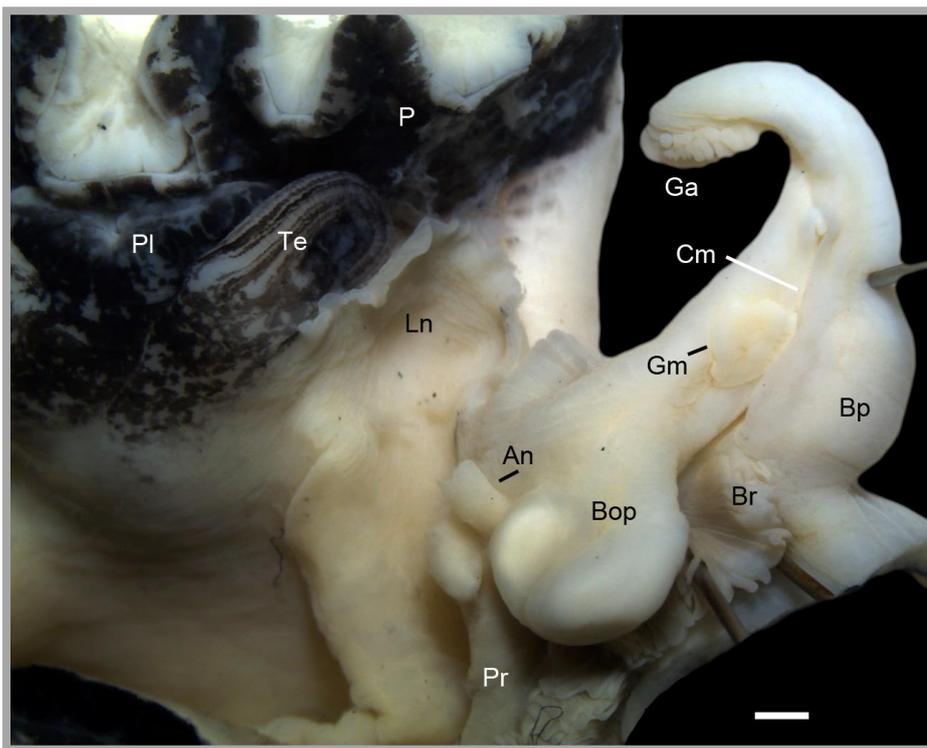


Figura 23 – Complexo peniano de *Asolene meta* (Ihering, 1915). An: ânus; Bop: bolsa do pênis; Bp: bainha do pênis; Br: brânquias; Cm: canal mediano; Ga: glândula apical; Gm: glândula mediana; Ln: lobo nugal; P: pé; Pl: palpos labiais; Pr: próstata; Te: tentáculo. Escala: 1 mm.

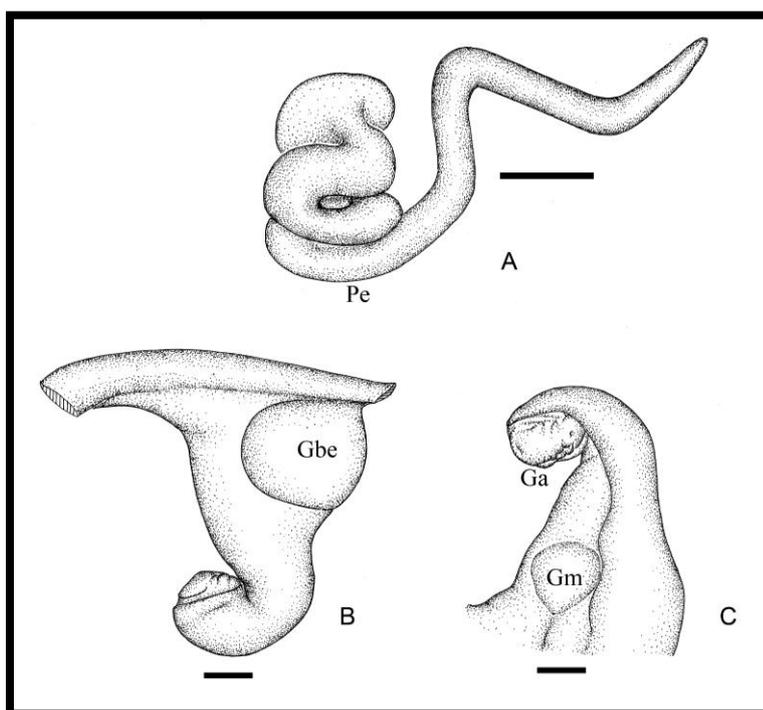


Figura 24 - Pênis (A) e bainha do pênis (dorsal – B e ventral – C) de *Asolene meta* (Ihering, 1915). Ga: glândula apical; Gbe: glândula basal externa; Gm: glândula mediana; Pe: pênis. Escala: 1 mm.

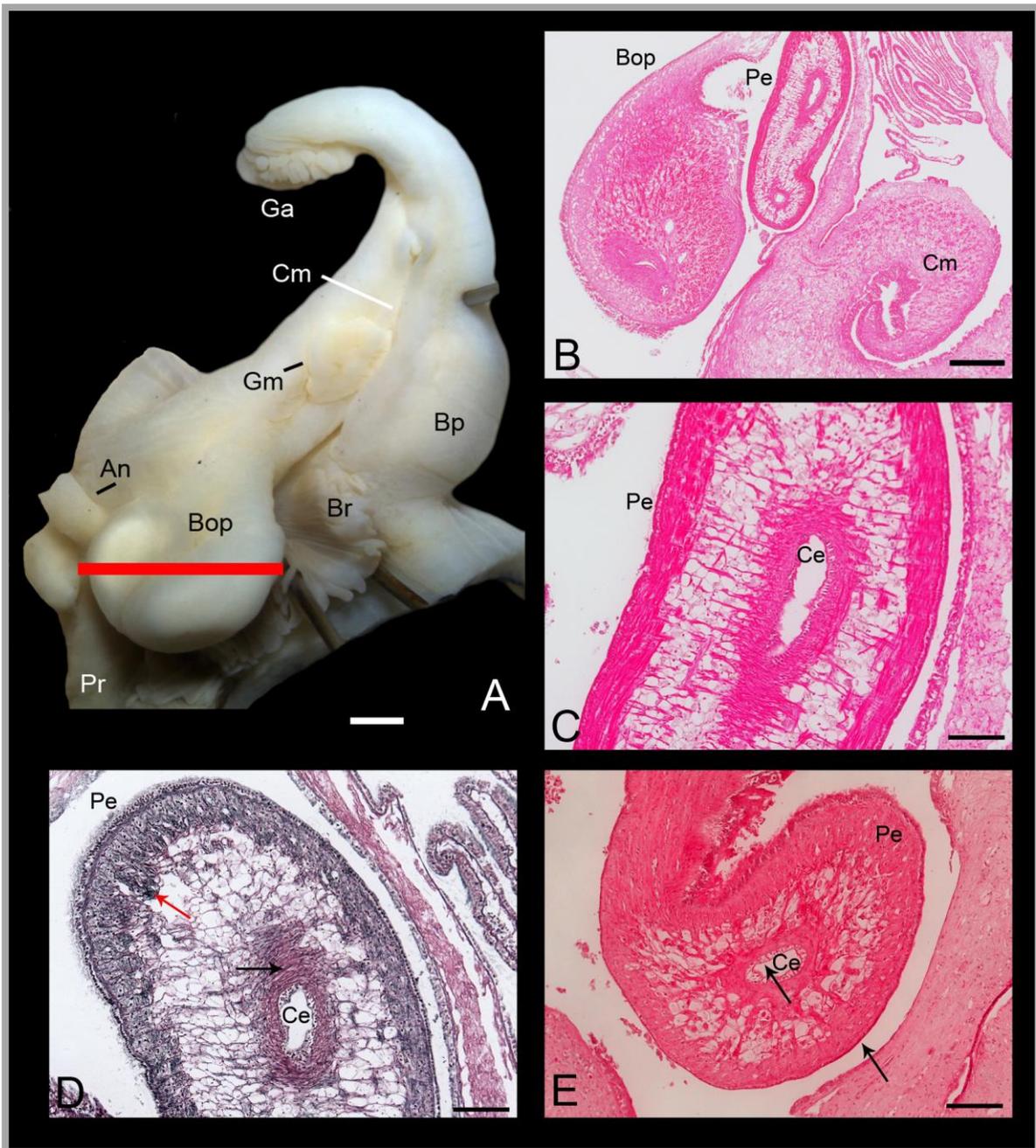


Figura 25 – Cortes histológicos do pênis de *Asolene meta* (Ihering, 1915). A: Complexo peniano mostrando o local dos cortes histológicos. B: Histologia da bolsa do pênis corada com hematoxilina-eosina. C: Histologia do pênis corada com hematoxilina-eosina. D: Histologia do pênis corada com Reticulina de Gomori; seta vermelha indicando fibras reticulares e seta preta indicando fibras colagênicas do tipo I. E: Histologia do pênis de corada com PAS; setas pretas indicando região positiva. An: ânus; Bop: bolsa do pênis; Bp: bainha do pênis; Br: brânquias; Ce: canal espermático; Cm: canal mediano; Ga: glândula apical; Gm: glândula mediana; Pe: pênis; Pr: próstata. Escalas: A: 1 mm; B: 500 µm; C-E: 100 µm.

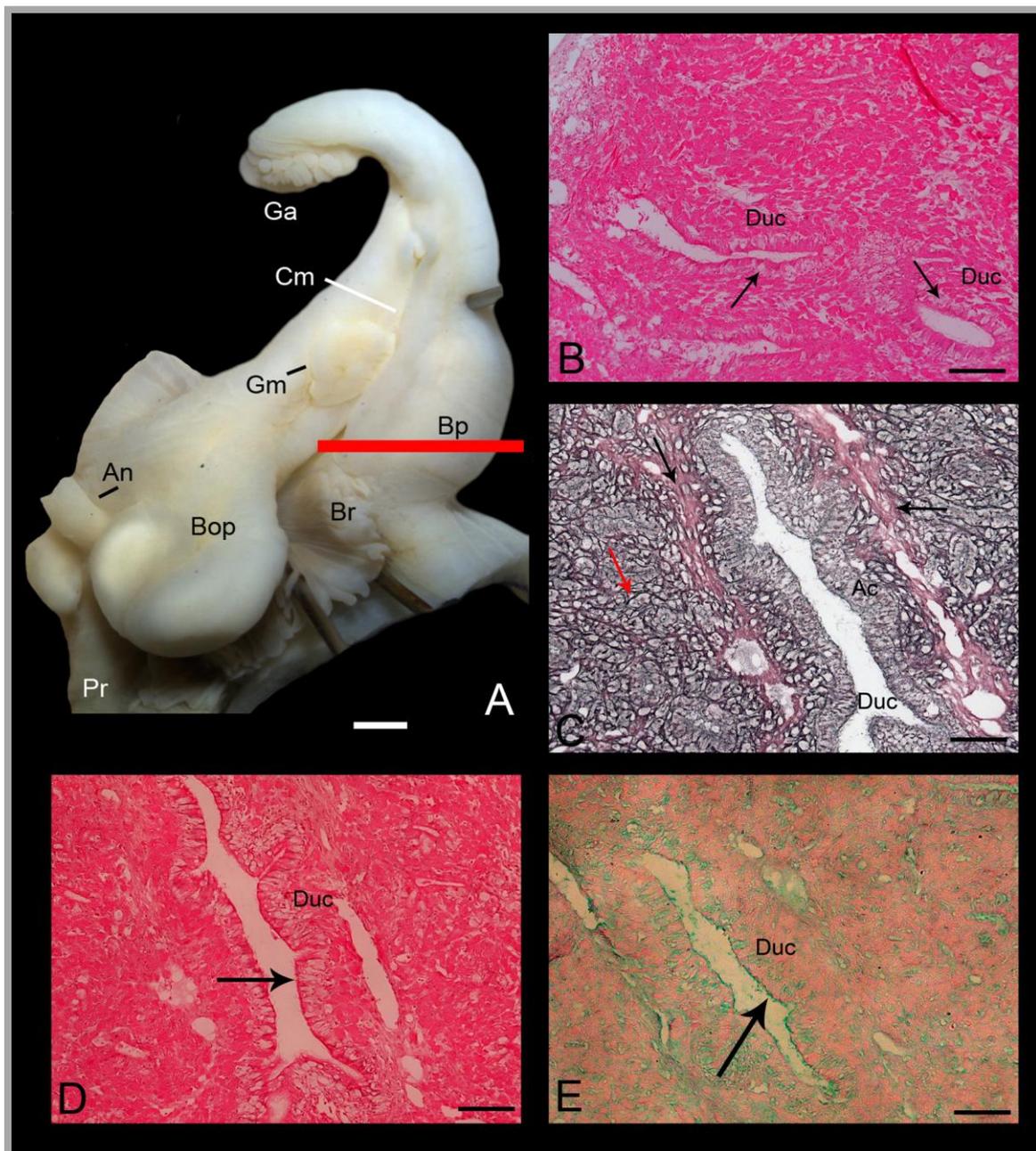


Figura 26 - Cortes histológicos da glândula externa da bainha do pênis de *Asolene meta* (Ihering, 1915). A: Complexo peniano mostrando o local dos cortes histológicos. B: Histologia da glândula basal externa corada com hematoxilina-eosina. C: Histologia da glândula basal externa corada Reticulina de Gomori; seta vermelha indicando fibras reticulares e seta preta indicando fibras colagênicas do tipo I. D: Histologia glândula basal externa corada com PAS; setas pretas indicando região positiva. E: Histologia glândula basal externa corada com Alcian Blue pH 1,0; seta preta indicando região positiva. An: ânus; Bop: bolsa do pênis; Bp: bainha do pênis; Br: brânquias; Cm: canal mediano; Duc: ducto; Ga: glândula apical; Gm: glândula mediana; Pr: próstata. Escalas: A: 1 mm; B-E: 100 µm.

4.2.3.9 Sistema reprodutor feminino

O ovário arborescente é formado por inúmeros divertículos envolvidos pela glândula digestiva e ocupa posição semelhante ao testículo nos machos. Os divertículos são conectados, unindo-se em três a quatro ramos que se fundem formando o oviduto visceral. O oviduto visceral, fino e delgado, segue abaixo do rim e atrás da cavidade do manto para entrar no receptáculo seminal (Figura 27A).

O receptáculo seminal localiza-se transversalmente ao oviduto palial, é muscular, oval alongado, com uma região lisa recoberta por uma área fortemente granular (Figuras 27B-C). Glândula da casca segue enovelada, unindo-se ao oviduto palial. O receptáculo seminal, a bolsa copuladora, a glândula da casca e a glândula de albúmen encontram-se envoltos em uma grande massa de cor alaranjada, que ocupa grande parte da base da cavidade do manto.

Segue o oviduto palial, com três voltas visíveis emergindo da massa alaranjada, continuando na base cavidade do manto, ao lado do reto, e terminando na abertura genital. Entre o ânus e as brânquias encontra-se a bainha vestigial, uma estrutura comum dentre os ampulariídeos (Figura 27A).

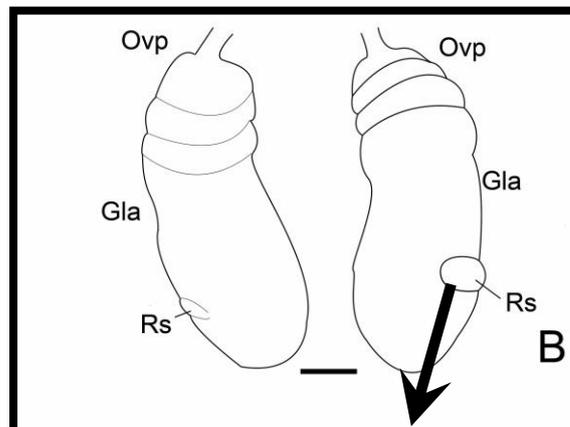
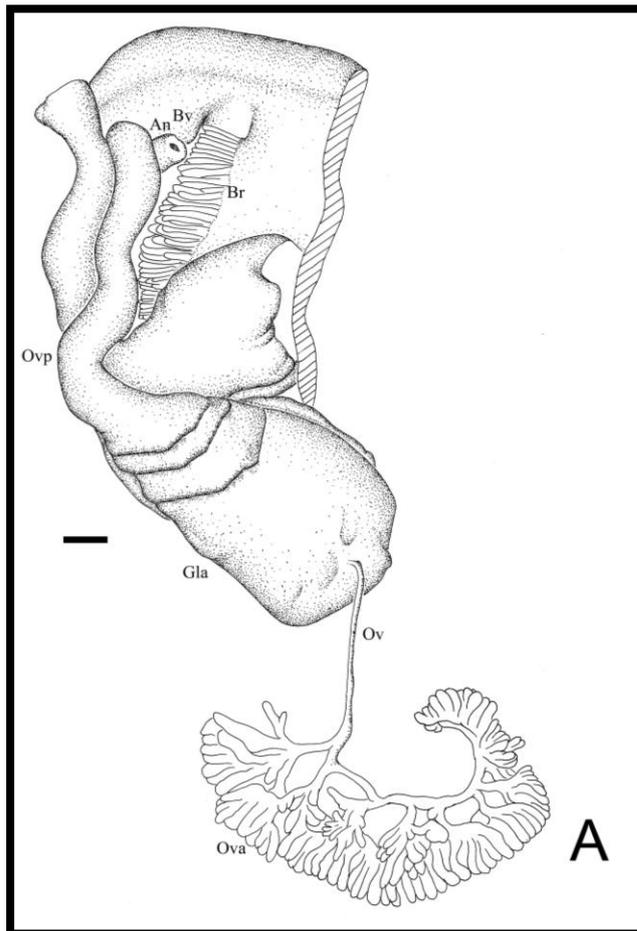


Figura 27 - Sistema reprodutor feminino de *Asolene meta* (Ihering, 1915) (A), glândula de albúmen mostrando a posição do receptáculo seminal (B) e receptáculo seminal (C). An: ânus; Br: brânquias; Bv: bainha vestigial; Gla: glândula de albúmen; Ova: ovário; Ovp: oviduto palial; Ov: oviduto visceral; Rs: receptáculo seminal. Escala: 1 mm.

4.2.3.10 Desova

Os exemplares de *Asolene meta* mantidos em laboratório fizeram uma postura com aproximadamente 72 ovos na vegetação submersa, em abril de 2012 (Figura 28A). Os ovos são redondos, não calcários e sem pigmentação, envoltos em uma massa gelatinosa (Figura 28B). Próximo à eclosão dos juvenis, os ovos ficaram transparentes, sendo possível ver o pequeno embrião no interior do ovo. A eclosão de 44 juvenis ocorreu aproximadamente nove dias após a postura.

A concha dos recém-eclodidos é transparente, permitindo ver o manto com pigmentações esparsas, as faixas na borda do manto e a massa visceral com coloração creme. A espira apresenta pontuações pouco evidentes (Figura 28C).

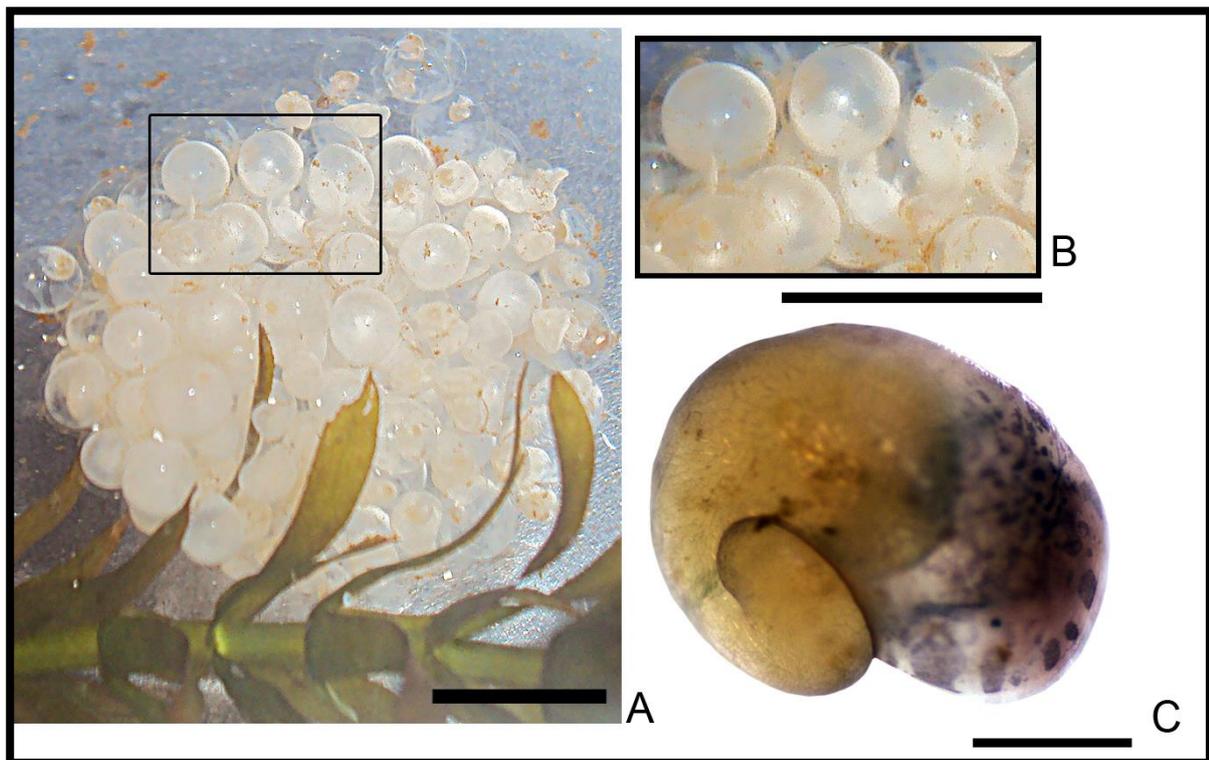


Figura 28 – Desova de *Asolene meta* (Ihering, 1915) (A), detalhe dos ovos (B) e recém-eclodido (C). Escalas: 10 mm (A-B) e 1 mm (C).

4.2.4 Análise de dimorfismo sexual

Para análise de dimorfismo sexual, foram avaliadas 19 conchas e opérculos de espécimes fêmeas e 20 de machos de *Asolene meta* provenientes do município da Barra, Bahia. A amplitude de variação de ambos os gêneros para as 32 variáveis analisadas encontra-se na tabela 2.

A análise teste t de Student revelou que as variáveis Vc/At e Lo/Ao são significativamente diferentes entre fêmeas e machos de *A. meta* ($p < 0.05$) (Tabela 3).

Tabela 2 – Estatística básica descritiva das conchas e dos opérculos dos espécimes fêmeas e machos de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA).

	Fêmeas (n = 19)			Machos (n = 20)		
	Mínimo	Máximo	Med±Dp	Mínimo	Máximo	Med ± Dp
At	25,00	31,94	28,39±1,88	23,25	30,86	27,62±1,67
Lt	26,58	35,29	30,59±2,21	26,05	33,92	30,82±6,06
Vc	22,46	28,76	25,54±1,75	21,95	28,35	24,90±1,45
Ec	14,04	18,39	16,43±1,37	12,87	18,14	15,70±1,13
Aa	17,02	23,00	19,83±1,55	17,10	22,04	19,04±1,37
La	12,46	17,05	15,05±1,37	13,30	16,81	14,77±0,90
Ao	15,79	19,67	17,59±1,08	14,37	19,73	17,00±1,18
Lo	10,66	13,36	12,05±0,83	10,31	13,46	11,88±0,79
A1	1,02	2,83	1,83±0,62	1,08	2,94	1,82±0,64
L1	3,60	5,75	4,99±0,54	3,92	7,51	4,96±0,78
A2	2,46	4,11	3,15±0,44	2,27	3,82	3,13±0,49
L2	8,00	11,94	10,13±1,08	8,15	12,30	10,04±1,12
Ao1	8,06	11,45	9,73±1,01	7,88	11,67	9,33±0,81
Ao2	6,36	8,86	7,85±0,63	6,37	8,75	7,67±0,70
VI	3,19	4,53	3,83±0,35	2,94	4,30	3,82±0,37
Lt/At	1,01	1,21	1,08±0,05	1,04	1,21	1,10±0,04
Vc/At	0,85	0,95	0,90±0,02	0,87	0,95	0,91±0,02
Aa/Lt	0,61	0,68	0,65±0,02	0,60	0,68	0,64±0,03
La/Aa	0,63	0,81	0,76±0,04	0,73	0,86	0,78±0,02
Lo/Ao	0,64	0,72	0,68±0,02	0,65	0,75	0,70±0,02
At/Aa	1,35	1,50	1,43±0,05	1,34	1,55	1,43±0,06
A1/L1	0,20	0,56	0,37±0,13	0,20	0,58	0,38±0,15
A2/L2	0,22	0,42	0,31±0,05	0,19	0,41	0,32±0,06
Vc/Lt	0,78	0,89	0,84±0,03	0,79	0,88	0,83±0,02
Ao1/Ao2	1,02	1,80	1,25±0,19	1,05	1,61	1,23±0,14
Ao1/Ao	0,50	0,64	0,55±0,04	0,51	0,62	0,55±0,03
Ao2/Ao	0,36	0,49	0,45±0,04	0,38	0,49	0,45±0,03
(A1/L1)/(A2/L2)	0,75	1,77	1,15±0,28	0,63	1,69	1,18±0,36
(A1/L1)/(Vc/Lt)	0,22	0,67	0,44±0,15	0,22	0,51	0,38±0,07
(A2/L2)/(Vc/Lt)	0,27	0,51	0,38±0,06	0,23	0,69	0,45±0,17
VI/At	0,11	0,16	0,13±0,01	0,11	0,16	0,14±0,02
VI/Lt	0,09	0,16	0,12±0,01	0,09	0,15	0,13±0,01

Tabela 3 - Análise Teste t de Student entre as variáveis conchiliométricas de conchas e opérculos de espécimes fêmeas e machos de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA).

