

**BIOMETRIA DA RÁDULA E PADRÃO DOS FRAGMENTOS
DE RESTRIÇÃO DO DNA DE ESPÉCIES DO GÊNERO
Phyllocaulis
(MOLLUSCA: GASTROPODA: VERONICELLIDAE)**

Georgina Gonçalves Mansur

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS - ZOOLOGIA

**BIOMETRIA DA RÁDULA E PADRÃO DOS FRAGMENTOS
DE RESTRIÇÃO DO DNA DE ESPÉCIES DO GÊNERO
Phyllocaulis
(MOLLUSCA: GASTROPODA: VERONICELLIDAE)**

Georgina Gonçalves Mansur
Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira
Prof. Dr. José Willibaldo Thomé

TESE DE DOUTORADO
PORTO ALEGRE - RS - BRASIL
2001

SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Resumo Geral	iv
Abstract	v
1. Apresentação	vi
2. Artigo 1: Biometria da rádula no gênero <i>Phyllocaulis</i> (Mollusca: Gastropoda: Veronicellidae)	
2.1. Resumo	01
2.2. Abstract	02
2.3. Introdução	03
2.4. Materiais e Métodos	06
2.5. Resultados e Discussão	11
2.6. Referências	22
3. Artigo 2: Padrão dos fragmentos de restrição em espécies do gênero <i>Phyllocaulis</i> (Mollusca: Gastropoda: Veronicellidae) ocorrentes no Brasil	
2.1. Resumo	01
2.2. Abstract	02
2.3. Introdução	03
2.4. Materiais e Métodos	07
2.5. Resultados e Discussão	11
2.6. Referências	17
4. Conclusões	vii
5. Apêndices	ix

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos Professores Drs. Jarbas e Thomé, pelo apoio e incentivo durante a construção do trabalho;

à estagiária Carolina Giacomet, pela parceria;

aos colegas e amigos dos laboratórios de Malacologia, Biofísica, Geriatria e Gerontologia, Dinâmica Populacional, Parasitologia, Toxicologia, Centro de Controle de Qualidade da PUCRS, HCPA, Biogen além dos laboratórios do Instituto de Zoologia da Universidade de Tübingen e Laboratório de Bioquímica da Universidade do Fundão (RJ);

à Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul e ao Museu de Ciências Biológicas e Centro de Microscopia e Micronálise, da PUCRS;

às amigas e bibliotecárias Mara Kuse e Cíntia Gräeff;

aos professores Clarice Alho, Ivana Cruz, Sandro Bonatto, Gervásio Carvalho e Roberto Reis;

à Luiza e Josi, secretárias do PPG-Biociências da PUCRS;

às amigas Rosane Silva, Suzete Gomes, Guacira Gil, Maria Lúcia Antunes e Marli Custódio de Abreu pela leitura cuidadosa e sugestões;

à CAPES, pelo financiamento;

à minha família pelo incentivo, compreensão pela ausência e apoio financeiro.

RESUMO

BIOMETRIA DE RÁDULAS E PADRÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Phyllocaulis* (MOLLUSCA: GASTROPODA: VERONICELLIDAE)