Variável	t	df	p
At	1,984	37	0,055
Lt	0,966	37	0,340
Ec	1,831	37	0,075
Vc	1,239	37	0,223
Aa	1,674	37	0,102
La	0,831	37	0,412
Ao	1,618	37	0,114
Lo	0,554	37	0,583
A1	0,029	37	0,977
L1	0,189	37	0,851
A2	0,099	37	0,921
L2	0,256	37	0,799
Ao1	1,355	37	0,184
Ao2	0,892	37	0,378
VI	-0,004	37	0,997
Lt/At	-1,505	37	0,141
Vc/At	-2,140	37	0,039
Aa/Lt	1,727	37	0,093
La/Aa	-1,312	37	0,198
Lo/Ao	-2,208	37	0,033
At/Aa	0,025	37	0,980
A1/L1	-0,196	37	0,846
A2/L2	-0,104	37	0,918
Vc/Lt	0,413	37	0,682
Ao1/Ao2	0,430	37	0,670
Ao1/Ao	0,340	37	0,735
Ao2/Ao	-0,340	37	0,735
(A1/L1)/(A2/L2)	-0,293	37	0,771
(A2/L2)/(Vc/Lt)	-0,202	37	0,841
(A1/L1)/(Vc/Lt)	-0,235	37	0,816
VI/At	-1,235	37	0,225
VI/Lt	-0,527	37	0,601

A Análise de Escalonamento Multidimensional não apresentou agrupamentos com uma separação espacial entre fêmeas e machos de *A. meta* (Figura 29).

De acordo com a Correlação de Pearson (Tabela 4), as variáveis At, A1, A1/L1, A2/L2, Ao2/Ao, Ao1/Ao2 e VI/At foram retiradas da Análise Discriminante, a qual apresentou resultados que não diferenciaram os espécimes fêmeas e machos significativamente (Wilk's lambda = 0,530; df = 18,20, p > 0,05). A matriz de classificação indicou que 8 dos 19 exemplares fêmeas e 10 dos 20 machos de

Asolene meta apresentaram identidade morfológica do grupo, com índices de acerto de 42% e 50%, respectivamente. Com base no gráfico da figura 30, não há distinção entre espécimes fêmeas e machos de *Asolene meta*. A matriz F resultou em um índice de diferença de 0,984 entre os grupos analisados.

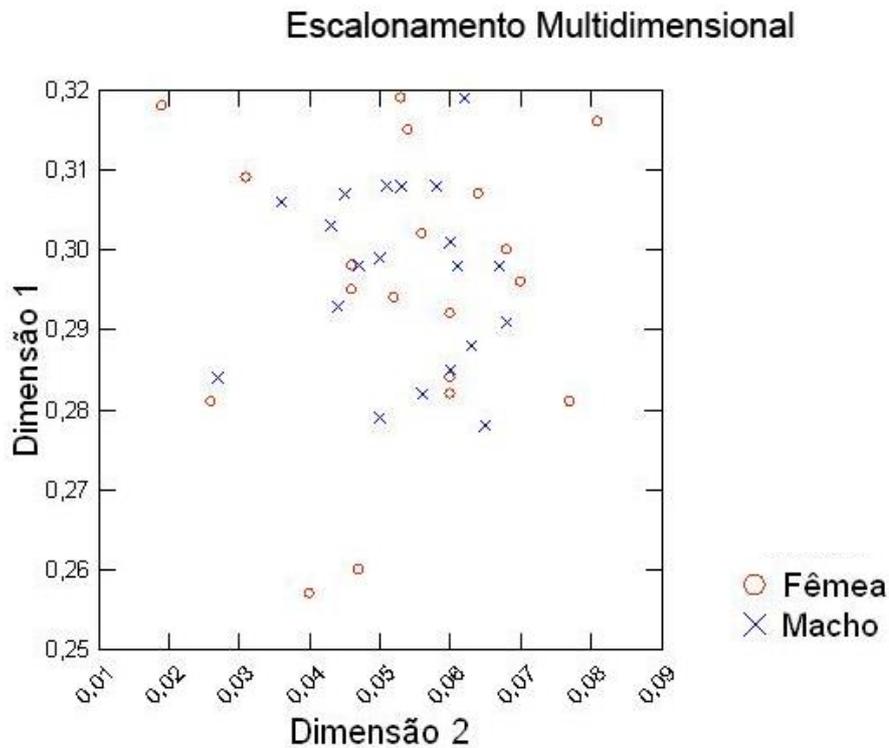


Figura 29 - Análise de Escalonamento Multidimensional a partir de dados conquiliométricos de fêmeas e machos de *Asolene meta* (Ihering, 1915).

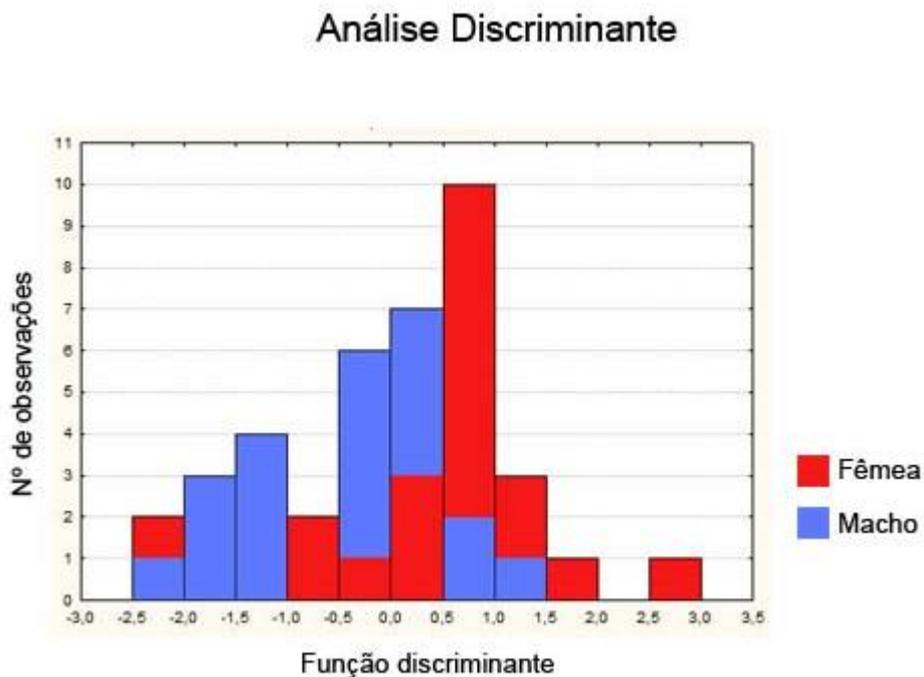


Figura 30 – Análise discriminante das análises conquiliométricas dos espécimes fêmeas e machos de *Asolene meta* (Ihering, 1915).

Tabela 4 – Correlação de Pearson das variáveis conchiliométricas analisadas de espécimes fêmeas e machos de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA). Valores iguais ou maiores que 0,900 estão destacados em vermelho.

	At	Lt	Ec	Vc	Aa	LA	Ao	Lo	A1	L1	A2
At	1,000										
Lt	0,807	1,000									
Ec	0,916	0,661	1,000								
Vc	0,936	0,868	0,843	1,000							
Aa	0,880	0,883	0,798	0,896	1,000						
La	0,729	0,742	0,607	0,738	0,736	1,000					
Ao	0,803	0,702	0,721	0,812	0,771	0,631	1,000				
Lo	0,779	0,790	0,693	0,837	0,756	0,677	0,881	1,000			
A1	0,155	-0,008	0,143	0,046	0,011	0,219	0,043	0,100	1,000		
L1	0,551	0,520	0,480	0,549	0,452	0,409	0,536	0,503	-0,069	1,000	
A2	0,191	-0,062	0,144	0,049	-0,063	0,013	0,041	0,015	0,547	0,079	1,000
L2	0,545	0,594	0,459	0,591	0,535	0,359	0,614	0,540	-0,414	0,700	-0,082
Ao1	0,734	0,741	0,672	0,783	0,750	0,457	0,819	0,781	-0,199	0,582	-0,165
Ao2	0,377	0,191	0,319	0,323	0,298	0,463	0,601	0,447	0,352	0,124	0,302
VI	0,199	-0,057	0,329	0,133	0,053	0,093	0,279	0,099	0,050	0,100	0,094
Lt/At	-0,282	0,339	-0,387	-0,080	0,037	0,042	-0,137	0,046	-0,270	-0,033	-0,408
Vc/At	-0,281	0,072	-0,303	0,074	-0,049	-0,055	-0,078	0,064	-0,302	-0,071	-0,402
Aa/Lt	0,338	-0,009	0,440	0,263	0,461	0,162	0,309	0,110	0,026	-0,026	-0,037
La/Aa	-0,323	-0,312	-0,365	-0,332	-0,489	0,229	-0,292	-0,210	0,264	-0,136	0,102
Lo/Ao	-0,037	0,194	-0,052	0,067	-0,012	0,106	-0,232	0,256	0,109	-0,053	-0,059
At/Aa	-0,001	-0,351	0,017	-0,148	-0,475	-0,192	-0,138	-0,147	0,266	0,063	0,484
A1/L1	-0,284	0,146	-0,330	0,048	-0,006	-0,030	-0,115	0,033	-0,305	-0,126	-0,461
A2/L2	-0,055	-0,197	-0,044	-0,146	-0,155	0,063	-0,136	-0,078	0,940	-0,385	0,436
Vc/Lt	-0,131	-0,360	-0,124	-0,266	-0,332	-0,173	-0,289	-0,271	0,671	-0,315	0,826
Ao1/Ao2	0,154	-0,347	0,268	0,164	-0,067	-0,084	0,120	-0,004	0,099	-0,008	0,203
Ao1/Ao	0,293	0,419	0,289	0,360	0,343	-0,005	0,208	0,283	-0,377	0,339	-0,307

Ao2/Ao	0,301	0,432	0,295	0,376	0,365	0,036	0,219	0,294	-0,384	0,353	-0,315
(A1/L1)/(A2/L2)	-0,301	-0,432	-0,295	-0,376	-0,365	-0,036	-0,219	-0,294	0,384	-0,353	0,315
(A2/L2)/(Vc/Lt)	-0,019	-0,047	-0,008	-0,042	-0,013	0,195	-0,016	0,058	0,819	-0,327	0,040
(A1/L1)/(Vc/Lt)	-0,161	-0,307	-0,172	-0,305	-0,327	-0,163	-0,323	-0,283	0,667	-0,320	0,805
VI/At	-0,062	-0,167	-0,058	-0,158	-0,148	0,071	-0,147	-0,079	0,939	-0,382	0,425
VI/Lt	-0,470	-0,570	-0,305	-0,485	-0,513	-0,383	-0,272	-0,419	-0,052	-0,273	-0,044
	L2	Ao1	Ao2	VI	Lt/At	Vc/At	Aa/Lt	LA/Aa	Lo/Ao	At/Aa	A1/L1
L2	1,000										
Ao1	0,721	1,000									
Ao2	0,064	0,034	1,000								
VI	0,059	0,149	0,279	1,000							
Lt/At	0,098	0,034	-0,286	-0,405	1,000						
Vc/At	0,053	0,048	-0,203	-0,198	0,570	1,000					
Aa/Lt	0,022	0,193	0,269	0,208	-0,543	-0,227	1,000				
La/Aa	-0,312	-0,485	0,166	0,052	-0,001	0,008	-0,457	1,000			
Lo/Ao	-0,142	-0,070	-0,306	-0,375	0,375	0,297	-0,389	0,155	1,000		
At/Aa	-0,115	-0,222	0,068	0,240	-0,580	-0,403	-0,368	0,440	-0,034	1,000	
A1/L1	0,061	0,017	-0,223	-0,313	0,690	0,935	-0,264	-0,026	0,305	-0,495	1,000
A2/L2	-0,628	-0,376	0,287	0,028	-0,241	-0,231	0,031	0,306	0,107	0,228	-0,225
Vc/Lt	-0,622	-0,526	0,230	0,051	-0,378	-0,341	-0,045	0,254	0,027	0,453	-0,391
Ao1/Ao2	-0,069	-0,005	0,215	0,352	-0,807	0,025	0,503	-0,003	-0,248	0,413	-0,164
Ao1/Ao	0,480	0,728	-0,654	-0,080	0,210	0,157	-0,060	-0,497	0,154	-0,181	0,145
Ao2/Ao	0,509	0,738	-0,647	-0,073	0,218	0,178	-0,039	-0,475	0,154	-0,210	0,163
(A1/L1)/(A2/L2)	-0,509	-0,738	0,647	0,073	-0,218	-0,178	0,039	0,475	-0,154	0,210	-0,163
(A2/L2)/(Vc/Lt)	-0,458	-0,184	0,227	-0,002	-0,057	-0,051	0,060	0,273	0,144	-0,002	-0,013
(A1/L1)/(Vc/Lt)	-0,622	-0,539	0,188	-0,011	-0,245	-0,364	-0,134	0,258	0,074	0,390	-0,383
VI/At	-0,621	-0,376	0,268	0,005	-0,183	-0,245	-0,009	0,306	0,127	0,202	-0,223
VI/Lt	-0,303	-0,336	-0,005	0,769	-0,172	0,014	-0,022	0,253	-0,317	0,195	-0,085

	A2/L2	Vc/Lt	Ao1/Ao2	Ao1/Ao	Ao2/Ao	(A1/L1)/(A2/L2)	(A2/L2)/(Vc/Lt)	(A1/L1)/(Vc/Lt t)	VI/At	VI/Lt
A2/L2	1,000									
Vc/Lt	0,207	1,000								
Ao1/Ao2	-0,525	-0,151	1,000							
Ao1/Ao	-0,548	-0,145	0,996	1,000						
Ao2/Ao	0,548	0,145	-0,996	-1,000	1,000					
(A1/L1)/(A2/L2)	0,296	0,018	-0,293	-0,292	0,292	1,000				
(A2/L2)/(Vc/Lt)	0,983	0,027	-0,506	-0,531	0,531	0,298	1,000			
(A1/L1)/(Vc/Lt)	0,691	0,033	-0,452	-0,464	0,464	0,887	0,700	1,000		
VI/At	0,129	0,212	-0,251	-0,249	0,249	0,019	0,094	0,050	1,000	
VI/Lt	0,233	0,468	-0,299	-0,300	0,300	0,024	0,154	0,092	0,942	1,000

4.2.5 Dados moleculares

Os dez espécimes de *Asolene meta* utilizados para o processo de extração do DNA foram amplificados e sequenciados com êxito. Foram obtidos fragmentos do COI com média de aproximadamente 620 pares de bases, sendo em média composto por 39,1% de timina (T), 16,4% de citosina (C), 22,9% de adenina e 21,1% de guanina (G). O fragmento maior que foi recuperado é composto por 689 pares de bases (Tabela 5):

```
CATAAAGATATTGGTACTTTATATATTTTATTTGGTATATGATCGGGATTAG
TGGGTGCTGCCTTAAGAATGCTTATTCGGGCTGAACTTGGGCAGCCAGGGGCT
CTATTAGGTGACGATCAGCTTTATAATGTTATTGTTACGGCTCATGCTTTTGTAAT
GATTTTTTTCTTAGTTATACCTATGATAATTGGAGGATTTGGGAAGTACTTGTGC
CTTAATATTAGGGGCACCCGATATGGCTTTTCCTCGTTTAAATAATATAAGGTTT
TGATTACTTCCGCCTTCTTTATTACTTCTTTTATGCTCCGCCGCTGTAGAAAGTG
GAGTTGGAACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCTTTGGCTGGGAATTTGGCCCATG
CTGGTGGTTCTGTAGATCTAGCAATTTTTCTTTACATCTAGCTGGTGCTTCTTCT
ATCTTAGGGGCAGTTAATTTTATTACAACAGTAATTAACATACGATGGCGCGGTA
TACAATTTGAACGATTACCTTTATTTGTGTGATCTGTTAAGATTACAGCGATTTTA
TTACTTTTATCTCTACCTGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTACTTACTGATCG
AACTTCAATACATCTTTTTTTGACCCTGCTGGAGGTGGGGATCCTATCTTATAT
CAGCATCTTTTTTTGATTTTTTTGGTCACCC.
```

As espécies próximas filogeneticamente resultantes da consulta ao *Blast* Server (GenBank) foram *A. spixii*, *A. pulchella*, *A. platae*, *Felipponea iheringi* (Pilsbry, 1933), *Marisa planogyra* Pilsbry, 1933 e *Marisa cornuarietis*. Tais sequências, portanto, foram utilizadas nas análises de divergência genética. Estas análises mostraram que todos os espécimes analisados de *A. meta* apresentaram 0% de distância tanto no modelo de máxima verossimilhança quanto de *p-distance*. No modelo de máxima verossimilhança, *A. meta* apresentou distância genética de 0,052 a 0,062 para *A. spixii*, 0,062 a 0,07 para *A. pulchella*, 0,071 a 0,085 para *A. platae*, 0,110 a 0,121 para *F. iheringi*, 0,115 a 0,132 para *M. cornuarietis* e 0,121 a 0,128 para *M. planogyra*. (Tabela 6). Com relação ao modelo *p-distance*, *A. meta* apresentou distância genética de 0,050 a 0,058 para *A. spixii*, 0,059 a 0,066 para *A. pulchella*, 0,067 a 0,080 para *A. platae*, 0,101 a 0,110 para *F. iheringi*, 0,103 a 0,113 para *M. cornuarietis* e 0,108 a 0,112 para *M. planogyra* (Tabela 7).

Tabela 5 - Composição de nucleotídeos do COI de dez exemplares sequenciados de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA).

Espécimes	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)	Total
1	40,0	16,5	22,9	20,6	685
2	39,8	16,7	22,7	20,8	669
3	39,3	16,7	23,1	20,9	657
4	39,8	17,0	22,8	20,5	689
5	38,0	16,8	22,6	22,6	513
6	38,7	17,4	22,7	21,2	638
7	39,4	16,6	23,2	20,8	639
8	38,7	17,4	22,7	21,2	638
9	38,0	17,4	22,7	21,9	484
10	39,2	16,8	23,2	20,8	665
Média	39,1	16,9	22,9	21,1	627,7

Tabela 6 - Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências de dez exemplares de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e as espécies próximas depositadas no GenBank, utilizando modelo de Máxima Verossimilhança.

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
<i>Asolene meta</i> _1	0,000																										
<i>Asolene meta</i> _2	0,000	0,000																									
<i>Asolene meta</i> _3	0,000	0,000	0,000																								
<i>Asolene meta</i> _4	0,000	0,000	0,000	0,000																							
<i>Asolene meta</i> _5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																						
<i>Asolene meta</i> _6	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																					
<i>Asolene meta</i> _7	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																				
<i>Asolene meta</i> _8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																			
<i>Asolene meta</i> _9	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																		
<i>Asolene meta</i> _10	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000																	
<i>Asolene platae</i> _EU528517	0,078	0,079	0,078	0,078	0,078	0,085	0,080	0,078	0,080	0,086																	
<i>Asolene platae</i> _EU528518	0,071	0,072	0,071	0,071	0,071	0,077	0,073	0,071	0,073	0,077	0,009																
<i>Asolene platae</i> _EU528519	0,071	0,072	0,071	0,071	0,071	0,077	0,073	0,071	0,073	0,072	0,028	0,019															
<i>Asolene pulchella</i> _EU528507	0,068	0,068	0,068	0,068	0,070	0,070	0,068	0,070	0,070	0,034	0,025	0,019															
<i>Asolene pulchella</i> _EU528583	0,063	0,063	0,063	0,062	0,063	0,066	0,064	0,062	0,064	0,065	0,036	0,026	0,023	0,017													
<i>Asolene pulchella</i> _FJ710306	0,067	0,067	0,067	0,067	0,070	0,068	0,068	0,068	0,070	0,036	0,026	0,019	0,000	0,018													
<i>Asolene spixii</i> _EF514950	0,052	0,053	0,052	0,052	0,052	0,062	0,053	0,053	0,053	0,059	0,061	0,051	0,054	0,053	0,053												
<i>Asolene spixii</i> _FJ710307	0,052	0,052	0,052	0,052	0,052	0,062	0,052	0,053	0,052	0,059	0,060	0,050	0,050	0,053	0,052	0,053	0,000										
<i>Felipponea iheringi</i> _FJ710308	0,110	0,110	0,110	0,110	0,110	0,116	0,111	0,110	0,111	0,121	0,099	0,098	0,098	0,091	0,093	0,091	0,100	0,100									
<i>Marrisa commarietis</i> _EF514952	0,127	0,127	0,127	0,127	0,132	0,132	0,127	0,132	0,126	0,130	0,127	0,145	0,136	0,133	0,139	0,138	0,139	0,133									
<i>Marrisa commarietis</i> _EF514953	0,117	0,117	0,117	0,117	0,118	0,120	0,117	0,120	0,115	0,117	0,115	0,105	0,109	0,107	0,113	0,113	0,109	0,123									
<i>Marrisa commarietis</i> _EF514954	0,117	0,117	0,117	0,117	0,118	0,120	0,117	0,120	0,115	0,117	0,115	0,111	0,105	0,109	0,107	0,113	0,113	0,109	0,123	0,000							
<i>Marrisa commarietis</i> _EF514955	0,125	0,125	0,125	0,125	0,127	0,128	0,125	0,128	0,125	0,121	0,119	0,115	0,109	0,117	0,111	0,120	0,121	0,117	0,132	0,013	0,013						
<i>Marrisa commarietis</i> _EU274568	0,126	0,126	0,126	0,126	0,127	0,128	0,126	0,128	0,125	0,122	0,120	0,116	0,110	0,118	0,110	0,120	0,120	0,115	0,136	0,013	0,013	0,000					
<i>Marrisa planogyra</i> _EF514956	0,121	0,122	0,121	0,124	0,121	0,126	0,122	0,126	0,122	0,125	0,126	0,118	0,122	0,123	0,109	0,111	0,105	0,117	0,103	0,111	0,109						
<i>Marrisa planogyra</i> _EF514957	0,121	0,122	0,121	0,124	0,121	0,123	0,122	0,126	0,122	0,125	0,124	0,119	0,119	0,120	0,109	0,112	0,104	0,118	0,106	0,114	0,114	0,005					
<i>Marrisa planogyra</i> _FJ710305	0,121	0,121	0,121	0,121	0,121	0,121	0,122	0,121	0,122	0,122	0,119	0,119	0,115	0,115	0,115	0,101	0,104	0,113	0,102	0,110	0,108	0,003	0,008				

Tabela 7 - Estimativas de divergência evolutiva entre as sequências de dez exemplares de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e as espécies próximas depositadas no GenBank, utilizando modelo *p-distance*.

Espécie	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26		
<i>Asolene meta</i> _1																												
<i>Asolene meta</i> _2	0,000																											
<i>Asolene meta</i> _3	0,000 0,000																											
<i>Asolene meta</i> _4	0,000 0,000 0,000																											
<i>Asolene meta</i> _5	0,000 0,000 0,000 0,000																											
<i>Asolene meta</i> _6	0,000 0,000 0,000 0,000 0,000																											
<i>Asolene meta</i> _7	0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000																											
<i>Asolene meta</i> _8	0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000																											
<i>Asolene meta</i> _9	0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000																											
<i>Asolene meta</i> _10	0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000 0,000																											
<i>Asolene platae</i> _EUF528517.1	0,073 0,074 0,073 0,073 0,073 0,080 0,075 0,074 0,075 0,081																											
<i>Asolene platae</i> _EUF528518.1	0,067 0,068 0,067 0,067 0,067 0,072 0,069 0,067 0,069 0,072 0,009																											
<i>Asolene platae</i> _EUF528519.1	0,067 0,068 0,067 0,067 0,067 0,072 0,069 0,067 0,069 0,068 0,027 0,018																											
<i>Asolene pulchella</i> _EUF528507.1	0,064 0,065 0,064 0,064 0,064 0,066 0,066 0,064 0,066 0,066 0,034 0,024 0,018																											
<i>Asolene pulchella</i> _EUF528583.1	0,060 0,060 0,060 0,059 0,060 0,062 0,061 0,059 0,061 0,062 0,035 0,026 0,023 0,017																											
<i>Asolene pulchella</i> _FJ710306.1	0,064 0,064 0,064 0,064 0,064 0,066 0,064 0,065 0,064 0,066 0,035 0,026 0,019 0,000 0,018																											
<i>Asolene spixii</i> _EF514950	0,050 0,051 0,050 0,050 0,050 0,058 0,050 0,051 0,050 0,056 0,058 0,049 0,052 0,050 0,051																											
<i>Asolene spixii</i> _FJ710307	0,050 0,050 0,050 0,050 0,050 0,058 0,050 0,050 0,050 0,056 0,058 0,048 0,051 0,050 0,051 0,000																											
<i>Felipponea iheringi</i> _FJ710308	0,101 0,101 0,101 0,101 0,101 0,105 0,101 0,100 0,101 0,110 0,091 0,091 0,091 0,085 0,086 0,085 0,093 0,093																											
<i>Marsia commarietis</i> _EF514952	0,111 0,111 0,111 0,111 0,111 0,115 0,115 0,111 0,110 0,114 0,112 0,126 0,119 0,117 0,121 0,120 0,121 0,116																											
<i>Marsia commarietis</i> _EF514953	0,104 0,104 0,104 0,104 0,104 0,105 0,107 0,104 0,107 0,103 0,105 0,103 0,100 0,095 0,098 0,096 0,101 0,101 0,098 0,108																											
<i>Marsia commarietis</i> _EF514954	0,104 0,104 0,104 0,104 0,104 0,105 0,107 0,104 0,107 0,103 0,105 0,103 0,100 0,095 0,098 0,096 0,101 0,101 0,098 0,108																											
<i>Marsia commarietis</i> _EF514955	0,110 0,110 0,110 0,110 0,110 0,113 0,113 0,110 0,113 0,112 0,108 0,106 0,103 0,098 0,104 0,099 0,107 0,107 0,104 0,116 0,113 0,000																											
<i>Marsia commarietis</i> _EUF514956	0,112 0,112 0,112 0,112 0,112 0,113 0,113 0,112 0,113 0,112 0,109 0,107 0,104 0,099 0,105 0,099 0,107 0,107 0,102 0,119 0,113 0,000																											
<i>Marsia commarietis</i> _EUF514957	0,108 0,109 0,108 0,111 0,108 0,112 0,109 0,112 0,109 0,112 0,113 0,113 0,106 0,110 0,110 0,110 0,098 0,100 0,095 0,103 0,094 0,100 0,099																											
<i>Marsia planogyra</i> _EF514956	0,108 0,109 0,108 0,111 0,108 0,111 0,109 0,112 0,109 0,112 0,112 0,112 0,107 0,107 0,107 0,107 0,107 0,099 0,101 0,094 0,104 0,096 0,096 0,103 0,103 0,005																											
<i>Marsia planogyra</i> _EF514957	0,108 0,109 0,108 0,111 0,108 0,111 0,109 0,112 0,109 0,112 0,112 0,112 0,107 0,107 0,107 0,107 0,107 0,099 0,101 0,094 0,104 0,096 0,096 0,103 0,103 0,005																											
<i>Marsia planogyra</i> _FJ710305	0,109 0,109 0,109 0,109 0,109 0,109 0,110 0,108 0,110 0,110 0,107 0,107 0,104 0,104 0,104 0,104 0,093 0,093 0,094 0,101 0,093 0,093 0,099 0,097 0,003 0,008																											

4.2.6 Distribuição Geográfica

Asolene meta é endêmica da bacia do São Francisco. Como não há dados na literatura, além da descrição original, a distribuição desta espécie, ilustrada na figura 31, baseia-se nas amostras coletadas para este estudo.

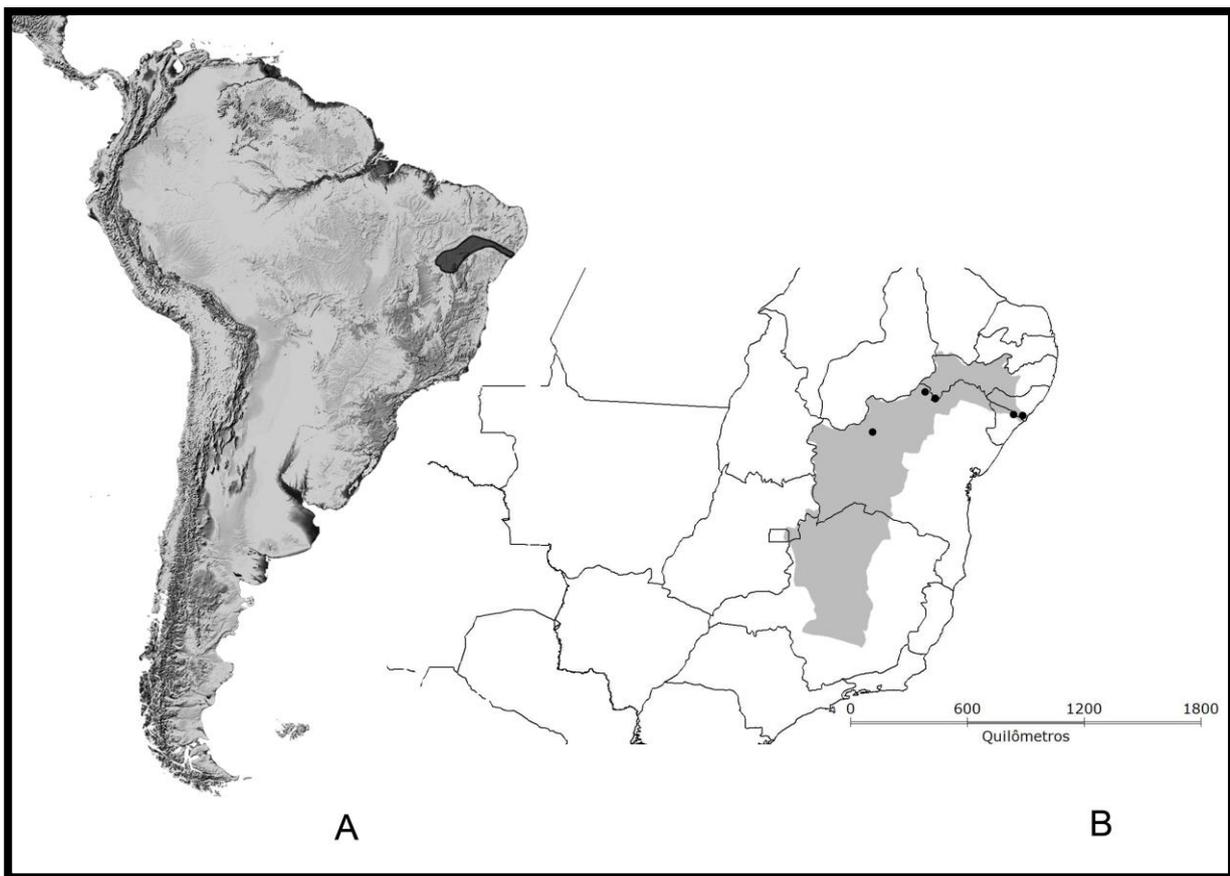


Figura 31 – A: Mapa da América do Sul com a distribuição geográfica de *Asolene meta* (Ihering, 1915) destacada em cinza escuro; B: pontos de coleta (●) com destaque da região da Bacia do São Francisco (cinza).

4.3 *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838)

Ampullaria zonata: d'Orbigny, 1835: 32. Homônimo júnior de *A. zonata* Spix, 1827

Ampullaria Spixii: d'Orbigny, 1838: 376, pl. 52, figs. 7 e 8. Novo nome para *A. zonata*.

Ampullaria Spixii d'Orb.: Phillippi, 1851: 32, pl. 9, fig. 1; Ihering, 1898: 50.

Ampullaria Spixi Orb.: Ihering, 1919: 336.

Asolene (Asolene) spixi d'Orb.: Hylton Scott, 1958: 312, pl. 22, fig. 4.

Asolene spixii (d'Orbigny, 1838): Cowie & Thiengo, 2003: 49; Hayes *et al.*, 2009a: 70, fig. 2; Hayes *et al.*, 2009b: 51, fig. 2.

Síntipos: Muséum national d'Histoire naturelle: MNHN 4523 (3 espécimes), 4524 (5 espécimes) (Cowie & Héros, 2012).

Localidade-tipo: Rio Paraná, província de Corrientes e Misiones (Argentina).

Material examinado: 35 exemplares do município de Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul (CMIOC 7745).

Diagnose: concha com abertura oval alongada, 4 a 5 voltas; câmara anterior do rim triangular; glândula apical da bainha do pênis pregueada, ocupando 1/3 da bainha e glândula mediana ovalada e lisa, localizada basalmente no lado direito da bainha.

4.3.1 *Descrição original*

“Concha larga, curta, frequentemente mais larga que curta; umbílico largo, que permite ver a espira; parece muito liso, e mostra estrias fracas em todos os lugares no sentido do crescimento; são sempre altamente corroídos na parte superior, composta de quatro a cinco voltas convexas, e tendo estas separadas umas das outras, a sutura muito superficial. Boca medíocre, oval a oblongo, bastante fora do eixo da concha. (...) Esta espécie se distingue claramente por sua espira curta, por seu umbílico largo, sua abertura estreita e alongada, sua forma de hélice e por sua sutura rasa.” (Traduzido do francês) (d'Orbigny, 1838).

4.3.2 *Caracterização*

4.3.2.1 Concha

Concha globosa, espessa, de cor amarelo à castanho. Bandas espirais castanho escuras, variando em número e espessura. Com $33,66 \pm 6,88$ mm de altura e $30,82 \pm 6,06$ mm de largura. Espira curta com proporção à altura total da concha variando de 0,07 a 0,14 ($0,11 \pm 0,02$; $n = 32$). Umbílico largo e profundo. Quatro a cinco voltas convexas ($4,40 \pm 0,39$), separadas por uma sutura bem definida levemente inclinada para a esquerda. Volta corporal ocupando mais de $\frac{3}{4}$ da concha, levemente inclinada próximo à sutura, com $29,78 \pm 5,88$ mm. Abertura oval alongada, sendo possível ver as bandas espirais por dentro da concha, com $23,48 \pm 3,334$ mm de altura e $19,43 \pm 1,49$ mm de largura. Alguns exemplares apresentam uma fina camada branca interna (Figura 32).

Opérculo córneo com núcleo concêntrico, espesso, inflexível, castanho escuro, selando completamente a abertura. Sem dimorfismo sexual, sendo uniformemente côncavo tanto nas fêmeas quanto nos machos (Figura 33).

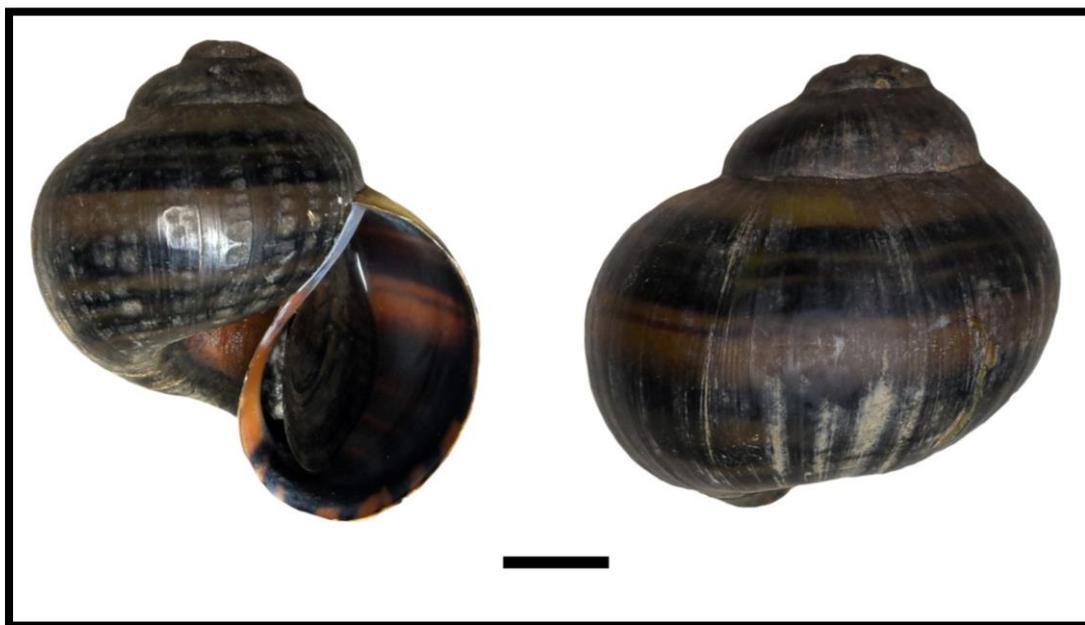


Figura 32 – Concha de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) proveniente do município de Eldorado do Sul, RS. Escala: 10 mm.

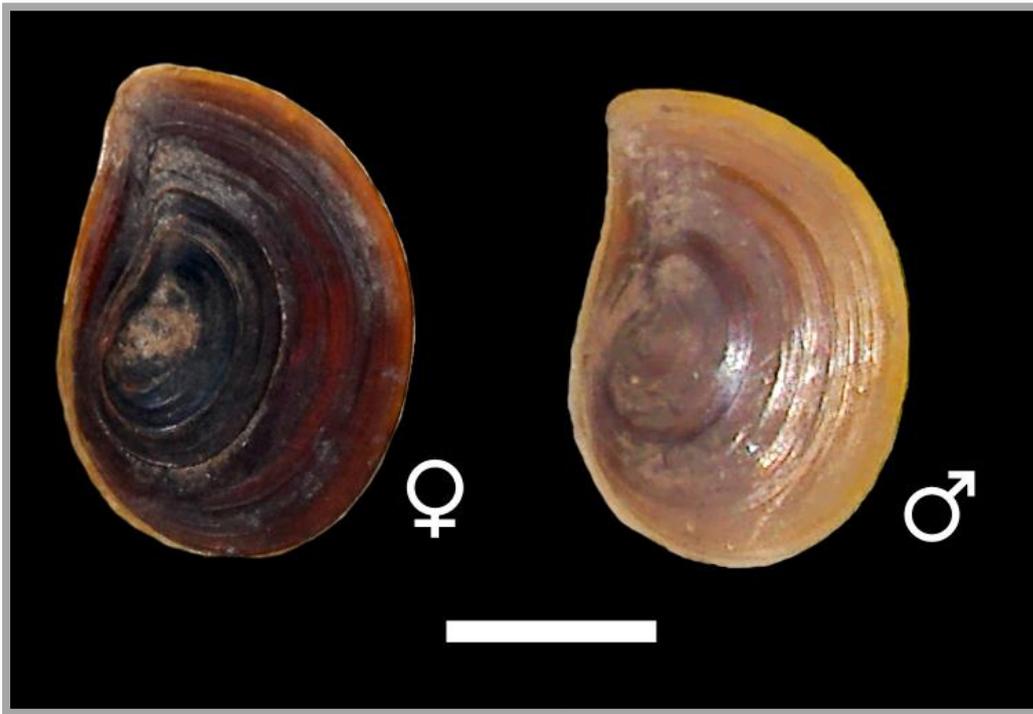


Figura 33 – Opérculos de espécimes fêmea e macho de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838) provenientes do município de Eldorado do Sul, RS. Escala: 10 mm.

4.3.2.2 Anatomia externa

Pé oval alongado com coloração de cinza a amarelada, geralmente pigmentado. Cabeça bem definida com tentáculos cefálicos longos e altamente extensíveis. Pedúnculos oculares na base dos tentáculos cefálicos abrigando os olhos. Probóscide curta, retangular, com a extremidade anterior elaborada em palpos labiais tentaculiformes extensíveis com função sensorial. Os lobos nucais localizam-se à direita e à esquerda da nuca. O lobo nucal direito, ou sifão exalante, é ligeiramente côncavo, enquanto o esquerdo, ou sifão inalante, é pouco extensível, formando um canal em forma de colher que não fecha completamente. Borda do manto espessa com faixas pigmentadas. A região do manto sobre o saco pulmonar e as brânquias é pigmentada de preto (Figuras 34A-B).

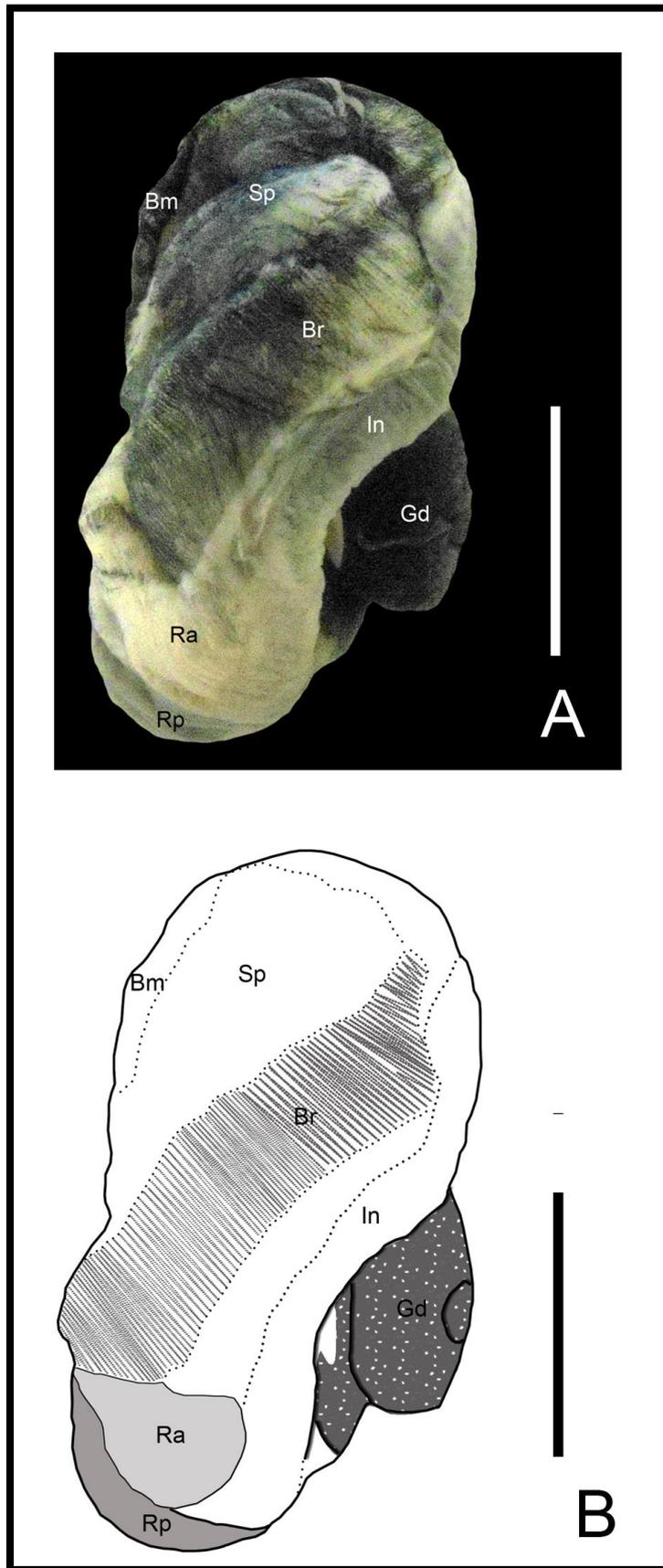


Figura 34 - Anatomia externa de um exemplar fêmea de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838): foto (A) e esquema (B). Bm: borda do manto; Br: brânquias; Gd: glândula digestiva; In: intestino; Ra: rim anterior; Rp: rim posterior; Sp: saco pulmonar. Escala: 10 mm.

4.3.2.3 Caverna do manto

Caverna do manto (Figuras 35A-B) é ampla, ocupando em torno de 1/3 da volta corporal, abrigo o saco pulmonar e o osfrádio no lado esquerdo e as brânquias e parte dos sistemas reprodutor e digestório no lado direito. Saco pulmonar volumoso, com pneumóstoma localizado centralmente na porção anterior. Osfrádio (Figura 35C) anterior ao saco pulmonar, próximo ao sifão inalante e acima do pneumóstoma, oval alongado com uma crista bipectinada na porção posterior, seguindo uma única crista central com inúmeras cristas longitudinais.

Brânquias formadas por pequenas lamelas triangulares, com uma longa extensão desde a base da borda do manto até o pericárdio, seguindo ao longo do saco pulmonar. Glândula hipobranquial estreita localizada entre as brânquias e o intestino. Nos machos, o complexo peniano encontra-se na base da borda do manto. Dobra palial cruzando a base da caverna do manto, começando abaixo do lobo nugal direito, sobrepondo à direita acima da próstata ou oviduto palial e seguindo até a base da caverna do manto. Abaixo da caverna do manto, localizam-se o pericárdio à esquerda e o rim à direita. Músculo columelar curto (Figuras 35A-B).

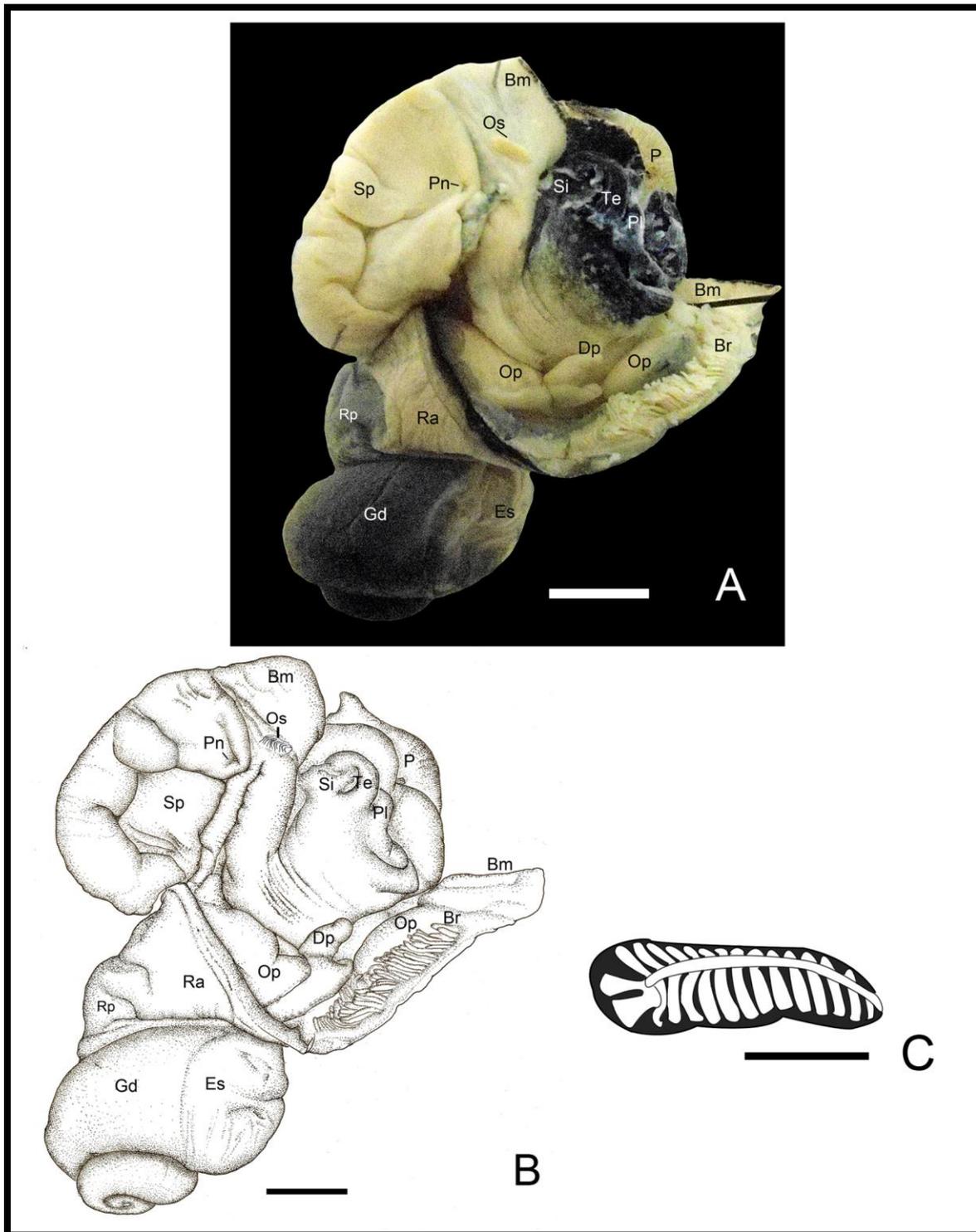


Figura 35 – Cavidade do manto de um exemplar fêmea de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838): foto (A), esquema (B) e detalhe do osfrádio (C). Bm: borda do manto; Br: brânquias; Dp: dobra palial; Es: estômago; Gd: glândula digestiva; Op: oviduto palial; Os; osfrádio; P: pé; Pl: palpo labial; Pn: pneumóstoma; Ra: rim anterior; Rp: rim posterior; Si: sifão inalante; Sp: saco pulmonar; Te: tentáculo. Escalas: 5 mm (A-B) e 1 mm (C).