O gênero *Phyllocaulis* Colosi, 1922 vem sendo diferenciado em cinco espécies, segundo análises morfológicas: *P. variegatus*, *P. tuberculosus*, *P. boraceiensis*, *P. soleiformis* e *P. gayi*. A ênfase é dada à forma do pênis, espata, glândula peniana e glândula pediosa. Esse critério vem se mostrando insuficiente para a resolução de grupos mais complexos, onde os caracteres diferenciais não são evidentes. Em *P. soleiformis* adotou-se formas A, B, C, D e E para populações que apresentam variabilidade morfológica e são oriundas de regiões geográficas distintas. Nesta investigação, abrangeu-se todas as espécies do gênero *Phyllocaulis* analisando-se as ripas da mandíbula e os dentes laterais e raquidianos da rádula, a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Esta análise juntamente com tratamentos estatísticos permitiu reclassificar a forma C de *P. soleiformis* como uma nova espécie. Em outra investigação determinou-se o mapa físico empregando 14 enzimas de restrição de *P. variegatus*, *P. tuberculosus*, *P. boraceiensis*, *P. soleiformis* e, para fins comparativos, *Belocaulus angustipes* e *Sarasinula linguaeformis*. Esse mapa foi obtido através dos fragmentos da região ITS1 do 18S rDNA. A árvore de distâncias gênicas apresenta a forma C de *P. soleiformis* como um elo de ligação entre os dois principais agrupamentos por possuir um grande número de caracteres comuns com todo os outros táxons. Isto demonstra que a forma C sofreu poucas alterações ao longo de seu processo evolutivo. As diferentes técnicas levaram à caracterização das espécies *P. variegatus*, *P. tuberculosus*, *P. boraceiensis*, *P. soleiformis* com a diferenciação da forma C. Os resultados permitem propor a revalidação do nome *Phyllocaulis renschi* para a forma C de *P. soleiformis*.

ABSTRACT

RADULA BIOMETRY AND PATTERN OF DNA RESTRICTION FRAGMENTS IN SPECIES OF THE GENUS *Phyllocaulis* (MOLLUSCA: GASTROPODA: VERONICELLIDAE)

The genus *Phyllocaulis* Colosi, 1922 has being differentiated into five species based on anatomical and morphological analysis: *P. variegatus* (Semper, 1885), *P. tuberculosus* (Martens, 1868), *P. boraceiensis* Thomé 1976, *P. soleiformis* (Orbigny, 1835) and *P. gayi* (Fischer, 1872). Using classification emphasis is given to the form of the penis, spathe and the penal and pedal glands. However such criteria have been proved to be insufficient for identification of more complex groups, where the differentiating characteristics are not evident. There are five forms of *Phyllocaulis soleiformis*, A, B, C, D and E, representing populations from distinct geographical regions. In this investigation the entire genus was studied using scanning electron microscope (SEM) to examine the mandible, lateral and rachidian teeth and the radula. This examination together with the application of statistical analysis permitted the reclassification of form C of *P. soleiformis* as a new species. A complementary study based on the compilation of enzyme standards obtained from fragments of fourteen restriction enzymes which were applied in the regions ITS1 of 18S rDNA. The resulting gene distance tree showed form C of *P. soleiformis* to be a link between the two principal groups. Therefore, the application of these different methodologies led to the discrimination of the species *P. variegatus*, *P. tuberculosus*, *P. boraceiensis*, and *P. gayi*, forms A, B, D, and E and the differentiation of form C. As a result of these findings we propose that, *P. soleiformis* form C be renamed *Phyllocaulis renschi* Thomé, 1965.

APRESENTAÇÃO

Esta Tese apresenta os resultados obtidos a partir de investigações realizadas com espécies do gênero *Phyllocaulis*. Está apresentada na forma de artigos.

O primeiro artigo discute a validade do uso dos dentes da rádula e do número de ripas da mandíbula como caracteres sistemáticos na diferenciação das espécies do gênero *Phyllocaulis*. A importância de tal discussão reside no fato de a determinação dessas espécies estar baseada, quase que exclusivamente, na descrição de estruturas anatômicas bastante variáveis, dificultando a caracterização de grupos mais complexos. A definição dos dentes da rádula como um caráter válido para a determinação de espécies em Veronicellidae é fundamental, visto serem as únicas estruturas relativamente rígidas nesses animais.

O segundo artigo, primeira investigação científica envolvendo biologia molecular como ferramenta na resolução dos problemas taxonômicos na família Veronicellidae, objetivou determinar os padrões dos fragmentos de restrição em espécies do gênero *Phyllocaulis*, comparando-os àqueles de *Belocaulus angustipes* e *Sarasinula linguaeformis*.

Apesar de se tratarem de estruturas diferentes com diferentes tratamentos de dados, ambas investigações conduziram a um resultado convergente que permite propor a revalidação do nome *P. renschi* Thomé, 1965.