4.3.2.4 Sistema digestório

Sistema digestório dividido em três regiões: anterior, média e posterior. A região anterior compreende o aparato bucal e o esôfago, a região média o estômago, enquanto a região posterior compreende o intestino médio e o reto (Figura 36A).

Boca pregueada localizada na probóscide, na extremidade anterior da cabeça. O bulbo bucal é oval, fortemente muscular e abriga a rádula e a mandíbula. Sobre o bulbo bucal encontram-se os gânglios bucais, as glândulas salivares e sacos esofágicos (Figura 36B). Odontóforo largo ocupando grande parte da cavidade bucal.

Rádula (Figura 37A) do tipo taenioglossa, com média de 42 fileiras de dentes. Dente central retangular com base côncava e porção superior convexa, cúspide central maior que as outras, triangular e com a ponta arredondada, com três a quatro cúspides menores de cada lado (Figura 37B). Dente lateral com base longa, com ondulações, com quatro cúspides, sendo três menores e uma maior, triangular e com a ponta afilada (Figura 37C). Dentes marginais alongados, com duas cúspides cada, uma maior e uma menor, triangulares e pontiagudos (Figuras 37C-D).

Par de mandíbulas quitinosas rodeando a boca dorsalmente. Glândulas salivares esbranquiçadas e rugosas, atrás do gânglio bucal, sobrepondo os nervos bucais posteriores. Bolsa esofágica circundando o aparato bucal, amarelada, rugosa e massiva. Saco radular arredondado, saindo ventralmente ao bulbo bucal (Figura 36B). Seguindo o bulbo bucal encontra-se o papo, uma estrutura alargada e arredondada. Posteriormente ao papo, segue o esôfago (Figura 36A), cilíndrico, abaixo da base da cavidade do manto, desembocando na câmara gástrica.

Estômago altamente muscular, oval alongado, com coloração branca na sua face externa. Câmara gástrica ampla, com inúmeras dobras em todo seu interior. Septo vertical alto, emergindo da abertura do esôfago e desembocando no profundo vestíbulo. Escudo gástrico alongado, sendo pouco desenvolvido ou ausente na maioria dos espécimes. Extremidade posterior da tiflossole maior elaborada em pequena dobra arredondada, na parede anterior do vestíbulo. Bolsa gástrica formada por duas depressões bem visíveis, separadas por uma fina divisão, localizada no limite anterior do saco do estilete. Acima da bolsa gástrica segue a tiflossole menor, separada da tiflossole maior por uma fina dobra que desemboca na bolsa gástrica. Tiflossole maior emergindo da parede do vestíbulo (Figuras 36C-D).

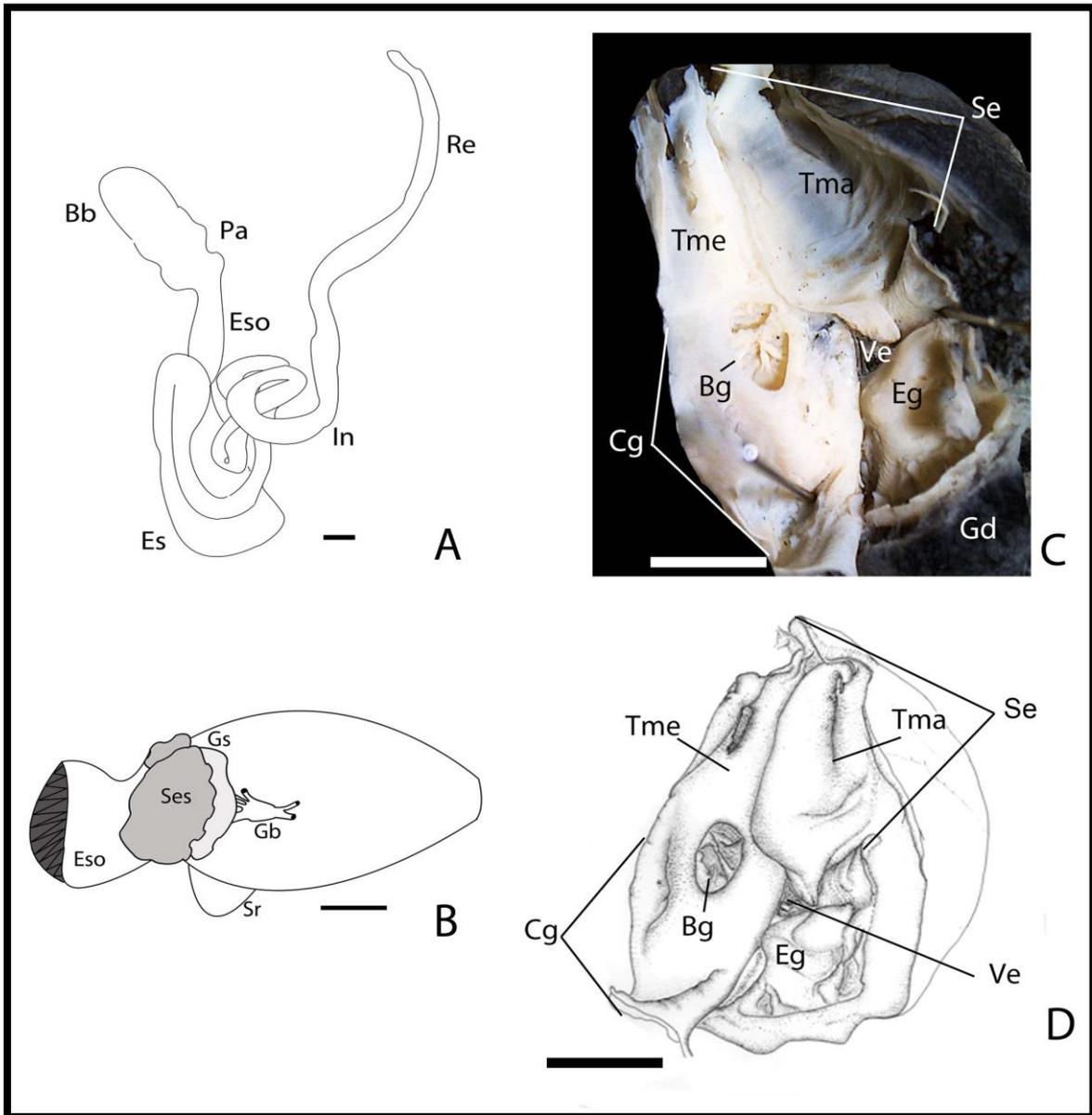


Figura 36 - Sistema digestório de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) (A), bulbo bucal (B) e estômago (C-D). Bb: bulbo bucal; Bg: bolsa gástrica; Cg: câmara gástrica; Eg: escudo gástrico; Eso: esôfago; Es: estômago; Gb: gânglio bucal; Gs: gândula salivar; In: intestino; Pa: papo; Re: reto; Se: saco do estilete; Ses: saco esofágico; Sr: saco radular; Tma: tiflossole maior; Tme: tiflossole menor; Ve: vestibulo. Escala: 1 mm.

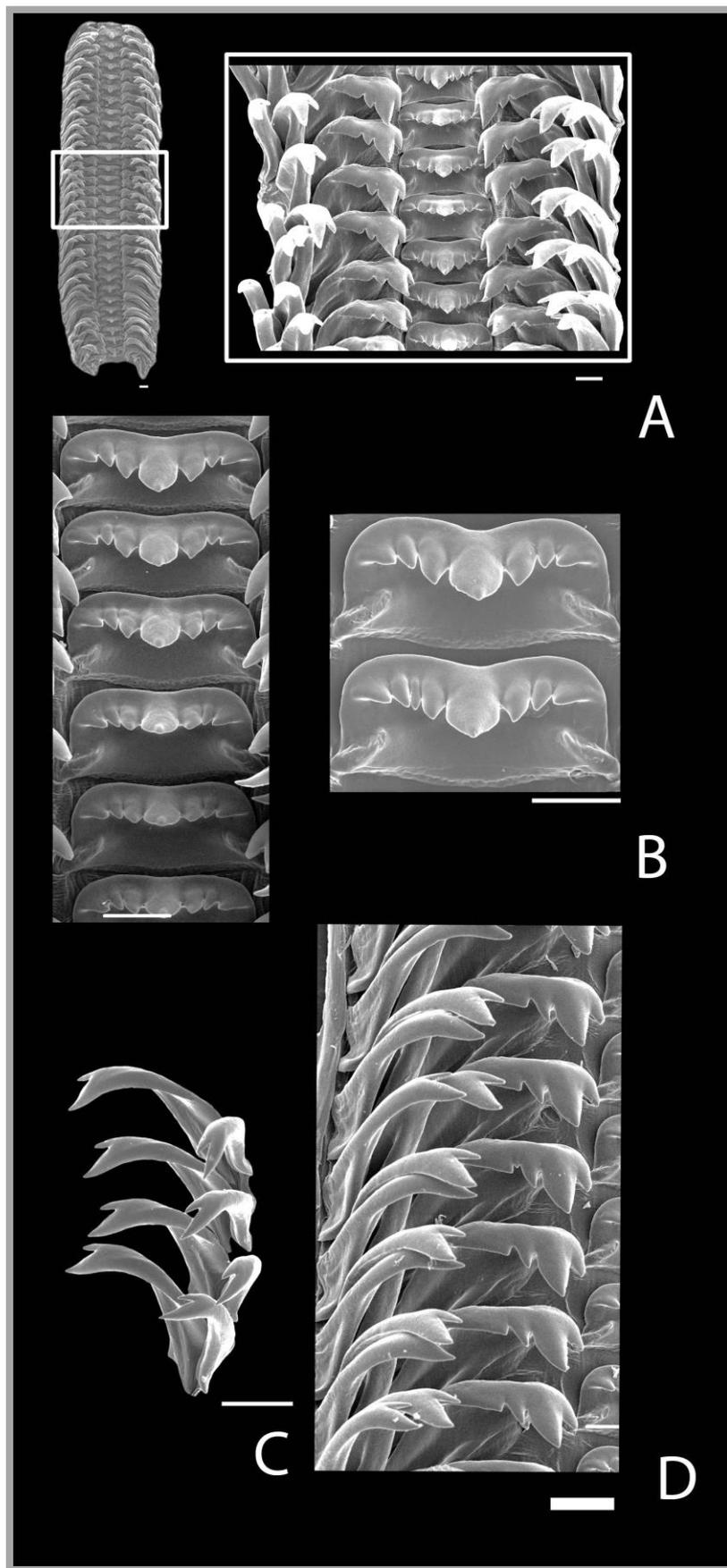


Figura 37 – Rádula de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838): A: visão geral e organização dos dentes; B: dentes centrais; C: dentes marginais. D: dentes laterais e marginais. Escala: 100 μ m.

4.3.2.5 Sistema nervoso

Sistema nervoso hipoatroide (Figura 38), com quatro pares de gânglios: glânglios cerebrais, gânglios bucais, gânglios pediosos e gânglios pleurais. Os gânglios cerebrais, pediosos e pleurais constituem o anel nervoso. Gânglios cerebrais conectam-se entre si pela comissura cerebral sobrepondo o aparato bucal, cada um com um nervo tentacular, um nervo ocular e sete a oito nervos labiais, alguns podendo ser ramificados. Gânglios bucais com cinco nervos innervando o aparato bucal, conectados ao gânglio cerebral pelo conectivo cerebro-bucal (Figura 36B).

Dorsalmente ao aparato bucal encontram-se os gânglios pedais e pleurais. Os gânglios pediosos estão conectados entre si pela comissura pediosa e conectados a cada gânglio cerebral pelo conectivo cerebro-pedioso. Gânglios pleurais posteriores aos gânglios pediosos, conectados entre si pela comissura pleural e ao gânglio cerebral pelo conectivo cerebro-pleural. Gânglio pleural direito fundido ao gânglio subintestinal, conectado ao gânglio suprainestinal pelo conectivo pleuro-suprainestinal. Seguem ambos os gânglios conectados ao gânglio visceral pelos conectivos viscero-subintestinal e viscero-suprainestinal, respectivamente (Figura 38).

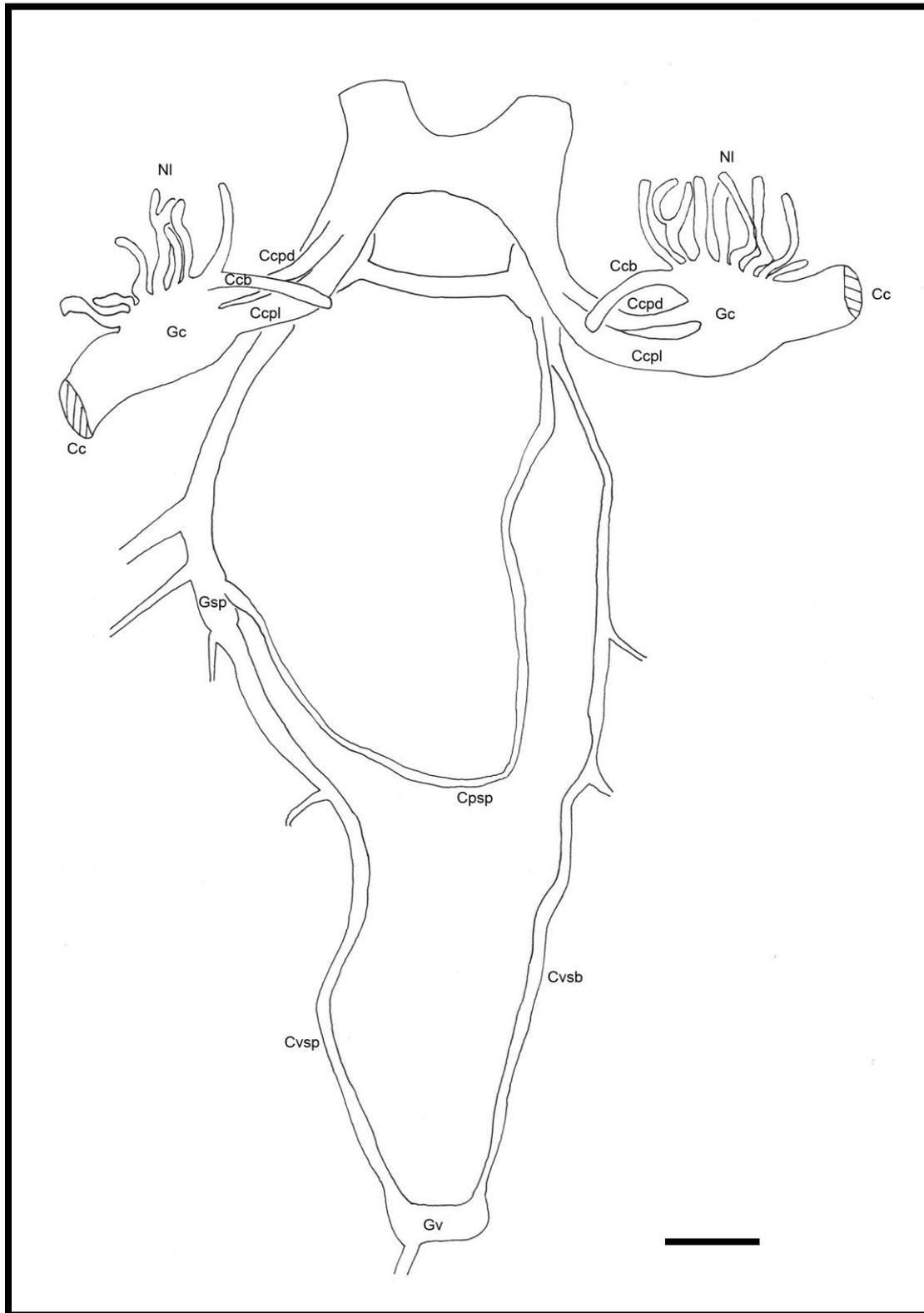


Figura 38 – Sistema nervoso de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838). Cc: comissura cerebral; Ccb: conectivo cerebro-bucal; Ccpd: conectivo cerebro-pedal; Ccpl: conectivo cerebro-pleural; Cpsp: conectivo pleuro-supraintestinal; Cvsb: conectivo viscero-subintestinal; Cvsp: conectivo viscero-supraintestinal; Gc: gânglio cerebral; Gsp: gânglio supraintestinal; Gv: gânglio visceral; NI: nervos labiais. Escala: 1 mm.

4.3.2.6 Rim

Rim formado por duas câmaras interconectadas, o rim anterior e o rim posterior. A câmara anterior encontra-se localizada abaixo das brânquias e à direita do pericárdio, sendo amarelada, densa e triangular (Figura 39A). Internamente é formada por dois conjuntos de lamelas regulares ocupando todo o seu lúmen, arranjadas transversalmente em ambos os lados da veia renal aferente anterior. As lamelas são recobertas por uma fina camada de tecido. A veia renal aferente anterior entra na base do rim anterior à esquerda, adjacente à cavidade pericárdica, seguindo centralmente ao longo do rim anterior. Subdivide-se em dois grandes ramos que suplementam a área dorsal e ventral à veia renal aferente anterior (Figura 39B).

A câmara posterior, localizada acima do intestino, é maior que a câmara anterior e mais delgada, com coloração cinza. Internamente é formada por lamelas irregulares ao longo dos ramos de dois grandes vasos, que ocupam grande parte do teto do rim posterior, o vaso renal aferente posterior e o vaso renal eferente. O vaso renal aferente posterior é maior que o vaso renal aferente anterior, seguindo na região central do rim posterior, subdividindo-se em inúmeros ramos ao longo de sua extensão. A veia renal eferente segue a esquerda da veia renal aferente posterior ao longo do teto do rim posterior, igualmente subdividindo-se em inúmeros ramos (Figuras 39A-B).

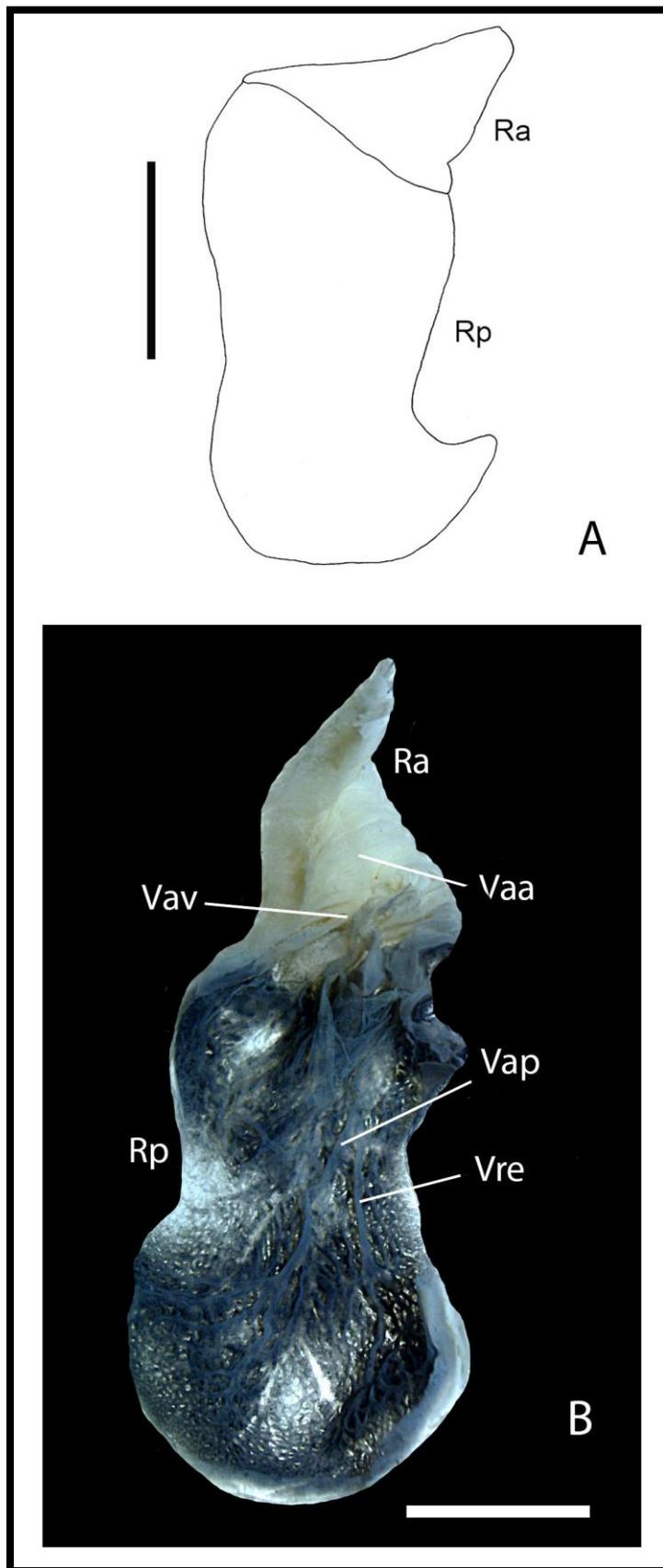


Figura 39 – Rim de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838): dorsal (A) e ventral (B). Ra: rim anterior; Rp: rim posterior; Vaa: veia renal aferente anterior; Vap: veia renal aferente posterior; Vav: ramo ventral da veia renal aferente anterior; Vre: veia renal eferente. Escala: 5 mm.

4.3.2.7 Pericárdio

Aurícula oval alongada, de coloração clara e paredes finas, com duas veias bem distintas, a veia branquial-pulmonar eferente localizada à esquerda da aurícula, e a veia renal eferente, na porção superior. O ventrículo é quadrangular, maior que a aurícula e mais denso. Conecta-se ao tronco arterioso, que se divide formando as aortas anterior e posterior. Ampola volumosa, oval alongada, seguindo a partir da aorta anterior e estendendo-se na base na cavidade pericárdica (Figura 40).

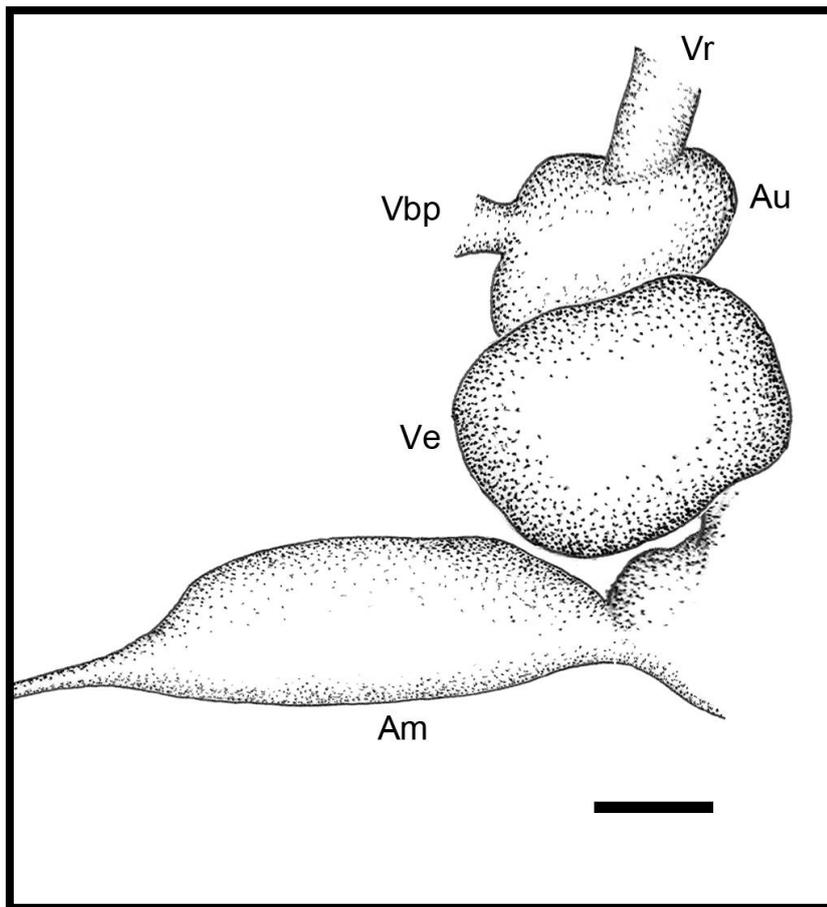


Figura 40 – Coração de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838). Am: ampola; Au: aurícula; Vbp: veia branquial-pulmonar eferente; Ve: ventrículo; Vr: veia renal eferente. Escala: 1 mm.

4.3.2.8 Sistema reprodutor masculino

Testículo volumoso, de cor creme, ocupando as três primeiras voltas da espira, acima da glândula digestiva. Canal deferente delgado, emergindo ventralmente ao testículo até a vesícula seminal arredondada, localizada na base da cavidade do manto. Próstata cilíndrica sem circunvoluções, seguindo ao lado do reto no lado direito da cavidade do manto, terminando na goteira seminal, onde se curva para a esquerda. Bolsa do pênis ovalada e de paredes finas, contendo o pênis enovelado quando retraído, abrindo para o canal mediano dorsal à bainha do pênis, permitindo passagem do pênis durante a cópula (Figura 41). Pênis cilíndrico e longo, formado por um epitélio simples com células cúbica e uma extensa camada de fibras musculares (Figuras 42A-B). Canal espermático fechado (Figuras 42A,C). A coloração Reticulina de Gomori revelou que o pênis é constituído principalmente por feixes reticulares (corados em preto) e ainda por fibras de colágeno concêntrico do tipo I em menor quantidade, circundando o canal espermático (corados em marrom) (Figuras 42A,D). A coloração PAS mostrou que o epitélio do interior do canal espermático é rico em glicoproteínas (corado em vermelho) (Figuras 42A,E). As lâminas do pênis coradas em Alcian Blue pH 1,0 e pH 2,5 foram negativas para estas colorações.