Os artigos foram escritos no formato da revista **Studies on Neotropical Fauna and Environment**.

**BIOMETRIA DE RÁDULAS NO GÊNERO *Phyllocaulis* (MOLLUSCA:
GASTROPODA:VERONICELLIDAE)**

Georgina Gonçalves Mansur¹
Jarbas Rodrigues de Oliveira²
José Willibaldo Thomé³

Resumo

Phyllocaulis é um gênero distribuído nas regiões centro oeste e sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile. A determinação das espécies de *Phyllocaulis* está baseada quase que exclusivamente na descrição de caracteres anatômicos e morfológicos, principalmente a forma do pênis, da espata, da glândula peniana e da glândula pediosa. Através da microscopia eletrônica de varredura foram analisadas mandíbulas e dentes laterais e raquidianos da rádula das espécies *P. tuberculosus*, *P. variegatus*, *P. boraceiensis*, *P. soleiformis* (formas A, B, C, D e E) e *P. gayi*. Os caracteres específicos mais importantes foram a largura e o comprimento do dente raquidiano e a largura do dente lateral. Os resultados indicaram a necessidade da diferenciação da forma C de *P. soleiformis* de modo que se propõe a revalidação do nome *P. renschi* para esses espécimes.

Palavras chave: *Phyllocaulis tuberculosus*, *P. variegatus*, *P. boraceiensis*, *P. soleiformis*, *P. gayi* e *P. renschi*, biometria de rádula.

¹ Doutoranda em Biociências, PUCRS.

² Laboratório de Biofísica, PUCRS.

³ Laboratório de Malacologia, PUCRS.

ABSTRACT

RADULA BIOMETRY IN THE GENUS *Phyllocaulis* (MOLLUSCA: GASTROPODA: VERONICELLIDAE)

Phyllocaulis is a genus distributed in the centre west and south of regions of Brazil, of Uruguay, Argentina and Chile. The determination of the species is based, almost exclusively, upon the description of anatomical and morphological characteristics, principally of the penis, spathe and the penial and pedal glands. Our objective was to assess and validate the use of the mandible and lateral and rachidian teeth of the radula. The lateral and rachidian teeth of the species *P. variegatus*, *P. tuberculosus*, *P. boraceiensis*, *P. soleiformis* (forms A, B, C, D and E) and *P. gayi* permitted the differentiation of the species. By means of scanning electron microscopy the mandibles, lateral and rachidian teeth and radula were examined. The most important specific characteristics were the length of the rachidian tooth and the width and length of the lateral tooth. The results point to the necessity of differentiating form C of the species *P. soleiformis*, we propose that it be renamed *Phyllocaulis renschi*.

Key Words: *Phyllocaulis tuberculosus*, *P. variegatus*, *P. boraceiensis*, *P. soleiformis*, *P. gayi* and *P. renschi*, Radula Biometry.

Introdução

O gênero *Phyllocaulis* Colosi, 1922 é representado por cinco espécies de lesmas terrestres que se caracterizam por não possuírem concha e por serem hermafroditas, assim como as demais espécies pertencentes à família Veronicellidae Gray, 1840. Ao revisar o gênero, Thomé (1976) diferenciou as espécies *P. soleiformis* (Orbigny, 1835), *P. tuberculosus* (Martens, 1868), *P. gayi* (Fischer, 1872), *P. variegatus* (Semper, 1885) e *P. boraceiensis* Thomé, 1976 segundo a anatomia, com ênfase em estruturas do sistema reprodutor. Os principais caracteres considerados foram a forma da glândula pediosa, a forma do pênis, o tipo de túbulos da glândula peniana e a forma e disposição dos órgãos do sistema reprodutor feminino junto ao poro genital. Todas as espécies possuem no pênis uma estrutura com aspecto foliáceo, denominada espata, considerada um caráter genérico.