Bainha do pênis curvada para a direita, pouco volumosa, com a largura diminuindo gradativamente da base até o ápice. O canal mediano é formado por duas dobras, a esquerda sobrepondo a direita, iniciando na base da bainha do pênis até próximo à glândula apical. Apresenta duas glândulas internas, a glândula apical é pregueada na sua face exterior, ocupando cerca de 1/3 da bainha do pênis e a glândula mediana lisa e arredondada, localizada na base da bainha no lado direito, próximo ao canal mediano (Figuras 43A-B). Externamente encontra-se a glândula basal externa, formada por tecido conjuntivo formado por células redondas a ovóides. Inúmeros ductos no interior a glândula e um ducto central, circundado por um conjunto de ácinos (Figuras 44A-D). Com a coloração Reticulina de Gomori, foram evidenciados inúmeros feixes reticulares (corados em preto), além de feixes colagênicos do tipo I (corados em marrom) (Figuras 44A,D). A coloração PAS revelou uma camada de revestimento no interior dos ductos rico em glicoproteínas (corado em vermelho) (Figuras 44A,E). A coloração Alcian Blue pH 1,0 revelou a presença de proteoglicanos de alta sulfatação no interior dos ductos (Figuras 44A,F). Glândula basal externa negativa para a coloração Alcian Blue pH 2,5.

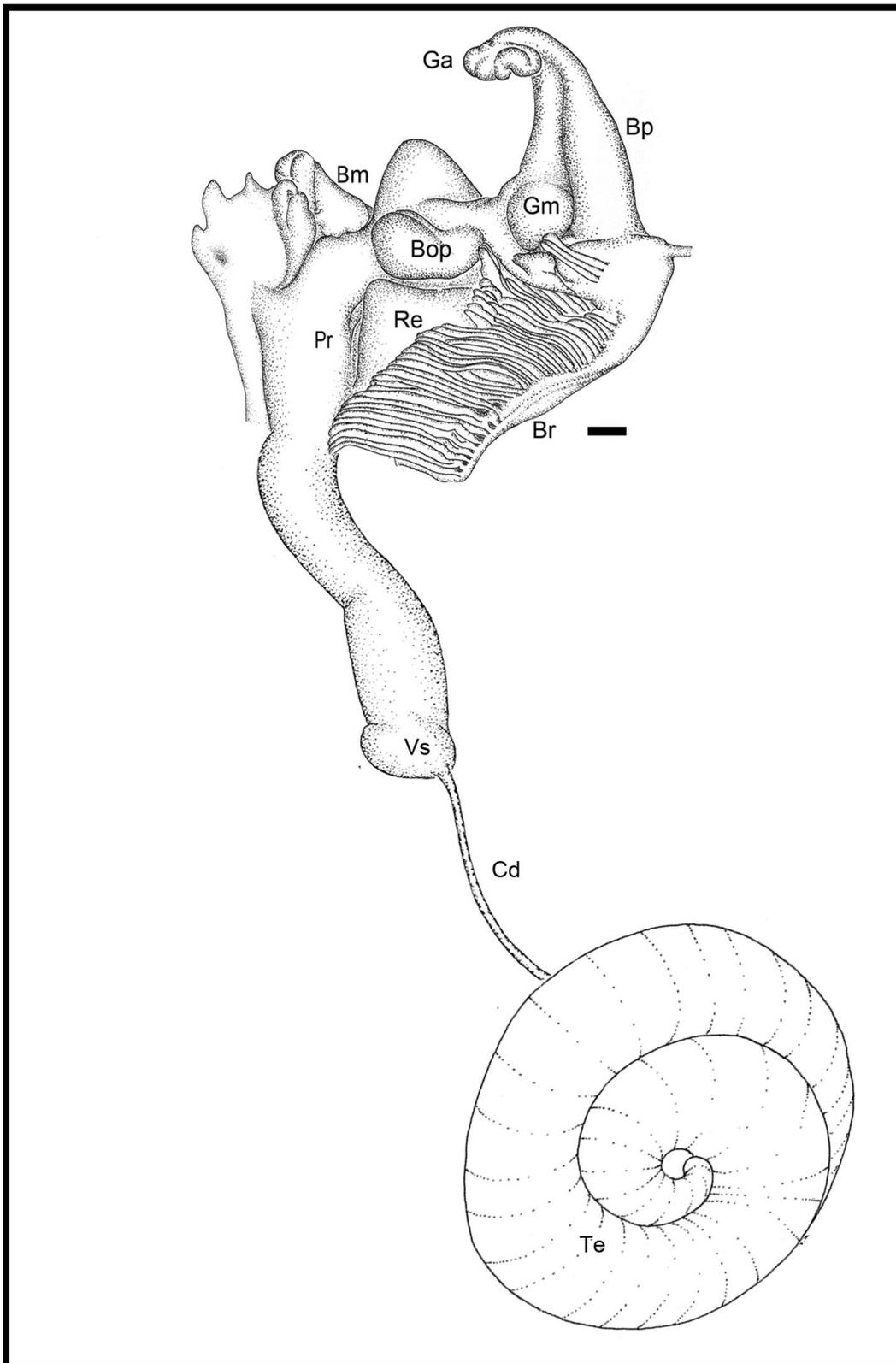


Figura 41 –Sistema reprodutor masculino de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838). Bop: bolsa do pênis; Bp: bainha do pênis; Br: brânquias; Bm: borda do manto; Cd; canal deferente; Ga: glândula apical; Gm: glândula mediana; Pr: próstata; Re: reto; Te: testículo; Vs: vesícula seminal Escala: 1 mm.

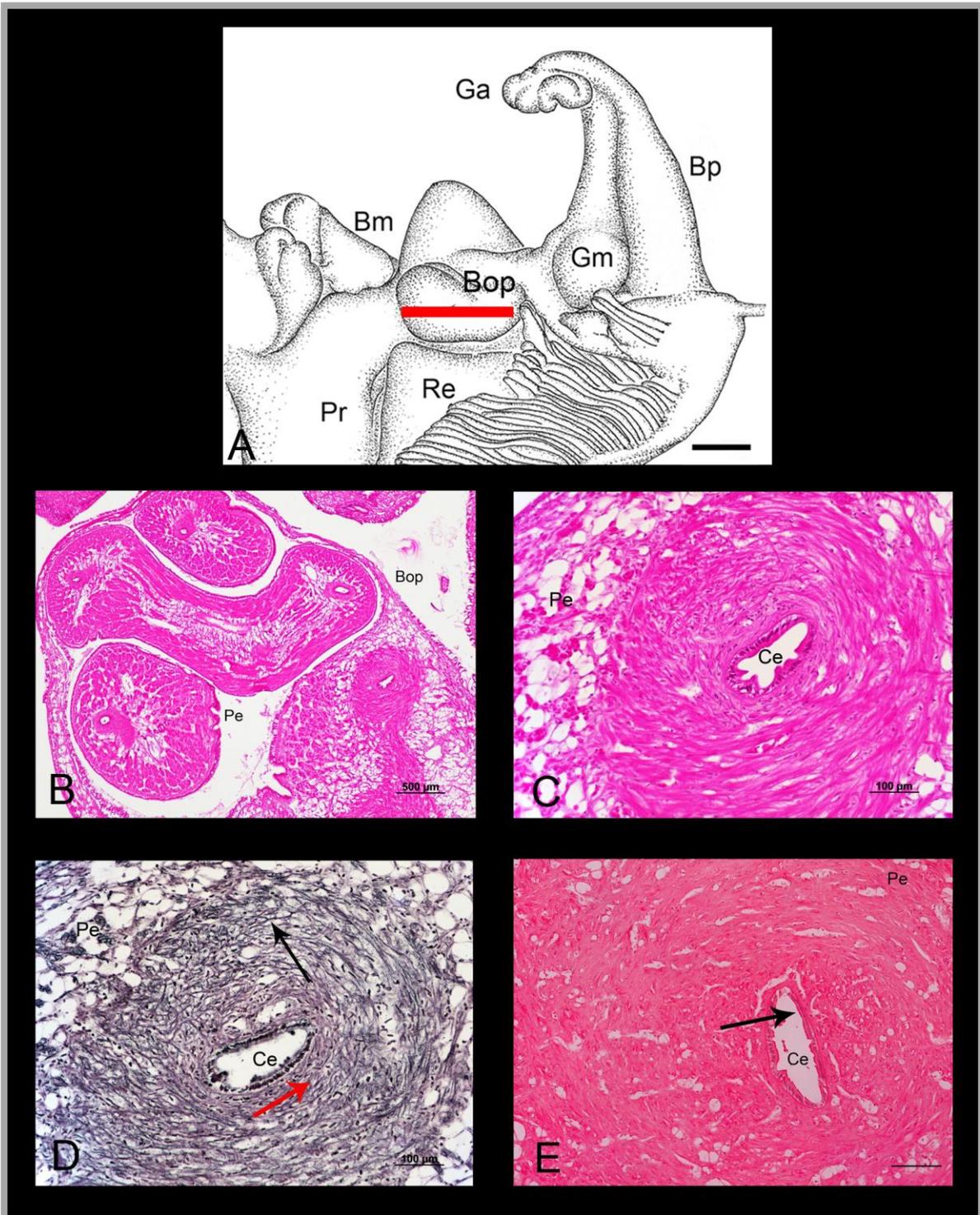


Figura 42 - Cortes histológicos do pênis de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838). A: Complexo peniano mostrando o local dos cortes histológicos. B: Histologia da bolsa do pênis corada com hematoxilina-eosina. C: Histologia do pênis corada com hematoxilina-eosina. D: Histologia do pênis corada com Reticulina de Gomori; seta vermelha indicando fibras reticulares e seta preta indicando fibras colagênicas do tipo I. E: Histologia do pênis de corada com PAS; setas pretas indicando região positiva. Bm: borda do manto; Bop: bolsa do pênis; Bp: bainha do pênis; Br: brânquias; Ce: canal espermático; Ga: glândula apical; Gm: glândula mediana; Pe: pênis; Pr: próstata; Re: reto. Escalas: A: 1 mm; B: 500 μ m; C-E: 100 μ m.

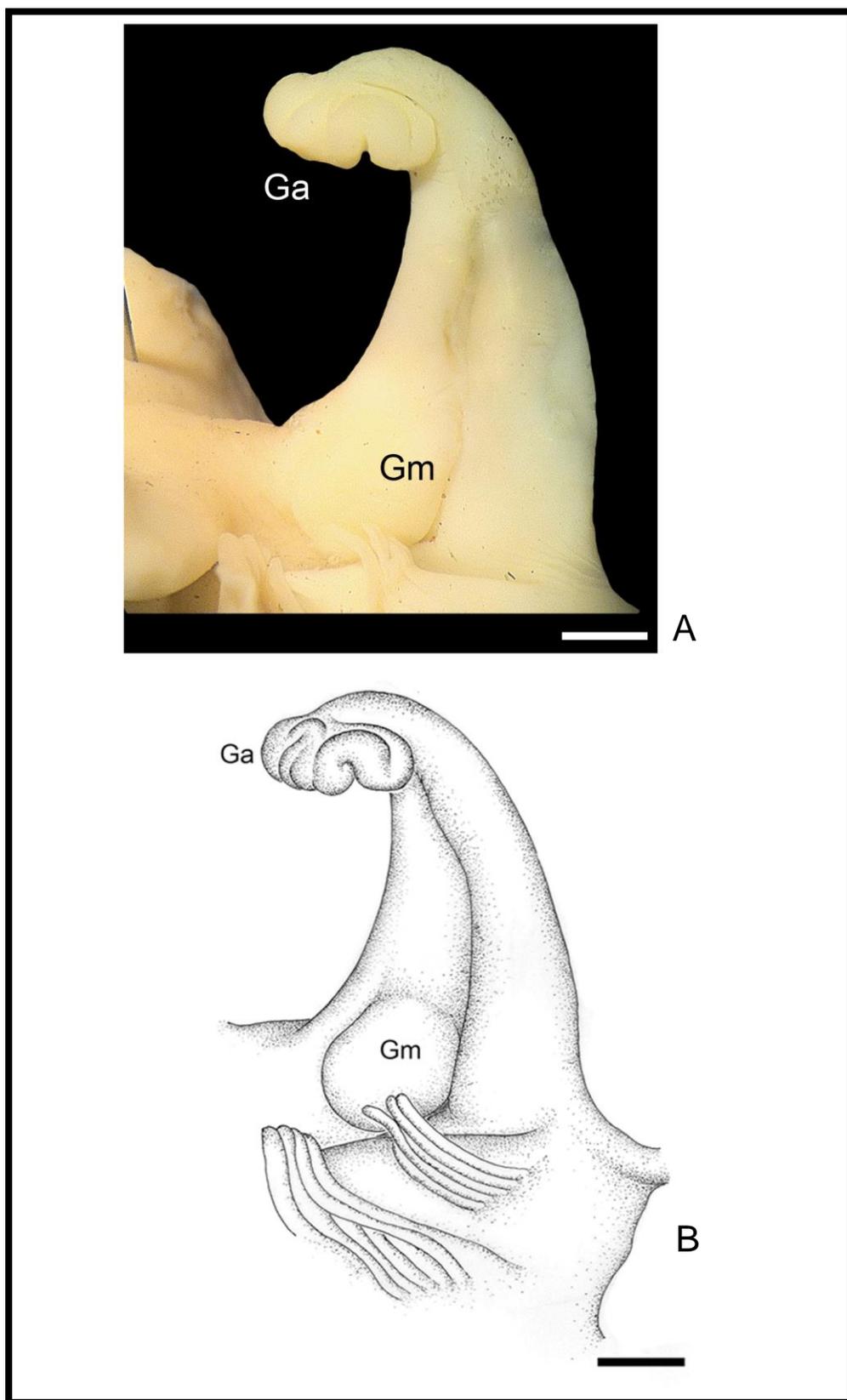


Figura 43 – Bainha do pênis de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) vista ventralmente: foto (A) e esquema (B). Ga: glândula apical; Gm: glândula mediana. Escala: 1 mm.

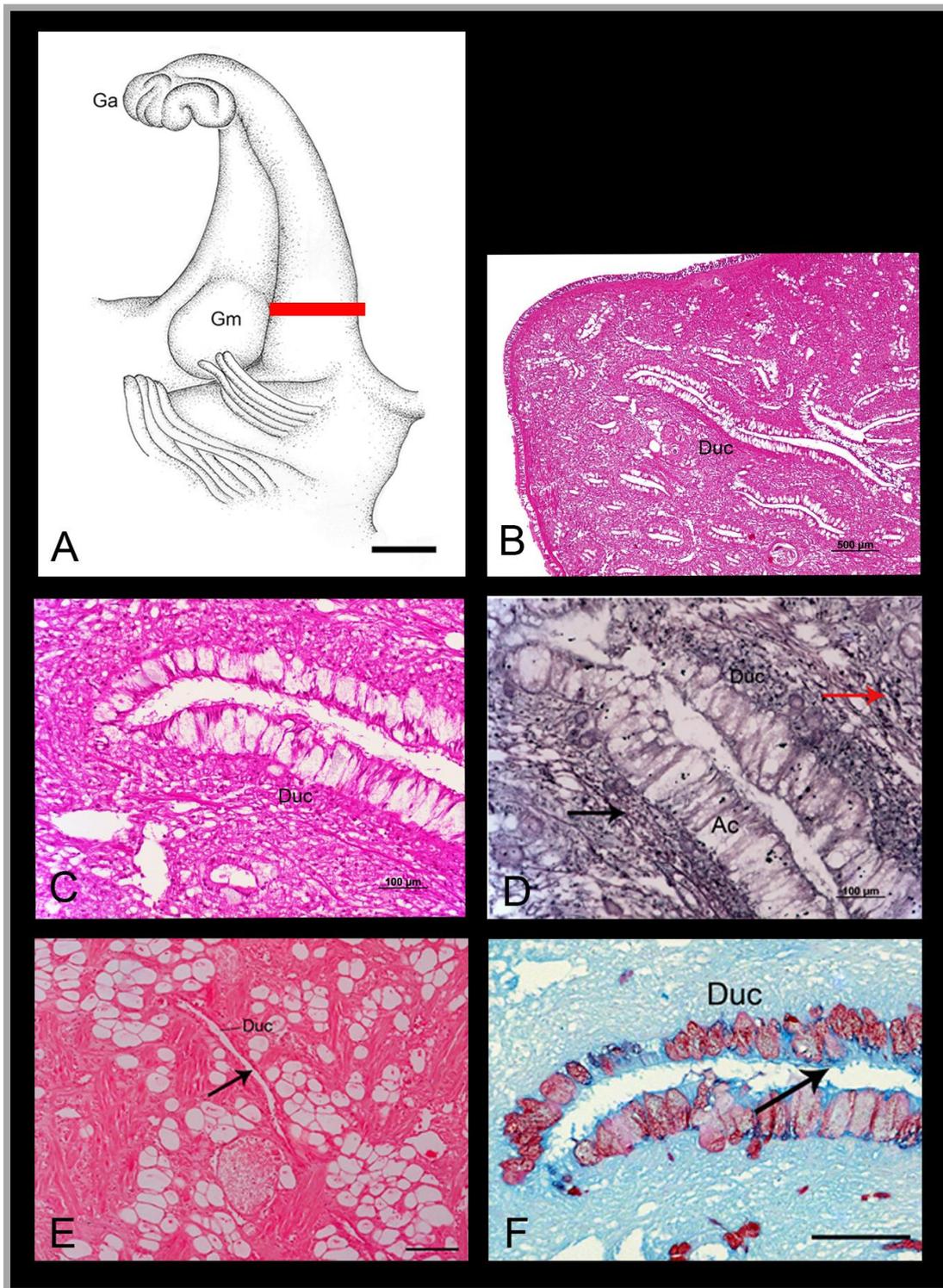


Figura 44 - Cortes histológicos da glândula externa da bainha do pênis de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838). A: Bainha do pênis mostrando o local dos cortes histológicos. B-C: Histologia da glândula basal externa corada com hematoxilina-eosina. D: Histologia da glândula basal externa corada Reticulina de Gomori; seta vermelha indicando fibras reticulares e seta preta indicando fibras colagênicas do tipo I. E: Histologia glândula basal externa corada com PAS; setas pretas indicando região positiva. F: Histologia glândula basal externa corada com Alcian Blue pH 1,0; seta preta indicando região positiva. Duc: ducto; Ga: glândula apical; Gm: glândula mediana. Escalas: A: 1 mm; B: 500 µm; C-F: 100 µm.

4.3.2.9 Sistema reprodutor feminino

O ovário arborescente é formado por inúmeros divertículos envolvidos pela glândula digestiva e ocupa posição semelhante ao testículo nos machos. Os divertículos são conectados, unindo-se ramos que se fundem formando o oviduto visceral. O oviduto visceral, fino e delgado, segue abaixo do rim e atrás da cavidade do manto para entrar no receptáculo seminal (Figura 45A).

O receptáculo seminal (Figura 45B) localiza-se transversalmente ao oviduto palial, é muscular, oval alongado, com uma região lisa recoberta por uma área fortemente granular, sendo visível tanto a porção lisa quanto a granulada emergindo da glândula de albúmen. Glândula da casca segue enovelada, unindo-se ao oviduto palial. O receptáculo seminal, a bolsa copuladora, a glândula da casca e a glândula de albúmen encontram-se envoltos em uma grande massa de cor alaranjada, que ocupa grande parte da base da cavidade do manto.

Segue o oviduto palial, com três voltas visíveis emergindo da massa alaranjada, continuando na base cavidade do manto, ao lado do reto, e terminando na abertura genital (Figura 45A).

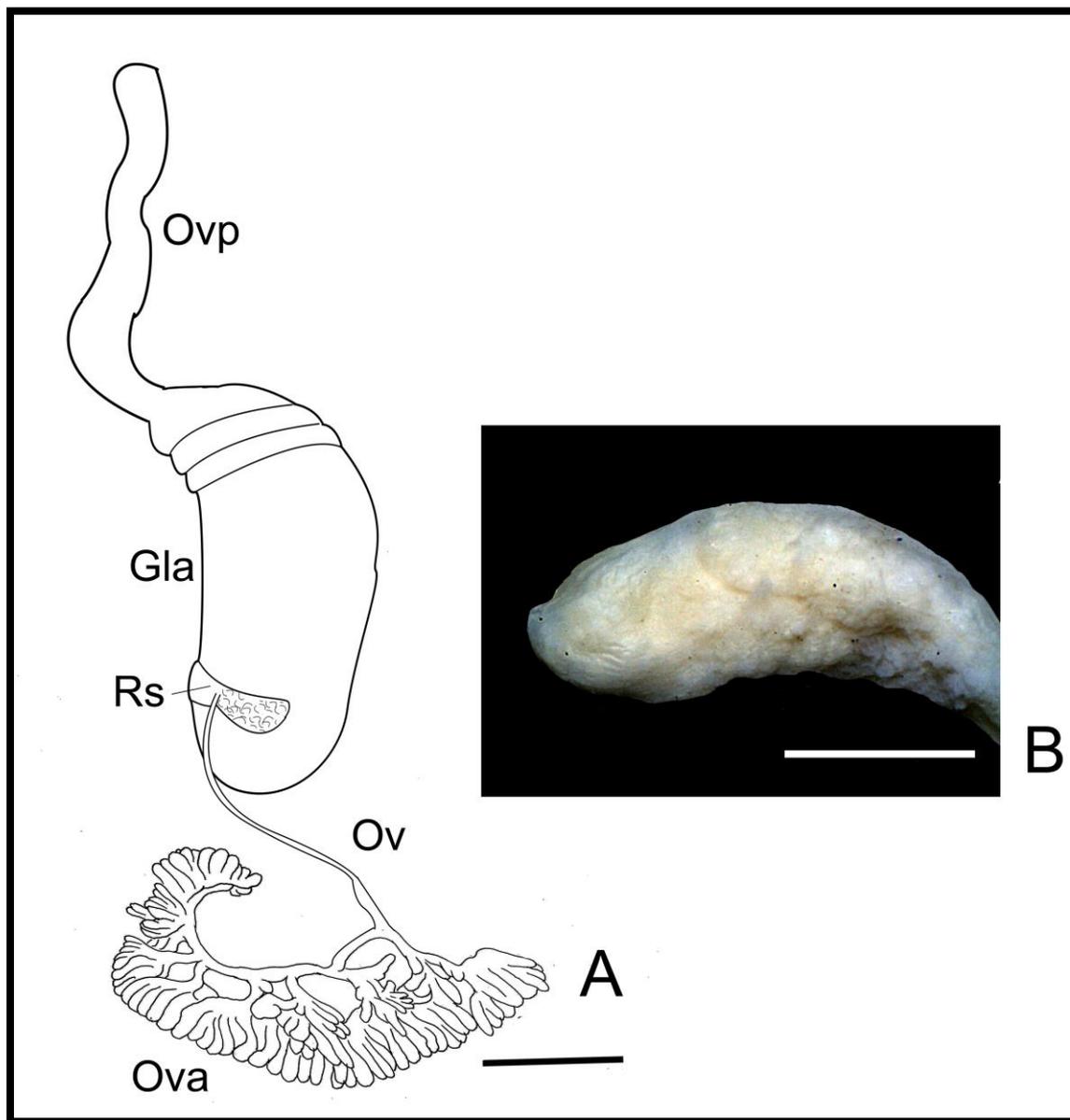


Figura 45 – Sistema reprodutor feminino de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) (A) e destaque do receptáculo seminal (B). Gla: glândula de albúmen, Ov: oviduto visceral; Ova: ovário; Ovp: oviduto palial; Rs: receptáculo seminal. Escalas: 5 mm (A) e 1 mm (B).

4.3.2.10 Desova

A desova gelatinosa de *Asolene spixii* posta na vegetação submersa é composta por ovos sem pigmentação, redondos e não calcários. (Figura 46A-C). À medida que os ovos amadurecem, a desova vai se tornando transparente, até ser possível ver o pequeno embrião no interior do ovo (Figura 46D). O jovem recém-eclodido apresenta concha transparente, permitindo ver o manto com pigmentações esparsas, as faixas na borda do manto e a massa visceral com coloração creme. A espira apresenta pontuações pouco evidentes (Figura 46E).

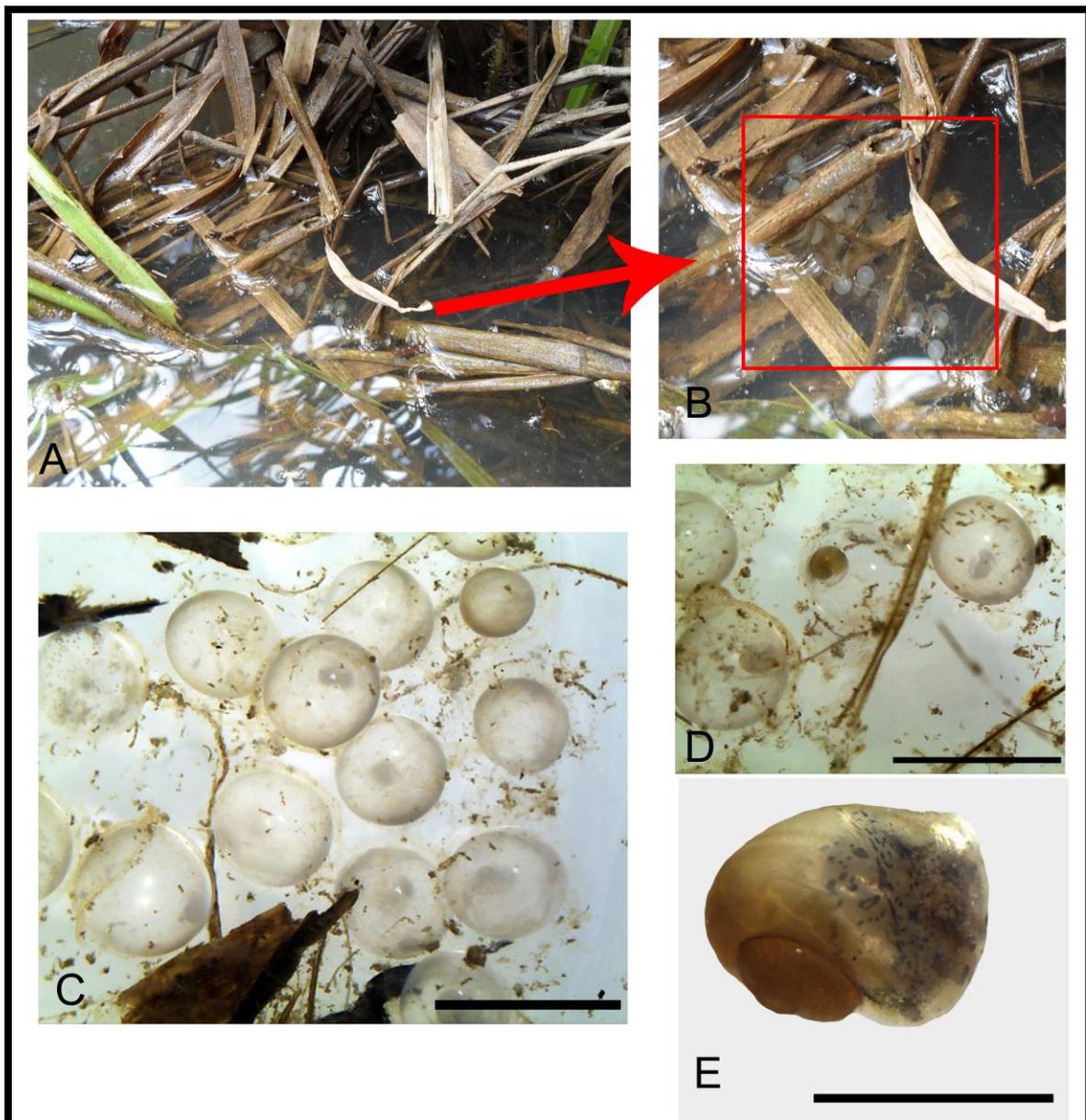


Figura 46 - Desova de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) *in situ* (A-B), detalhe dos ovos (C-D) e recém-eclodido (E). Escala: 5 mm.

4.3.3 Análise de dimorfismo sexual

Para análise de dimorfismo sexual, foram analisadas 18 conchas e opérculos de espécimes fêmeas e 14 de machos de *Asolene spixii*. A amplitude de variação de ambos os gêneros para as 32 variáveis analisadas encontra-se na tabela 8.

A análise teste t de Student revelou que as variáveis A1 e Lo são significativamente diferentes entre fêmeas e machos de *A.spixii* ($p < 0.05$) (Tabela 9).

Tabela 8 – Estatística básica descritiva das conchas e dos opérculos dos espécimes fêmeas e machos de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) provenientes do município de Eldorado do Sul (RS).

	Fêmeas (n = 18)			Machos (n = 14)		
	Mínimo	Máximo	Med±Dp	Mínimo	Máximo	Med ± Dp
At	22,48	44,81	35,26±7,52	24,34	41,33	31,62±5,56
Lt	20,33	40,31	32,08±6,15	22,35	39,59	29,21±5,76
Vc	19,47	40,47	31,19±6,42	21,85	36,42	27,98±4,72
Ec	12,72	25,66	20,73±4,26	14,21	24,70	18,25±3,16
Aa	16,70	29,84	24,06±3,74	18,01	26,75	22,73±2,70
La	12,20	24,07	18,42±3,16	13,04	23,25	16,83±2,83
Ao	13,42	33,03	22,03±4,74	15,92	25,60	19,48±3,00
Lo	9,44	24,83	15,14±3,70	10,54	17,27	12,78±2,04
A1	1,23	3,85	1,98±0,85	1,10	2,06	1,38±0,29
L1	3,37	8,02	5,60±1,63	3,60	7,86	4,90±1,09
A2	2,26	5,24	3,55±1,05	2,17	4,82	3,05±0,65
L2	6,86	18,08	11,91±3,27	7,85	17,32	10,76±2,94
Ao1	7,36	18,83	11,64±2,58	8,12	13,23	10,18±1,46
Ao2	6,06	14,20	10,40±2,40	7,59	12,37	9,30±1,60
VI	3,75	5,00	4,41±0,41	3,87	5,12	4,39±0,35
Lt/At	0,83	0,99	0,91±0,04	0,84	1,00	0,92±0,04
Vc/At	0,86	0,93	0,89±0,02	0,87	0,92	0,89±0,02
Aa/Lt	0,66	0,87	0,76±0,05	0,67	0,91	0,79±0,07
La/Aa	0,68	0,83	0,76±0,04	0,67	0,88	0,74±0,05
Lo/Ao	0,59	0,91	0,69±0,07	0,63	0,71	0,66±0,02
At/Aa	1,23	1,58	1,45±0,11	1,19	1,56	1,38±0,10
A1/L1	0,21	0,53	0,36±0,10	0,19	0,52	0,29±0,09
A2/L2	0,19	0,41	0,30±0,06	0,23	0,38	0,29±0,05
Vc/Lt	0,91	1,05	0,97±0,04	0,88	1,04	0,96±0,04
Ao1/Ao2	0,82	1,33	1,13±0,14	0,98	1,22	1,10±0,07
Ao1/Ao	0,45	0,57	0,53±0,03	0,49	0,55	0,52±0,02
Ao2/Ao	0,43	0,55	0,47±0,03	0,45	0,51	0,48±0,02
(A1/L1)/(A2/L2)	0,83	1,66	1,18±0,25	0,70	1,48	1,01±0,23
(A1/L1)/(Vc/Lt)	0,19	0,43	0,31±0,06	0,23	0,38	0,30±0,05
(A2/L2)/(Vc/Lt)	0,23	0,54	0,37±0,10	0,19	0,54	0,31±0,10
VI/At	0,09	0,20	0,13±0,03	0,11	0,19	0,14±0,03
VI/Lt	0,11	0,22	0,14±0,03	0,12	0,20	0,16±0,03

Tabela 9 - Análise Teste t de Student entre as variáveis conchiliométricas de espécimes fêmeas e machos de *Asolene spixii spixii* (d'Orbigny, 1838) provenientes do município de Eldorado do Sul (RS).

Variável	t	df	p
At	1,515	30	0,140
Lt	1,346	30	0,188
Ec	1,824	30	0,078
Vc	1,564	30	0,128
Aa	1,123	30	0,270
La	1,480	30	0,149
Ao	1,757	30	0,089
Lo	2,146	30	0,040
A1	2,544	30	0,016
L1	1,389	30	0,175
A2	1,569	30	0,127
L2	1,027	30	0,313
Ao1	1,889	30	0,069
Ao2	1,467	30	0,153
VI	0,111	30	0,912
Lt/At	-0,511	30	0,613
Vc/At	-0,032	30	0,974
Aa/Lt	-1,468	30	0,152
La/Aa	1,591	30	0,122
Lo/Ao	1,651	30	0,109
At/Aa	1,853	30	0,074
A1/L1	1,787	30	0,084
A2/L2	0,664	30	0,512
Vc/Lt	0,517	30	0,609
Ao1/Ao2	0,838	30	0,409
Ao1/Ao	0,656	30	0,517
Ao2/Ao	-0,656	30	0,517
(A1/L1)/(A2/L2)	2,032	30	0,051
(A2/L2)/(Vc/Lt)	0,562	30	0,603
(A1/L1)/(Vc/Lt)	1,700	30	0,099
VI/At	-1,107	30	0,277
VI/Lt	-1,084	30	0,287

A Análise de Escalonamento Multidimensional não apresentou agrupamentos com uma separação espacial entre fêmeas e machos de *A. spixii* (Figura 47).

Com base no resultado obtido na Correlação de Pearson (Tabela 10), as variáveis At, Ec, Lt, La, Vc, Ao, Ao1, L1, A1/L1, Ao1/Ao, Ao1/Ao2, VI/At foram retiradas da Análise Discriminante, a qual apresentou resultados que não diferenciam os espécimes fêmeas e machos significativamente (Wilk's lambda =

0,312, $df = 19,12$, $p > 0,05$). A matriz de classificação indicou que 10 dos 18 exemplares fêmeas e 7 dos 14 machos de *Asolene spixii* apresentaram identidade morfológica do gênero, com índices de acerto de 56% e 50%, respectivamente (Figura 48). A matriz F resultou em um índice de diferença de 1,391 entre fêmeas e machos

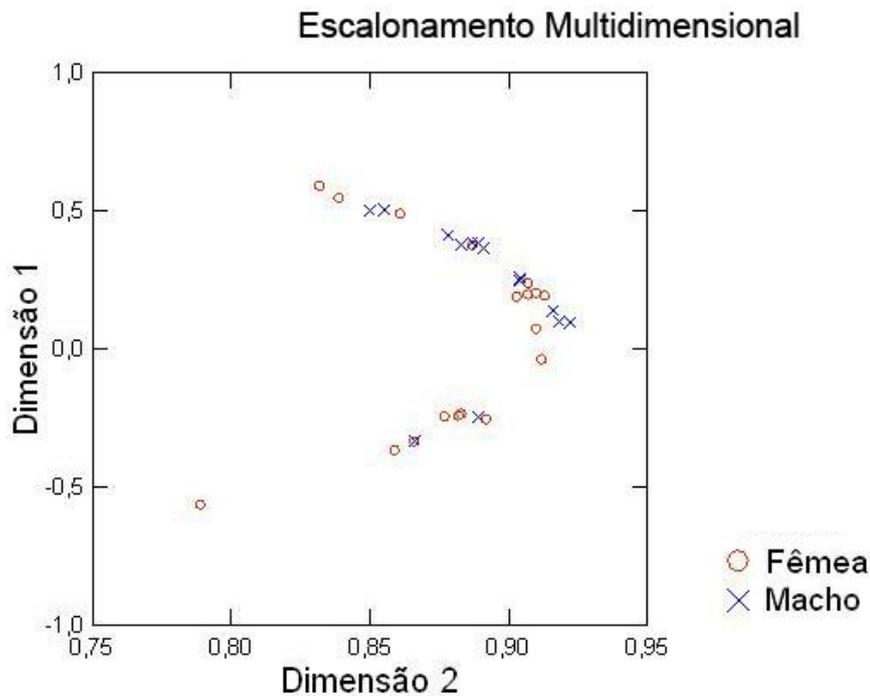


Figura 47 - Análise de Escalonamento Multidimensional a partir de dados conchiliométricos de fêmeas e machos de *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838).

Análise Discriminante

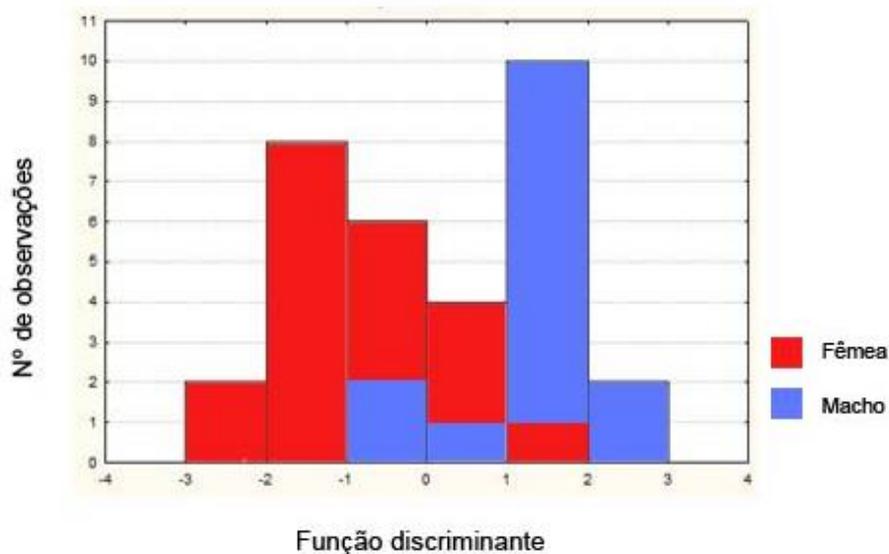


Figura 48 - Análise discriminante dos espécimes fêmeas e machos de *Asolene spixii*(d'Orbigny, 1838).

Tabela 10 - Correlação de Pearson das variáveis conchiliométricas analisadas de fêmeas e machos de *Asolene spixii spixii* (d'Orbigny, 1838) provenientes do município de Eldorado do Sul (RS). Valores maiores que 0,900 estão destacados em vermelho.

	At	Lt	Ec	Vc	Aa	LA	Ao	Lo	A1	L1	A2
At	1,000										
Lt	0,973	1,000									
Ec	0,979	0,955	1,000								
Vc	0,995	0,974	0,981	1,000							
Aa	0,971	0,942	0,941	0,970	1,000						
La	0,962	0,971	0,956	0,970	0,938	1,000					
Ao	0,907	0,887	0,897	0,917	0,887	0,861	1,000				
Lo	0,846	0,838	0,842	0,863	0,826	0,819	0,937	1,000			
A1	0,568	0,495	0,548	0,565	0,572	0,537	0,585	0,602	1,000		
L1	0,865	0,828	0,861	0,861	0,806	0,843	0,795	0,770	0,609	1,000	
A2	0,809	0,760	0,794	0,789	0,788	0,785	0,767	0,742	0,728	0,849	1,000
L2	0,867	0,867	0,844	0,870	0,814	0,854	0,823	0,803	0,496	0,952	0,783
Ao1	0,837	0,806	0,826	0,853	0,825	0,792	0,963	0,908	0,646	0,781	0,736
Ao2	0,906	0,900	0,898	0,910	0,881	0,864	0,958	0,891	0,472	0,744	0,737
VI	0,187	0,173	0,149	0,167	0,185	0,191	0,088	0,029	0,173	0,152	0,310
Lt/At	-0,260	-0,031	-0,237	-0,230	-0,258	-0,103	-0,226	-0,154	-0,366	-0,269	-0,312
Vc/At	-0,370	-0,305	-0,295	-0,281	-0,329	-0,246	-0,205	-0,126	-0,226	-0,316	-0,446
Aa/Lt	-0,707	-0,812	-0,725	-0,715	-0,575	-0,751	-0,642	-0,622	-0,197	-0,642	-0,466
La/Aa	0,467	0,554	0,520	0,490	0,329	0,635	0,377	0,405	0,167	0,510	0,363
Lo/Ao	0,118	0,145	0,138	0,138	0,105	0,168	0,123	0,458	0,192	0,182	0,159
At/Aa	0,886	0,874	0,890	0,877	0,752	0,850	0,791	0,734	0,423	0,826	0,676
A1/L1	-0,133	-0,182	-0,150	-0,138	-0,073	-0,139	-0,075	-0,030	0,640	-0,180	0,136
A2/L2	-0,197	-0,250	-0,184	-0,230	-0,144	-0,201	-0,191	-0,180	0,269	-0,252	0,247
Vc/Lt	0,108	-0,101	0,119	0,123	0,127	0,005	0,145	0,109	0,273	0,144	0,114
Ao1/Ao2	-0,243	-0,288	-0,237	-0,227	-0,223	-0,244	-0,153	-0,129	0,240	-0,061	-0,105
Ao1/Ao	-0,270	-0,314	-0,266	-0,253	-0,248	-0,264	-0,180	-0,160	0,203	-0,080	-0,132

Ao2/Ao	0,270	0,314	0,266	0,253	0,248	0,264	0,180	0,160	-0,203	0,080	0,132
(A1/L1)/(A2/L2)	-0,006	-0,029	-0,033	0,018	0,030	-0,016	0,087	0,116	0,625	-0,036	-0,023
(A2/L2)/(Vc/Lt)	-0,219	-0,231	-0,209	-0,255	-0,168	-0,204	-0,220	-0,204	0,207	-0,284	0,217
(A1/L1)/(Vc/Lt)	-0,156	-0,182	-0,176	-0,163	-0,096	-0,154	-0,103	-0,054	0,604	-0,213	0,112
VI/At	-0,883	-0,874	-0,886	-0,889	-0,860	-0,848	-0,835	-0,786	-0,398	-0,766	-0,603
VI/Lt	-0,852	-0,882	-0,860	-0,863	-0,830	-0,844	-0,810	-0,772	-0,345	-0,731	-0,560
	L2	Ao1	Ao2	VI	Lt/At	Vc/At	Aa/Lt	LA/Aa	Lo/Ao	At/Aa	A1/L1
L2	1,000										
Ao1	0,798	1,000									
Ao2	0,782	0,844	1,000								
VI	0,097	0,123	0,045	1,000							
Lt/At	-0,126	-0,255	-0,177	-0,072	1,000						
Vc/At	-0,253	-0,139	-0,257	-0,223	0,357	1,000					
Aa/Lt	-0,712	-0,559	-0,677	-0,056	-0,322	0,149	1,000				
La/Aa	0,524	0,331	0,395	0,103	0,292	0,085	-0,786	1,000			
Lo/Ao	0,198	0,119	0,118	-0,161	0,131	0,162	-0,159	0,240	1,000		
At/Aa	0,822	0,719	0,802	0,123	-0,193	-0,368	-0,863	0,661	0,104	1,000	
A1/L1	-0,277	0,004	-0,153	0,108	-0,170	-0,022	0,382	-0,257	0,070	-0,281	1,000
A2/L2	-0,395	-0,185	-0,182	0,327	-0,178	-0,234	0,423	-0,276	-0,045	-0,323	0,636
Vc/Lt	0,025	0,210	0,065	-0,029	-0,877	0,132	0,401	-0,254	-0,054	0,036	0,153
Ao1/Ao2	-0,111	0,115	-0,425	0,157	-0,126	0,198	0,299	-0,155	-0,033	-0,244	0,342
Ao1/Ao	-0,127	0,090	-0,451	0,147	-0,116	0,221	0,317	-0,155	-0,049	-0,270	0,313
Ao2/Ao	0,127	-0,090	0,451	-0,147	0,116	-0,221	-0,317	0,155	0,049	0,270	-0,313
(A1/L1)/(A2/L2)	-0,053	0,191	-0,029	-0,124	-0,082	0,192	0,148	-0,125	0,074	-0,100	0,784
(A2/L2)/(Vc/Lt)	-0,402	-0,226	-0,195	0,323	-0,004	-0,261	0,344	-0,233	-0,040	-0,331	0,599
(A1/L1)/(Vc/Lt)	-0,298	-0,030	-0,173	0,110	-0,072	-0,042	0,351	-0,247	0,073	-0,299	0,993
VI/At	-0,795	-0,756	-0,851	0,263	0,174	0,247	0,691	-0,411	-0,141	-0,808	0,278
VI/Lt	-0,784	-0,725	-0,835	0,281	0,006	0,187	0,753	-0,466	-0,162	-0,785	0,306

	A2/L2	Vc/Lt	Ao1/Ao2	Ao1/Ao	Ao2/Ao	(A1/L1)/(A2/L2)	(A2/L2)/(Vc/Lt)	(A1/L1)/(Vc/Lt t)	VI/At	VI/Lt
A2/L2	1,000									
Vc/Lt	0,054	1,000								
Ao1/Ao2	0,071	0,235	1,000							
Ao1/Ao	0,056	0,238	0,997	1,000						
Ao2/Ao	-0,056	-0,238	-0,997	-1,000	1,000					
(A1/L1)/(A2/L2)	0,034	0,175	0,404	0,378	-0,378	1,000				
(A2/L2)/(Vc/Lt)	0,980	-0,144	0,027	0,011	-0,011	-0,002	1,000			
(A1/L1)/(Vc/Lt)	0,643	0,039	0,322	0,293	-0,293	0,768	0,628	1,000		
VI/At	0,401	-0,077	0,301	0,319	-0,319	0,025	0,412	0,297	1,000	
VI/Lt	0,433	0,071	0,327	0,343	-0,343	0,035	0,414	0,309	0,986	1,000

4.3.4 Distribuição Geográfica

Asolene spixii encontra-se amplamente distribuída nos sistemas do rio da Prata, rio Uruguai e rio Paraná. Encontramos espécimes em plantações de arroz no município de Eldorado do Sul (RS), onde a maioria encontrava-se enterrada no substrato barrento. Este município, juntamente com o município de São Leopoldo (RS) (Ihering, 1898; 1919), encontram-se na bacia do Atlântico (Figura 49).

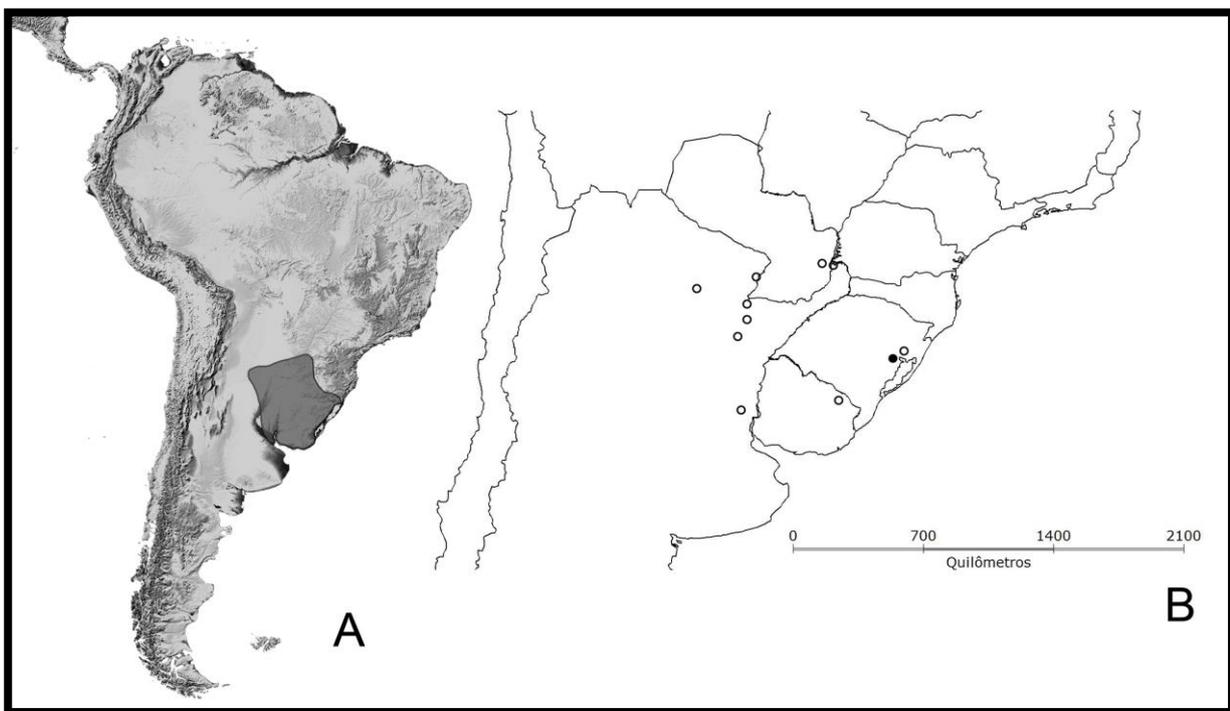


Figura 49 – A: Mapa da América do Sul com a distribuição geográfica de *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838) destacada em cinza escuro; B: ponto de coleta (●) e localidades citadas na literatura (Ihering 1898; 1919; Hylton Scott, 1958) (○).

4.4 Análise conchiliométrica de *Asolene meta* e *Asolene spixii*

Foram analisadas 39 conchas e opérculos de *Asolene meta* e 32 de *A. spixii*. A amplitude de variação de ambas as espécies para as 32 variáveis analisadas encontra-se na tabela 11.

A análise teste t de Student revelou que as variáveis altura total da concha (At), eixo columelar (Ec), volta corporal (Vc), altura da abertura (Aa), largura da abertura (La), altura do opérculo (Ao), largura do opérculo (Lo), altura da porção anterior (Ao1) e posterior (Ao2) do opérculo, número de voltas (VI), além das razões Lt/At, Vc/At, Aa/Lt, Vc/Lt, Ao1/Ao2, Ao1/Ao, Ao2/Ao, A1/L1/Vc/Lt, A2/L2/Vc/Lt, VI/Lt são significativamente diferentes entre as espécies estudadas ($p < 0.05$) (Tabela 12).

Tabela 11 – Estatística básica descritiva das conchas e dos opérculos de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) do município de Eldorado do Sul (RS).

	<i>Asolene meta</i> (n = 39)			<i>Asolene spixii</i> (n = 32)		
	Mínimo	Máximo	Med±Dp	Mínimo	Máximo	Med ± Dp
At	23,25	31,94	27,81±1,85	22,48	44,81	33,66±6,88
Lt	26,05	35,29	30,26±2,05	20,33	40,31	30,82±6,06
Vc	21,95	28,76	25,21±1,61	19,47	40,47	29,78±5,88
Ec	12,87	18,39	16,06±1,27	12,72	25,66	19,64±3,96
Aa	17,02	23,00	19,43±1,49	16,70	29,84	23,48±3,34
La	12,46	17,05	14,91±1,01	12,20	24,07	17,71±3,08
Ao	14,37	19,73	17,29±1,16	13,42	33,03	20,92±4,21
Lo	10,31	13,46	11,95±0,81	9,44	24,83	14,11±3,27
A1	1,02	2,94	1,82±0,62	1,10	3,85	1,71±0,72
L1	3,60	7,51	4,98±0,67	3,37	8,02	5,30±1,44
A2	2,27	4,11	3,14±0,46	2,17	5,24	3,33±0,92
L2	8,00	12,30	10,09±1,09	6,86	18,08	11,41±3,14
Ao1	7,88	11,67	9,52 ± 0,92	7,36	18,83 ^f	11,00±2,26
Ao2	6,36	8,86	7,76 ± 0,66	6,06	14,20	9,92±2,13
VI	2,94	4,53	3,76 ± 0,38	3,75	5,12	4,40±0,39
Lt/At	1,01	1,21	1,09±0,04	0,83	1,00	0,92±0,04
Vc/At	0,85	0,95	0,91±0,02	0,86	0,93	0,87±0,02
Aa/Lt	0,60	0,69	0,64±0,02	0,66	0,91	0,77±0,06
La/Aa	0,63	0,86	0,77±0,04	0,66	0,88	0,75±0,04
Lo/Ao	0,64	0,75	0,69±0,02	0,59	0,91	0,67±0,05
At/Aa	1,34	1,55	1,43±0,05	1,19	1,58	1,42±0,11
A1/L1	0,20	0,58	0,37±0,13	0,19	0,53	0,33±0,10
A2/L2	0,18	0,42	0,31±0,05	0,19	0,41	0,30±0,06
Vc/Lt	0,78	0,89	0,83±0,03	0,88	1,05	0,97±0,04
Ao1/Ao2	1,02	1,80	1,24±0,17	0,82	1,33	1,12±0,11
Ao1/Ao	0,50	0,64	0,55±0,03	0,45	0,57	0,53±0,03
Ao2/Ao	0,36	0,49	0,45±0,03	0,43	0,55	0,47±0,03
(A1/L1)/(A2/L2)	0,63	1,77	1,17±0,32	0,69	1,66	1,10±0,25
(A1/L1)/(Vc/Lt)	0,22	0,69	0,45±0,16	0,19	0,54	0,34±0,10
(A2/L2)/(Vc/Lt)	0,22	0,51	0,38±0,06	0,19	0,43	0,31±0,06
VI/At	0,10	0,17	0,14±0,01	0,09	0,20	0,14±0,03
VI/Lt	0,10	0,16	0,13±0,01	0,11	0,22	0,15±0,03

Tabela 12 – Análise Teste t de Student entre as variáveis conquiliométricas de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) do município de Eldorado do Sul (RS).

Variável	t	df	p
At	-5,099	69	0,000
Lt	-0,536	69	0,593
Ec	-5,335	69	0,000
Vc	-4,658	69	0,000
Aa	-6,802	69	0,000
La	-5,381	69	0,000
Ao	-5,154	69	0,000
Lo	-3,986	69	0,000
A1	0,671	69	0,505
L1	-1,236	69	0,221
A2	-1,118	69	0,268
L2	-2,456	69	0,017
Ao1	-3,714	69	0,000
Ao2	-5,985	69	0,000
VI	-7,015	69	0,000
Lt/At	16,991	69	0,000
Vc/At	4,289	69	0,000
Aa/Lt	-12,107	69	0,000
La/Aa	1,544	69	0,127
Lo/Ao	1,944	69	0,056
At/Aa	0,571	69	0,570
A1/L1	1,535	69	0,129
A2/L2	1,287	69	0,202
Vc/Lt	-16,902	69	0,000
Ao1/Ao2	3,379	69	0,001
Ao1/Ao	3,460	69	0,001
Ao2/Ao	-3,460	69	0,001
(A1/L1)/(A2/L2)	0,943	69	0,349
(A2/L2)/(Vc/Lt)t	4,634	69	0,000
(A1/L1)/(Vc/Lt)	3,270	69	0,002
VI/At	-0,055	69	0,956
VI/Lt	-4,018	69	0,000

A Análise de Escalonamento Multidimensional não apresentou agrupamentos com uma separação espacial entre as conchas das espécies analisadas (Figura 50).

De acordo com a Correlação de Pearson (Tabela 13), as variáveis At, Vc, Ec, La, L1, Ao, Ao1, Vc/Lt, A2/L2 e Ao1/Ao2 foram retiradas da análise. A Análise Discriminante apresentou resultados que diferenciam as espécies significativamente (Wilk's lambda = 0,066, df = 23,47, p < 0,001). A matriz de classificação indicou que todos os exemplares de *Asolene meta* e de *A. spixii* apresentaram identidade

morfológica da espécie, com índices de acerto de 100% (Figura 51). A matriz F resultou em um índice de diferença de 28,929 entre as espécies.

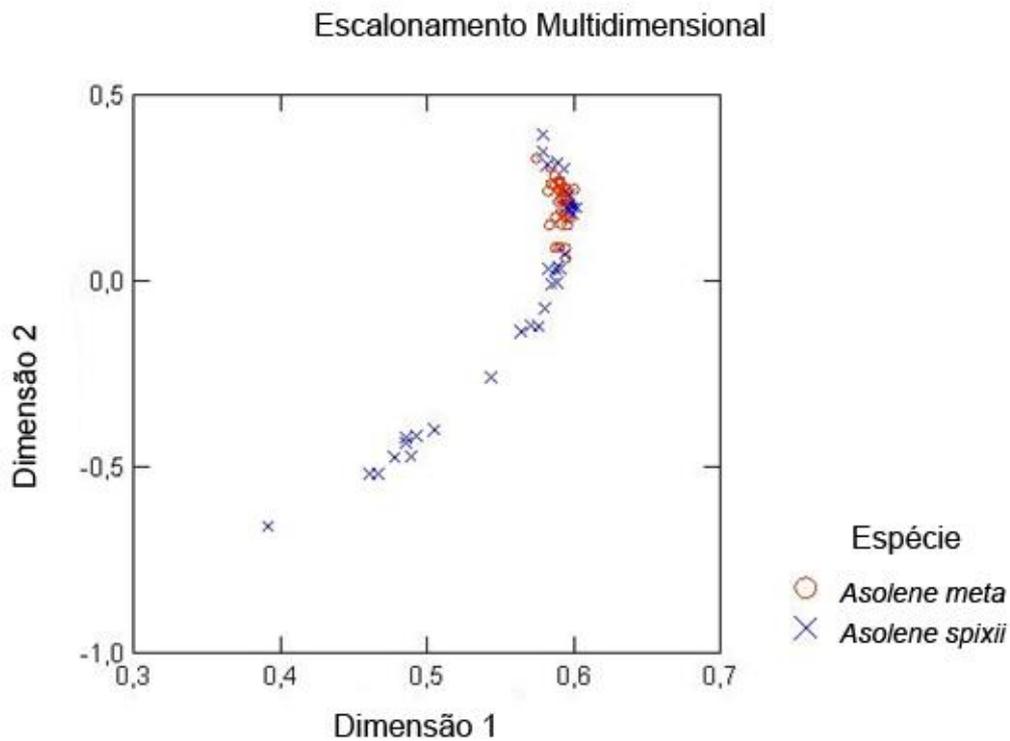


Figura 50 – Análise de Escalonamento Multidimensional a partir de dados conchiliométricos de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838).

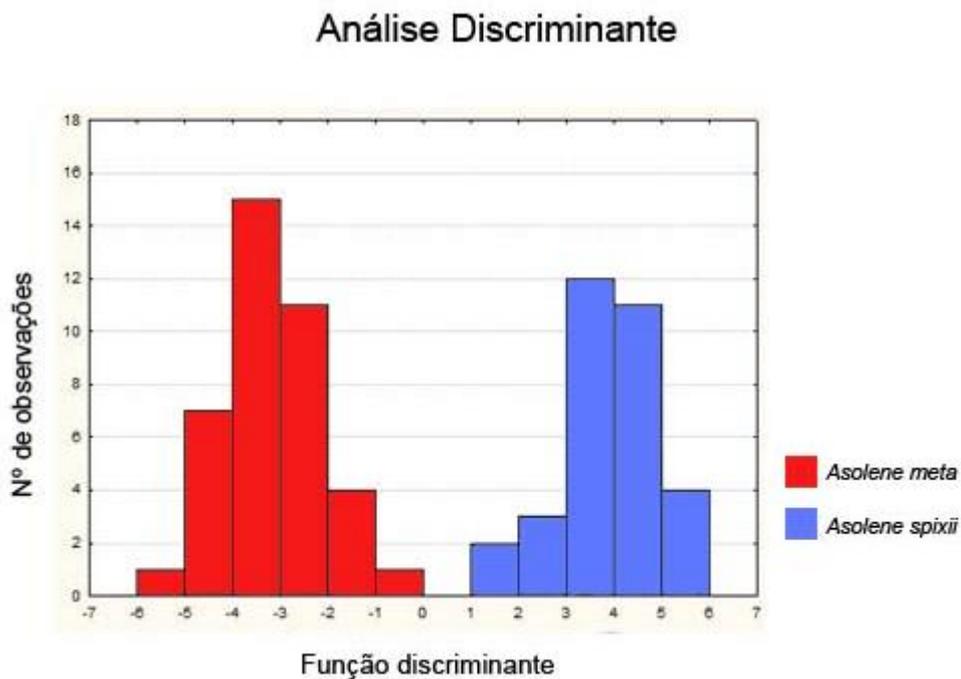


Figura 51 - Análise discriminante de *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838).

Tabela 13 – Correlação de Pearson das variáveis conquiliométricas analisadas de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA) e *Asolene spixii* (d’Orbigny, 1838) do município de Eldorado do Sul (RS). Valores iguais ou maiores que 0,900 estão destacados em vermelho.

	At	Lt	Ec	Vc	Aa	LA	Ao	Lo	A1	L1	A2
At	1,000										
Lt	0,845	1,000									
Ec	0,980	0,808	1,000								
Vc	0,992	0,868	0,973	1,000							
Aa	0,955	0,757	0,937	0,949	1,000						
La	0,955	0,825	0,941	0,958	0,930	1,000					
Ao	0,926	0,768	0,913	0,931	0,900	0,884	1,000				
Lo	0,872	0,775	0,861	0,888	0,834	0,843	0,942	1,000			
A1	0,318	0,326	0,297	0,309	0,237	0,305	0,307	0,359	1,000		
L1	0,759	0,773	0,741	0,767	0,655	0,718	0,706	0,707	0,353	1,000	
A2	0,664	0,613	0,636	0,641	0,547	0,610	0,615	0,618	0,625	0,684	1,000
L2	0,828	0,815	0,797	0,840	0,748	0,793	0,800	0,792	0,199	0,900	0,631
Ao1	0,849	0,751	0,836	0,867	0,831	0,791	0,942	0,903	0,303	0,731	0,555
Ao2	0,898	0,700	0,886	0,890	0,866	0,876	0,945	0,875	0,278	0,603	0,606
VI	0,424	0,136	0,440	0,409	0,494	0,440	0,385	0,285	-0,092	0,155	0,156
Lt/At	-0,551	-0,025	-0,574	-0,498	-0,613	-0,506	-0,535	-0,421	-0,063	-0,201	0,156
Vc/At	-0,451	-0,166	-0,434	-0,338	-0,426	-0,365	-0,345	-0,247	-0,198	-0,240	-0,407
Aa/Lt	0,146	-0,345	0,170	0,105	0,347	0,148	0,177	0,079	-0,137	-0,177	-0,105
La/Aa	0,123	0,282	0,125	0,145	-0,067	0,302	0,073	0,138	0,224	0,251	0,233
Lo/Ao	-0,039	0,133	-0,033	-0,003	-0,082	0,005	-0,057	0,277	0,172	0,097	0,078
At/Aa	0,600	0,655	0,585	0,592	0,338	0,526	0,513	0,515	0,360	0,642	0,616
A1/L1	-0,166	-0,162	-0,174	-0,182	-0,187	-0,145	-0,157	-0,108	0,796	-0,255	0,212
A2/L2	-0,210	-0,257	-0,205	-0,251	-0,247	-0,225	-0,236	-0,217	0,480	-0,273	0,414
Vc/Lt	0,510	-0,008	0,538	0,486	0,592	0,483	0,522	0,420	0,014	0,175	0,181
Ao1/Ao2	-0,235	-0,036	-0,229	-0,202	-0,219	-0,298	-0,217	-0,163	-0,093	0,041	-0,211

Ao1/Ao	-0,269	-0,074	-0,262	-0,233	-0,246	-0,316	-0,243	-0,191	-0,085	0,023	-0,227
Ao2/Ao	0,269	0,074	0,262	0,233	0,246	0,316	0,243	0,191	0,085	-0,023	0,227
(A1/L1)/(A2/L2)	-0,066	-0,036	-0,078	-0,055	-0,063	-0,024	-0,021	0,021	0,725	-0,154	-0,011
(A2/L2)/(Vc/Lt)t	-0,379	-0,222	-0,387	-0,407	-0,449	-0,385	-0,409	-0,354	0,434	-0,307	0,302
(A1/L1)/(Vc/Lt)	-0,263	-0,150	-0,276	-0,275	-0,304	-0,239	-0,262	-0,195	0,753	-0,280	0,162
VI/At	-0,681	-0,775	-0,653	-0,687	-0,579	-0,623	-0,633	-0,645	-0,353	-0,660	-0,526
VI/Lt	-0,370	-0,705	-0,336	-0,402	-0,242	-0,338	-0,334	-0,398	-0,298	-0,513	-0,368
	L2	Ao1	Ao2	VI	Lt/At	Vc/At	Aa/Lt	LA/Aa	Lo/Ao	At/Aa	A1/L1
L2	1,000										
Ao1	0,803	1,000									
Ao2	0,708	0,780	1,000								
VI	0,237	0,333	0,393	1,000							
Lt/At	-0,274	-0,419	-0,588	-0,589	1,000						
Vc/At	-0,240	-0,237	-0,413	-0,264	0,603	1,000					
Aa/Lt	-0,099	0,108	0,225	0,530	-0,826	-0,370	1,000				
La/Aa	0,209	-0,003	0,139	-0,101	0,220	0,120	-0,510	1,000			
Lo/Ao	0,070	-0,018	-0,088	-0,272	0,291	0,270	-0,296	0,236	1,000		
At/Aa	0,608	0,458	0,509	-0,016	-0,079	-0,277	-0,491	0,567	0,089	1,000	
A1/L1	-0,364	-0,188	-0,109	-0,184	0,070	-0,056	-0,034	0,102	0,112	-0,036	1,000
A2/L2	-0,434	-0,310	-0,137	-0,074	0,010	-0,190	0,013	0,025	0,017	-0,020	0,680
Vc/Lt	0,256	0,426	0,557	0,602	-0,965	-0,382	0,842	-0,226	-0,250	0,003	-0,109
Ao1/Ao2	-0,023	0,110	-0,513	-0,183	0,380	0,312	-0,246	-0,251	0,124	-0,144	-0,142
Ao1/Ao	-0,042	0,090	-0,542	-0,176	0,384	0,335	-0,232	-0,229	0,112	-0,178	-0,123
Ao2/Ao	0,042	-0,090	0,542	0,176	-0,384	-0,335	0,232	0,229	-0,112	0,178	0,123
(A1/L1)/(A2/L2)	-0,187	-0,010	-0,031	-0,170	0,073	0,083	-0,038	0,118	0,113	-0,044	0,852
(A2/L2)/(Vc/Lt)t	-0,480	-0,440	-0,333	-0,317	0,379	-0,029	-0,323	0,118	0,113	0,000	0,656
(A1/L1)/(Vc/Lt)	-0,400	-0,275	-0,219	-0,312	0,269	0,019	-0,218	0,152	0,157	-0,021	0,975
VI/At	-0,660	-0,604	-0,590	0,358	0,064	0,241	0,308	-0,209	-0,144	-0,637	0,075

VI/Lt	-0,481	-0,359	-0,273	0,589	-0,414	-0,069	0,684	-0,311	-0,265	-0,564	0,034
	A2/L2	Vc/Lt	Ao1/Ao2	Ao1/Ao	Ao2/Ao	(A1/L1)/(A2/L2)	(A2/L2)/(Vc/Lt)	(A1/L1)/(Vc/Lt)	VI/At	VI/Lt	
A2/L2	1,000										
Vc/Lt	-0,083	1,000									
Ao1/Ao2	-0,226	-0,333	1,000								
Ao1/Ao	-0,219	-0,330	0,992	1,000							
Ao2/Ao	0,219	0,330	-0,992	-1,000	1,000						
(A1/L1)/(A2/L2)	0,206	-0,062	-0,033	-0,010	0,010	1,000					
(A2/L2)/(Vc/Lt)	0,920	-0,459	-0,084	-0,078	0,078	0,218	1,000				
(A1/L1)/(Vc/Lt)	0,663	-0,315	-0,080	-0,061	0,061	0,825	0,722	1,000			
VI/At	0,191	-0,009	0,075	0,112	-0,112	-0,023	0,153	0,060	1,000		
VI/Lt	0,168	0,448	-0,100	-0,068	0,068	-0,058	-0,042	-0,075	0,879	1,000	

De acordo com a Função Discriminante (FD), gerada pela Análise Discriminante, as variáveis que mais contribuíram para a discriminação das espécies, em ordem decrescente de importância foram: Aa (4,860), Aa/Lt (4,792), Lt (4,703), A2/L2/Vc/Lt (4,175), A1/L1/A2/L2 (2,829), L2 (-2,457), A1/L1 (-2,456) e A2 (-2,302) (Tabela 14).

Tabela 14 – Função Discriminante das variáveis conchiliométricas de *Asolene meta* (Ihering, 1915) provenientes do município da Barra (BA) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838) do município de Eldorado do Sul (RS).

Variável	FD
Lt	4,703
Aa	-4,860
Lo	-1,392
A1	0,240
A2	-2,302
L2	2,457
Ao2	2,139
VI	0,630
Lt/At	-2,590
Vc/At	-0,576
Aa/Lt	4,792
La/Aa	0,599
Lo/Ao	0,616
At/Aa	-0,254
A1/L1	-2,456
Ao1/Ao	0,523
Ao2/Ao	0,428
(A1/L1)/(A2/L2)	2,829
(A2/L2)/(Vc/Lt)t	4,175
(A1/L1)/(Vc/Lt)	-1,966
VI/At	-1,945
VI/Lt	1,562

4.5 Sinopse

Tabela 15 – Sumário das diferenças morfológicas entre *Asolene meta* (Ihering, 1915) e *Asolene spixii* (d'Orbigny, 1838).

	<i>Asolene meta</i>	<i>Asolene spixii</i>
Concha		
Altura X largura (média)	27,81 X 30,26 mm	33,66 X 30,82 mm
Abertura	Oval	Oval alongada
Nº de voltas	3-4	4-5
Gânglio bucal	Quatro nervos	Cinco nervos
Rim anterior	Alongado	Triangular
Bainha do pênis		
Glândula apical	Ocupa 1/4 da bainha do pênis	Ocupa 1/3 da bainha do pênis
Glândula mediana	Centralizada	Localizada na base da bainha

5 DISCUSSÃO

O holótipo de *Asolene meta* encontra-se depositado na Coleção de Moluscos do Museu Nacional/UFRJ com o número de tombo MNRJ 12861 (Figura 10). Simone (2006) referiu-se a este holótipo como *Pomacea meta*, registrado sob o número MNRJ 34350. No entanto, de acordo com informação pessoal do atual curador (Dr. Alexandre Dias Pimenta), esta numeração foi alterada para MNRJ 12861.

Com relação à posição taxonômica, as características da concha, oviposição e análises moleculares confirmaram que esta espécie encontra-se incluída em *Asolene*, corroborando com o proposto por Thiengo *et al.* (2005) e Hayes (2009).

Com relação à *A. spixii*, Simone (2006) informou que os sintipos desta espécie encontram-se depositados no Museu de História Natural de Londres (BNHM 1854.12.4.327; BNHM 20020689). Entretanto, Cowie & Héros (2012) informaram que os sintipos estão depositados no Museu de História Natural de Paris (MNHN 4523; MNHN 4524). Ainda com relação à Cowie & Héros (2012), estes autores referiram-se à concha depositada sob o número MNHN 4523 como lectótipo de *A. spixii* na legenda da Figura 7G (pg. 815). No entanto, segundo o artigo 74.7.3 do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, 1999b), uma declaração no corpo do trabalho deve ser feita ao se designar um lectótipo, onde apenas citar um espécime como lectótipo é insuficiente, conforme foi realizado em Cowie & Héros (2012).

Em ambas as espécies a coloração e a ornamentação da concha variam intraespecificamente, mas geralmente apresentam concha amarela a castanha com bandas espirais castanha escuras e umbílico largo e profundo. No entanto, algumas diferenças foram notadas: a abertura é mais alongada em *Asolene spixii* do que em *A. meta* e a concha de *A. spixii* geralmente é maior, assim como o número de voltas. Embora as espécies não tenham demonstrado um agrupamento espacial na Análise de Escalonamento Multidimensional (Figura 50), *Asolene meta* formou um agrupamento mais restrito, enquanto os espécimes de *A. spixii* ficaram mais esparsados, com alguns sobrepondo o agrupamento formado por *A. meta*. Nas análises de Teste t e Análise Discriminante, essas espécies foram significativamente diferentes, com separação total entre *A. meta* e *A. spixii*, conforme observado no gráfico gerado pela Análise Discriminante (Figura 51).

Neste sentido, a altura da abertura foi a variável que mais contribuiu na diferenciação das espécies, refletindo a diferença na forma da abertura. Além disso, esta variável mostrou-se altamente correlacionada com outras referentes ao tamanho do animal, como a altura total da concha. Além da altura da abertura (Aa), a largura total da concha (Lt), a relação entre essas duas variáveis (Aa/Lt) e a relação entre a razão da altura e largura da segunda volta com a razão da volta corporal com a largura total da concha ($(A2/L2)/(Vc/Lt)$) estão entre as variáveis que mais contribuíram para a distinção das espécies (Tabela 12). A largura total da concha, maior em *A. spixii*, pode ser explicada devido ao maior tamanho destes animais em relação aos espécimes de *A. meta*. Desta forma, os índices conchiliométricos podem ser mais úteis na distinção das espécies com exemplares de tamanhos similares, onde o índice Aa/Lt é maior em *A. spixii* do que em *A. meta*, porém a relação entre $(A2/L2)/(Vc/Lt)$ é maior em *A. meta*. Além disso, as conchas também são significativamente diferentes quanto ao número de voltas, onde *A. spixii* tem mais voltas do que *A. meta*, mesmo em exemplares de tamanhos similares.

Não foi observado dimorfismo sexual no opérculo e na concha de *A. meta* e *A. spixii*. Tal observação é corroborada com a Análise Discriminante, que não revelou diferenças significativas entre fêmeas e machos de ambas as espécies, e a Análise de Escalonamento Multidimensional, onde não houve agrupamento espacial entre os grupos analisados. No entanto, o Teste t de Student revelou que as variáveis Vc/At e Lo/Ao são estatisticamente diferentes entre machos e fêmeas de *Asolene meta*, enquanto as variáveis $A1$ e Lo foram significativamente diferentes entre os machos e fêmeas de *A. spixii*. Ao contrário do observado em *A. meta*, o gráfico gerado pela Análise Discriminante de *A. spixii* mostrou uma diferenciação parcial entre fêmeas e machos, o que deve ser confirmado por estudos mais refinados. Com relação a outros ampulariídeos, Cazzaniga (1990) observou a ocorrência de dimorfismo sexual no formato do opérculo e da abertura da concha em *P. canaliculata*, com diferença significativa na razão entre a largura e altura do opérculo. O autor comenta que isso deve ocorrer devido ao grande volume da bainha do pênis desta espécie, com possível ocorrência em outros ampulariídeos. Hayes *et al.* (2012) também apontaram esse dimorfismo em *P. maculata*. Aparentemente não há dimorfismo sexual em *A. meta* e *A. spixii* devido ao volume da bainha do pênis ser bem menor do que em *Pomacea* spp.

Com relação à morfologia do animal, a anatomia externa, a cavidade do manto, o sistema nervoso, o coração e o sistema digestório de *A. meta* e *A. spixii*

seguem o mesmo padrão dos demais ampulariídeos. No entanto, Berthold (1991) demonstrou que algumas estruturas podem apresentar valor taxonômico em nível de gênero, como o coração e o estômago. Comparativamente, o formato do coração de *A. meta* e *A. spixii* (Figuras 21, 40) são semelhantes aos de *Afropomus* e *Marisa*, sendo a ampola aparentemente mais ovalada. Já em *Pomacea* spp. a ampola é triangular. Embora este autor não tenha estudado *Asolene*, tais diferenças indicam que a ampola pode ser utilizada na discriminação dos gêneros, uma vez que em *Asolene* é oval alongada.

Quanto ao sistema digestório, a rádula de *A. meta* e *A. spixii* são semelhantes entre si (Figuras 18, 37). Embora a cúspide central do dente central de *A. meta* varie de lanceolada a triangular, tanto em *A. meta* quanto em *A. spixii* essa cúspide apresenta uma proeminência arredondada na ponta. Comparativamente, a rádula de *A. platae* estudada por Martin & Negrete (2007) é similar a de *A. meta* e de *A. spixii*, no entanto a cúspide central do dente central de *A. platae* aparentemente apresenta a ponta afilada. O valor da rádula, com ênfase no dente central, como caráter diagnóstico na diferenciação dos gêneros *Asolene*, *Felipponea* e *Pomacea* é proposto pelos autores (*op. cit.*), que ressaltaram inclusive seu valor diagnóstico na diferenciação das espécies de *Pomacea*.

Ainda com relação ao sistema digestório, foram observadas diferenças no escudo gástrico do estômago entre as espécies estudadas no presente trabalho, sendo bem desenvolvido em *A. meta* (Figuras 17C-D), porém em alguns exemplares de *A. spixii* é pouco desenvolvido ou ausente (Figuras 36C-D). Esta variação intraespecífica de *A. spixii* descaracteriza esta diferença entre as espécies como valor taxonômico, podendo ser uma plasticidade fenotípica de *A. spixii*. Com relação aos gêneros neotropicais estudados por Berthold (1991), o escudo gástrico de *A. meta* e *A. spixii* é mais semelhante ao de *Marisa cornuarietis*, uma vez que nestas três espécies o escudo gástrico é mais alongado do que o de *Pomacea canaliculata*. Além disso, a bolsa gástrica de *A. meta* e *A. spixii* é formada por duas depressões próximas entre si, assim como *M. cornuarietis*, diferindo de *P. canaliculata*, onde a bolsa gástrica é formada por uma depressão. Desta forma, tanto o escudo gástrico quanto a bolsa gástrica podem apresentar valor taxonômico em nível de gênero, conforme mostrado por Berthold (*op. cit.*).

Dentre as diferenças observadas entre *A. meta* e *A. spixii*, o formato externo do rim anterior (arredondado em *A. meta* e triangular em *A. spixii*) é a mais destacada (Figuras 20A, 39A). Já a anatomia interna do rim é semelhante entre as

espécies. Michelson (1961) e Berthold (1991) propuseram o rim como um dos caracteres promissores para o diagnóstico e com valor taxonômico em nível de gênero em Ampullariidae. Já Hayes *et al.* (2012) apontaram o rim anterior como um dos caracteres que diferem em *P. maculata* e *P. canaliculata*, sendo menor em *P. maculata*. A diferença observada entre o rim anterior das espécies no presente estudo reforça o possível valor taxonômico em nível de espécie desta estrutura, uma vez que a maioria dos trabalhos morfológicos em Ampullariidae são voltados para o sistema reprodutor masculino.

O formato da bainha do pênis e a posição das glândulas associadas são similares entre *A. meta* e *A. spixii*, assim como a composição da glândula basal externa. No entanto, a glândula apical é maior e mais volumosa em *A. spixii*, inclusive nos espécimes de tamanho aproximado ao de *A. meta* (Figuras 23, 24B, 45A-B). Martin (1984) descreveu uma glândula externa à bainha do pênis em *A. platae*, provavelmente se referindo a glândula basal externa, porém esquematizou duas glândulas internas que aparentemente ocupam a mesma posição em *A. meta* e *A. spixii*. Tillier (1980) caracterizou a bainha do pênis de *A. granulosa* e *A. crassa*, as quais possuem também duas glândulas na mesma posição, mas seus formatos são aparentemente distintos. Uma glândula mediana em posição semelhante foi observada por Hayes (2009) em *Felipponea neritiniformis*, *Pomacea sordida* (Swainson, 1823) e *Pomacea catemacensis* (Sowerby, 1875). Ainda segundo este autor, a glândula basal externa é característica dos ampulariídeos neotropicais.

A glândula de albúmen é alaranjada, tanto em *A. meta* quanto em *A. spixii*, porém Martin (1988) descreve a glândula de albumen de *A. platae* com coloração amarela esbranquiçada. Uma vez que o animal fixado perde rapidamente a coloração original dos tecidos, a cor descrita por Martin pode ser equivocada. Os dados morfológicos obtidos até o presente não revelaram diferenças entre ambas as espécies aqui estudadas.

Os ovos de *A. meta* e *A. spixii* são semelhantes quanto à morfologia e ao local de oviposição, abaixo do nível da água (Figuras 28A-B, 46A-D). A descrição da desova *A. pulchella* por Boneto & Draco (1966) e Tiecher *et al.* (2013) é semelhante a de ambas as espécies aqui estudadas, diferindo apenas na cor amarelada relatada por Tiecher *et al.* (*op. cit.*). Hayes (2009) discute que as características do ovo e local de oviposição geram importantes subsídios para o entendimento do processo evolutivo de Ampullariidae. Neste aspecto, o autor comentou que dentre os gêneros neotropicais, os mais basais depositam seus ovos em massas gelatinosas dentro da

água (*Marisa*, *Asolene* e *Felipponea*), enquanto espécies de *Pomacea*, o gênero mais diversificado, deposita seus ovos fora da água.

Asolene meta tem sua distribuição restrita à área da bacia do São Francisco e é a única espécie deste gênero com ocorrência conhecida no Nordeste do Brasil. Esta bacia ocupa uma extensa área, sendo dividida em quatro regiões: Alto São Francisco, Médio São Francisco, SubMédio São Francisco e Baixo São Francisco, distintas ecológica e biogeograficamente. Já *Asolene spixii* apresenta uma distribuição mais ampla, porém restrita ao sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. Embora neste trabalho não tenha sido possível realizar um levantamento em um maior número de coleções científicas, acreditamos que estas distribuições restritas podem ser reflexo da taxonomia confusa de *Asolene* resultante da falta de trabalhos morfológicos e taxonômicos, uma vez que devido a concha globosa, espécies de *Asolene* podem ser facilmente confundidas com espécies de *Pomacea*.

Nos modelos de divergência genética utilizados nesse trabalho, *A. meta* se mostrou mais intimamente relacionada com *A. spixii* do que com *A. pulchella* ou *A. platae*. Entretanto, *A. spixii* se mostrou igualmente distante de *A. pulchella*, *A. platae* e *A. meta* (aproximadamente 5%). A maior distância observada foi entre *A. meta* e *M. cornuarietis* (em torno de 13%). Esses dados corroboram com o estudo filogenético de Ampullariidae realizado por Hayes (2009), o qual demonstra que *A. platae*, *A. spixii*, *A. pulchella* e *A. meta* encontram-se incluídas no mesmo clado, formado ainda por *Marisa* spp. e *Felipponea iheringi*, sendo *A. meta* e *A. spixii* espécies irmãs. Embora nossas análises moleculares tenham sido incipientes, acreditamos que fornecerão subsídios a futuros estudos filogenéticos sobre *Asolene*.

6 CONCLUSÕES

Asolene meta e *A. spixii* podem ser distinguidas conquiliologicamente, principalmente pela abertura da concha.

Dimorfismo sexual na concha não foi observado em ambas as espécies.

Destacamos que o conjunto das diferenças morfológicas aqui observadas, como o formato do rim anterior, o tamanho da glândula apical da bainha do pênis, a abertura e número de voltas da concha, se mostrou eficiente para a diferenciação das espécies.

Dentre os caracteres diagnósticos da morfologia interna, ressaltamos o rim anterior pela sua pronta visualização, sem necessidade de dissecção.

As semelhanças no formato da ampola, no dente central da rádula, no estômago e nas características da desova e do ovo, podem auxiliar no futuro delineamento dos caracteres do gênero *Asolene*, além dos padrões evolutivos de Ampullariidae.

Os dados moleculares observados neste trabalho, ainda que iniciais, demonstraram que as espécies estudadas são distintas, porém próximas geneticamente dentro do grupo.

Este estudo apresentou a primeira descrições morfológicas de ambas as espécies, destacando o estudo de topotipos de *A. meta*, além da primeira descrição da desova desta espécie.

Dessa forma, esperamos contribuir com dados adicionais ao estudo da sistemática de Ampullariidae, bem como de suas relações de parentesco, além de gerar subsídios para uma futura revisão do gênero *Asolene*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, R.S.; PIERI, O.S.; THIENGO, S.C.; FERNANDEZ M.A.; ABÍLIO F.J.P.; SCHAL, V.T.; DEBERDT, A.J.; YAMADA, H.T.; MARCELINO, J.M.R.; MENEZES, M.J.R.; DANTAS, T.C.M. Vigilância e controle de moluscos de importância médica. In: Amaral, R.S., Thiengo, S.C., Pieri, O.S. (org.) *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica – diretrizes técnicas*. Editora do Ministério da Saúde, Brasília, 2007. P 85-110.

ANDERSON, T.W.; DARLING, D.A.. Asymptotic theory of certain "goodness-of-fit" criteria based on stochastic processes. *Annals of Mathematical Statistics*, **23**: 193–212. 1952. [doi:10.1214/aoms/1177729437](https://doi.org/10.1214/aoms/1177729437).

ANDREWS E. B. The functional anatomy and histology of the reproductive system of some pilid gastropod molluscs. *Proc Malac Soc*, **36**: 121-140. 1964.

----- The functional anatomy of the mantle cavity, kidney and blood system of some pilid gastropods (Prosobranchia). *Journal of Zoology* **146**: 70–94. 1965.

ARANGO, H.G. *Bioestatística: Teórica e Computacional*. Editora Guanaraba Koogan, Rio de Janeiro, 2005. 423p.

BERTHOLD, T. Vergleichende Anatomie, Phylogenie und Historische Biogeographie der Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda). *Abhandlungen des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*, **29**: 1-256. 1991.

BIELER R. Ampullariid phylogeny – book review and cladistic re-analysis. *The Veliger* **36**: 291–299. 1993.

BONETTO A. A.; DRAGO I. D. E. Notas Malacológicas IV. 1) Moluscos Paranenses en Aguas Uruguayas y del Sur de Brasil. 2) Notas sobre Desoves de Algunos Gasteropodos Dulceacuicolas. *Physis* **26**: 121-127. 1966.

BURCH, J. B. *How to know the eastern land snail*. W.M.C. Brow Publishers. Dubuque, Iowa, 1962. 214 pp.

BURELA S, MARTÍN P. R. Nuptial feeding in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Malacologia* **49**: 465–470. 2007.

CAZZANIGA N. J. *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1801) en Catamarca y un comentario sobre *Ampullaria catamarcensis* Sowerby, 1874 (Gastropoda Ampullariidae). *Iheringia, sér Zool*, **66**: 43-68. 1987.

----- Sexual dimorphism in *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *The Veliger* **33** (4): 384-388. 1990.

----- Old species and new concepts in the taxonomy of *Pomacea* (Gastropoda: Ampullariidae). *Biocell* **26**: 71–81. 2002.

COWIE R. H. Case 2996. *Pila* Röding, 1798 and *Pomacea* Perry, 1810 (Mollusca, Gastropoda): proposed placement on the Official List, and Ampullariidae Gray, 1824: proposed confirmation as the nomenclaturally valid synonym of Pilidae Preston, 1915. *Bull Zool Nomencl*, **54** (2): 83-88. 1997.

----- Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: Their biology, impacts and management. In: G. M. Barker, ed., *Molluscs as Crop Pests*. CABI Publishing, Wallingford, U.K, 2002. Pp. 145-192.

COWIE R. H., HAYES K. A.; THIENGO S. C. What are apple snails? Confused Taxonomy and Some Preliminary Resolution. In: Joshi RC, Sebastian LS (eds). *Global Advances in Ecology and Management of Golden Apple Snails*. City of Muñoz, Nueva Ecija, Philippines: Philippine Rice Research Institute, 2006. pp 3-24.

COWIE, R. H.; HÉROS, V. Annotated catalogue of the types of Ampullariidae (Mollusca, Gastropoda) in the Muséum national d'Histoire naturelle, Paris, with lectotype designations. *Zoosystema*, **34** (4): 793-824. 2013.

COWIE R. H.; THIENGO S. C. The apple snails of the Americas (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae: *Asolene*, *Felipponea*, *Marisa*, *Pomacea*, *Pomella*): a nomenclatural and type catalog. *Malacologia* **45**: 41-100. 2003.

DEMIAN E. S., IBRAHIM A. M. Sexual dimorphism and sex ratio in the snail *Marisa cornuarietis* (L.). *Zool Soc Egypt Bull*, **24**: 52-63. 1972.

d'ORBIGNY, A. D. *Voyage dans l'Amérique Méridionale (le Brésil, la république orientale de l'Uruguay, la république argentine, la Patagonie, la république du Chili, la république de Bolivie, la république du Pérou), exécuté pendant les années 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832 et 1833*. Tome cinquième. 3 partie: mollusques. Bertrand P, editor. Paris. 1835-1847.

ENGELMAN, K. *SYSTAT 7.0, 7^a Edition*. SPSS Inc Press, Chicago, 1997. 421p.

FERNANDEZ M.A., THIENGO S.C., AMARAL R.S. Técnicas Malacológicas. *In: AMARAL RS, THIENGO SC, PIERI OS, editors. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Médica: Diretrizes técnicas*. 2 ed. p. 43-70. 2007.

FOLMER O, BLACK M, HOEH 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* **3**: 294–299. 1994.

FUKUDA H, HAGA T, TATARA Y. *Niku-nuki*: a useful method for anatomical and DNA studies on shell-bearing molluscs. *Zoosymposia* **1**: 15–38. 2008.

GOMORI, G. Silver Impregnation of Reticulum in Paraffin Sections. *Amer. J. Path.*, **13**: 993-1.002. 1937.

GRAY, J. E. Zoological notices. On some new species of Ampullariidae. *Philosophical Magazine and Journal*, **63** (312): 276-277. 1824.

----- A list of the genera of Recent Mollusca, their synonyma and types. *Proceedings of the Zoological Society of London* **15**: 129-219. 1847.

HAYES K.A.; JOSHI R. C.; THIENGO S. C.; COWIE R. H. Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions* **14**(4):701-12. 2008.

HAYES K. A. *Evolution, molecular systematics and invasion biology of Ampullariidae*. 218 f. Tese (Doutorado em Zoologia: Ecologia, Evolução e Biologia da Conservação). Honolulu, HI: University of Hawaii; 2009.

HAYES K. A., COWIE R. H., THIENGO S. C. A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **98**: 61-76. 2009a

HAYES K.A.; COWIE R.H.; JØRGENSEN A.; SCHULTHEIß R.; ALBRECHT C.; THIENGO S.C. Molluscan Models in Evolutionary Biology: Apple Snails (Gastropoda: Ampullariidae) as a System for Addressing Fundamental Questions. *American Malacological Bulletin*.**27**(1-2):47-58. 2009b.

HAYES K.A.; COWIE R.H.; THIENGO S.C.; STRONG E.E. Comparing apples to apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae (Caenogastropoda). *Biological Journal of the Linnean Society* **166**: 723-753. 2012.

HERRMANNSEN, A. N. *Indicis generum malacozoorum primordia. Nomina subgenerum, generum, familiarum, tribuum, ordinum, classium; adjectis auctoribus, temporibus, locis systematicis, atque literariis, etymis, synonymis. Praetermittuntur cirripedia, Tunicata et Rhizopoda*. Vol. I. T. Fischer, Cassalis (= Cassel). 1846-1849. xxvii + 637 pp.

HYLTON SCOTT M. Estudio Morfológico y Taxonómico de los Ampullaridos de la República Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales Ciências Zoológicas* **3**: 231-333. 1958.

ICZN. Opinion 1913. *Pila* Röding, 1798 and *Pomacea* Perry, 1810 (Mollusca, Gastropoda): placed on the Official List, and Ampullariidae Gray, 1824: confirmed as

the nomenclaturally valid synonym of Pilidae Preston, 1915. *Bull. Zool Nomencl*, **56** (1): 74-76. 1999^a

ICZN. *International Code of Zoological Nomenclature*. International Trust for Zoological Nomenclature, London. 1999b. <http://iczn.org/iczn/index.jsp>.

IHERING H.V. As especies de *Ampullaria* da Republica Argentina. *Annales del Museo Nacional de Buenos Aires*, **4**: 47-52. 1898.

----- *Annexo N. 5. Molluscos*. Rio de Janeiro: Comissão de Linhas Telegraphicas Estrategicas de Matto-Grosso ao Amazonas; 1915.

----- Las especies de *Ampullaria* de la Argentina y la historia del rio de la Plata. In: *Primera reunion de la sociedad Argentina de ciencias naturales. Tucuman*, 116. Imprenta y Casa Editora "Coni", Buenos Aires, 1919. pp 329-350.

JØRGENSEN A, KRISTENSEN TK, MADSEN H. A molecular phylogeny of apple snails (Gastropoda, Caenogastropoda, Ampullariidae) with an emphasis on African species. *Zoologica Scripta* **37**: 245–252. 2008.

KREBS, J.C. *Ecological Methodology*. Benjamin Cummings, New York, 1999. 620p.

LEV, R.; SPICER, S. S. Specific Staining of Sulfate Groups with Alcian Blue at Low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**: 309. 1964

LOPES H. Sôbre duas espécies do gênero *Pomacea* Perry, com um estudo da genitália em ambos os sexos. *Rev Brasil Biol*, **15** (2): 203-210. 1955.

----- Sobre *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mesogastropoda, Architaenioglossa, Mollusca). *Revista Brasileira de Biologia* **16**: 375–380. 1956a.

----- Sôbre *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Mesogastropoda, Architaenioglossa, Mollusca). *Rev Brasil Biol*, **16** (4): 535-542. 1956b.

LV S, ZHANG Y, LIU H-X, HU L, YANG K, ET AL. Invasive Snails and an Emerging Infectious Disease: Results from the First National Survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Negl Trop Dis*, **3** (2): e368. doi:10.1371/journal.pntd.0000368. 2009

MARTIN S. M. Estudio del Complejo Penial de *Asolene platae* (Maton) (Mollusca: Prosobranchia, Ampullariidae). *Neotropica* **30**: 107-110. 1984.

----- Ciclo Reproductivo de *Asolene (A) platae* Maton (Gastropoda: Ampullariidae) del Arroyo Miguelin (Punta Lara, Buenos Aires). *Neotropica* **33**: 19-28. 1987.

----- Morfología Genital de *Asolene (Asolene) platae* Maton (Mollusca: Gastropoda: Ampullariidae). *Revista de La Asociacion de Ciencias Naturales del Litoral* **19**: 209-213. 1988.

MARTIN S. M.; NEGRETE L. H. L. Radular Ultrastructure of South American Ampullariidae (Gastropoda: Prosobranchia). *Brazilian Journal of Biology* **67**: 721-726. 2007.

MCMANUS, J. F. A. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid. *Nature*, **158**: 202. 1946.

MICHELSON E.H. On the generic limits in the family Pilidae (Prosobranchia: Mollusca). *Breviora* **133**: 1-10. 1961.

PHILIPPI RA. Die Gattung *Ampullaria*. In Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen. In: Küster HC, ed. *Systematisches Conchylien-Cabinet von Martini und Chemnitz. Neu herausgegeben und vervollständigt. Ersten Bandes zwanzigste Abtheilung*. Nürnberg: Bauer & Raspe, 49–74. pls. 18–21. 1851–1852.

POINTIER, J. P.; JOURDANE, J. Biological control of the snails hosts of schistosomiasis in areas of low transmission: the example of the Caribbean area. *Acta Tropica* **77**: 53-60. 2000.

PRESTON, H. B. *The fauna of British India, including Ceylon and Burma*. Mollusca, vol. 4 (Freshwater Gastropoda & Pelecypoda). Xiv, 244 pp; Taylor & Francis, London, 1915.

SCHILITZ A.G. Morfologia da concha e do sistema reprodutor para a taxonomia de *Asolene meta* (Ihering, 1915) (Gastropoda: Ampullariidae). Monografia (Especialização em Malacologia Médica). Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2010.

SCHULTE-OEHLMANN, U. BETTIN, C., FIORONI, P., OEHLMANN, J. STROBEN, E. *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia): a potential TBT bioindicator for freshwater environments. *Ecotoxicology*, **4**: 372-384.. 1995.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, **52**(3-4): 591–611. 1965. doi:[10.1093/biomet/52.3-4.59](https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.59)

SIMONE L.R.L. *Land and freshwater molluscs of Brazil*. EGB, Fapesp, São Paulo. 2006. 390 pp.

SMITH J. W. Ampullariidae pathways. In: Josch RC, Sebastina LS editors. *Global advances in ecology and management of golden apple snails*. Nueva Ecija: Philippine Rice Research Institute, 2006. p. 113-120.

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. *Mol. Biol. Evol.* **28**(10): 2731–2739. 2011.

THIELE, J. *Handbuch der Systematischen Weichtierkunde*. Ester Band. Jena. vol 1. 1931. 594 pp.

THIENGO SC. Observations on the morphology of *Pomacea lineata* (Spix, 1827) (Mollusca, Ampullariidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **82**: 563–570. 1987.

----- On *Pomacea sordida* (Swainson, 1823) (Prosobranchia, Ampullariidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **84**: 351-355. 1989.

----- Família Pilidae Connoly, 1927 (Ampullariidae Gray, 1824). In: BARBOSA FS, editor. *Tópicos em Malacologia Médica*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 1995.

THIENGO SC, BORDA CE, ARAÚJO JLB. On *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) (Mollusca; Pilidae: Ampullariidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **88**: 67-71. 1993.

THIENGO S.C.; SOARES A.A.; FERNANDEZ M.A. Sobre *Asolene meta* (Ihering, 1915) da Região Arqueológica de Central, Bahia, Brasil (Gastropoda: Ampullariidae). Congresso Latino-americano de Malacología; 2005; Panamá. 2005.

THIENGO S.C.; MALDONADO, A.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.L.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; OLIVEIRA, A.P.M; SIMÕES, R.O.; FERNANDEZ, M.A.; LANFREDI, R.M. The giant African snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of eosinophilic meningoencephalitis in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Tropica*, **115**: 194-199. 2010.

THIENGO S. C.; HAYES K. A.; MATTOS A. C.; FERNANDEZ M. A.; COWIE R. H. A. Família Ampullariidae no Brasil: Aspectos Morfológicos, Biológicos e Taxonômicos. In *Tópicos em Malacologia, Ecos do XIX Encontro Brasileiro de Malacologia*, pp 95-111. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Malacologia, 2011.

TIECHER M. J., BURELA S., MARTÍN P. R. Mating behavior, egg laying, and embryonic development in the South American apple snail *Asolene pulchella* (Ampullariidae, Caenogastropoda). *Invertebrate Reproduction & Development*. DOI:10.1080/07924259.2013.793624. 2013.

TILLIER S. *Gastéropodes Terrestres et Fluviales de Guyane Française*, Paris: Mémoires du Muséum National D'histoire Naturelle. 1980.

TITLEY-O'NEAL, C. P.; KELLY, R. M.; MACDONALD, B. A. The effects of organotin on female gastropods. *Journal of Environmental Monitoring*, **13**: 2360-2388. 2011.

TROSCHEL, F. H. Mollusca. In: Schomburgk R., *Reisen in Britisch-Guiana in den Jahren 1840-1844. Im Auftrag Sr Mäjestat des Königs von Preussen. Nebst einer Fauna und Flora Guiana's nach Vorlagen. Mit Abbildungen und einer Karte von Britisch-Guiana. Dritter Theil.* J.J. Weber, Leipzig. 1848. Pp. 545-551.

ZAR, J.H. *Bioestatistical Analysis.* Prentice-Hall, New Jersey, 1998. 663p.