Diversos estudos morfométricos e morfológicos posteriores (Bertschinger & Thomé, 1987, 1988; Leal-Zanchet et al., 1989, 1990, 1991a, 1991b; Bonilha, 1991; Martins, 1998; Santos & Thomé, 2000; Soares, 2001) confirmaram a importância sistemática das estruturas consideradas válidas por Thomé (1976).

Martins (1998), ao estudar aspectos da morfologia de cinco formas de *P. soleiformis* (A, B, C, D e E), agrupadas segundo a coloração do notto, observou nítida diferenciação na forma C que, segundo a autora, apresenta o corpo mais estreito, afastamento dos nervos pediosos e paliais no tegumento coincidindo com o ponto de penetração da aorta pediosa, apresenta a menor espata em relação ao pênis, a glândula do pênis mais dilatada, o diâmetro da papila da glândula peniana menor, fazendo com que esta seja mais estreita quando comparada às outras formas. Além disso, na região genital posterior, a bolsa da copulação recebe o ducto de ligação na extremidade distal do cabeçote que, na forma C, é mais longo quando comparado às demais formas.

A mandíbula e a rádula são caracteres que vêm sendo analisados com fins sistemáticos. A mandíbula é uma estrutura arqueada constituída, na região anterior, por variado número de ripas radiais, ligadas por uma fina membrana (Hoffmann, 1925). A rádula é uma membrana flexível e móvel sobre a qual estão fixadas várias filas longitudinais de dentes quitinosos, semelhantes entre si. Cada fileira transversal

é constituída por um dente central (raquidiano), ladeado pelos dentes laterais (Sordelli, 1874; Runham, 1975). Esta estrutura apresenta valor taxonômico, principalmente em grupos de moluscos marinhos (Calvo, 1987). Os trabalhos de Runham & Thornton (1967), Solem (1972) e Götting (1985) enfatizaram o uso de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observação de detalhes estruturais da rádula, como a forma dos dentes raquidianos e laterais e ripas da mandíbula.

Götting (1985) constatou diferenças entre as rádulas das cinco espécies de *Phyllocaulis* e, a partir do número de ripas da mandíbula e da razão entre os comprimentos dos dentes laterais e raquidianos, propôs uma relação hipotética entre elas, enfatizando, no entanto, que esta não era uma proposta à filogenia do grupo.

A variabilidade entre as rádulas e mandíbulas de diferentes espécimes de *P. soleiformis* levou Götting (1985) a propor a existência de três “formas” distintas: formas A, B e C. Seguindo a mesma terminologia, Martins (1998) analisou a variabilidade morfológica de órgãos internos e de rádulas nas três formas anteriormente propostas por Götting (1985), adicionando ainda, outras duas formas às quais denominou D e E.

Assim como verificado por Martins (1998) em *P. soleiformis*, Soares (2001) também verificou em *P. variegatus* variação morfológica, principalmente na coloração do notó, na forma do pênis, da papila da glândula peniana e da espata, levantando a hipótese da existência de uma clina altitudinal. Apesar de constatar esta variabilidade na morfologia, Soares (2001) não constatou diferenças significativas entre as rádulas dos espécimes analisados.

As espécies do gênero *Phyllocaulis* distribuem-se numa faixa oblíqua transversal (Fig. 1) no sul da América do Sul (Thomé, 1976). *P. variegatus* apresenta a mais ampla distribuição: ocorre desde o sul de Minas Gerais até Buenos Aires, acompanhando, em linhas gerais, a grande bacia hidrográfica do Paraná-Prata. *P. boraceiensis* distribui-se desde Juiz de Fora (MG) até Blumenau (SC), numa estreita faixa litorânea. *P. tuberculatus* inicia sua ocorrência em Joinville (SC) e também ao longo do litoral, estende sua distribuição até Viamão (RS). *P. soleiformis* é a espécie de ocorrência mais meridional na costa atlântica. Distribui-se desde Florianópolis (SC) (Martins, 1998), estendendo-se por todo o Rio Grande do Sul, atingindo o

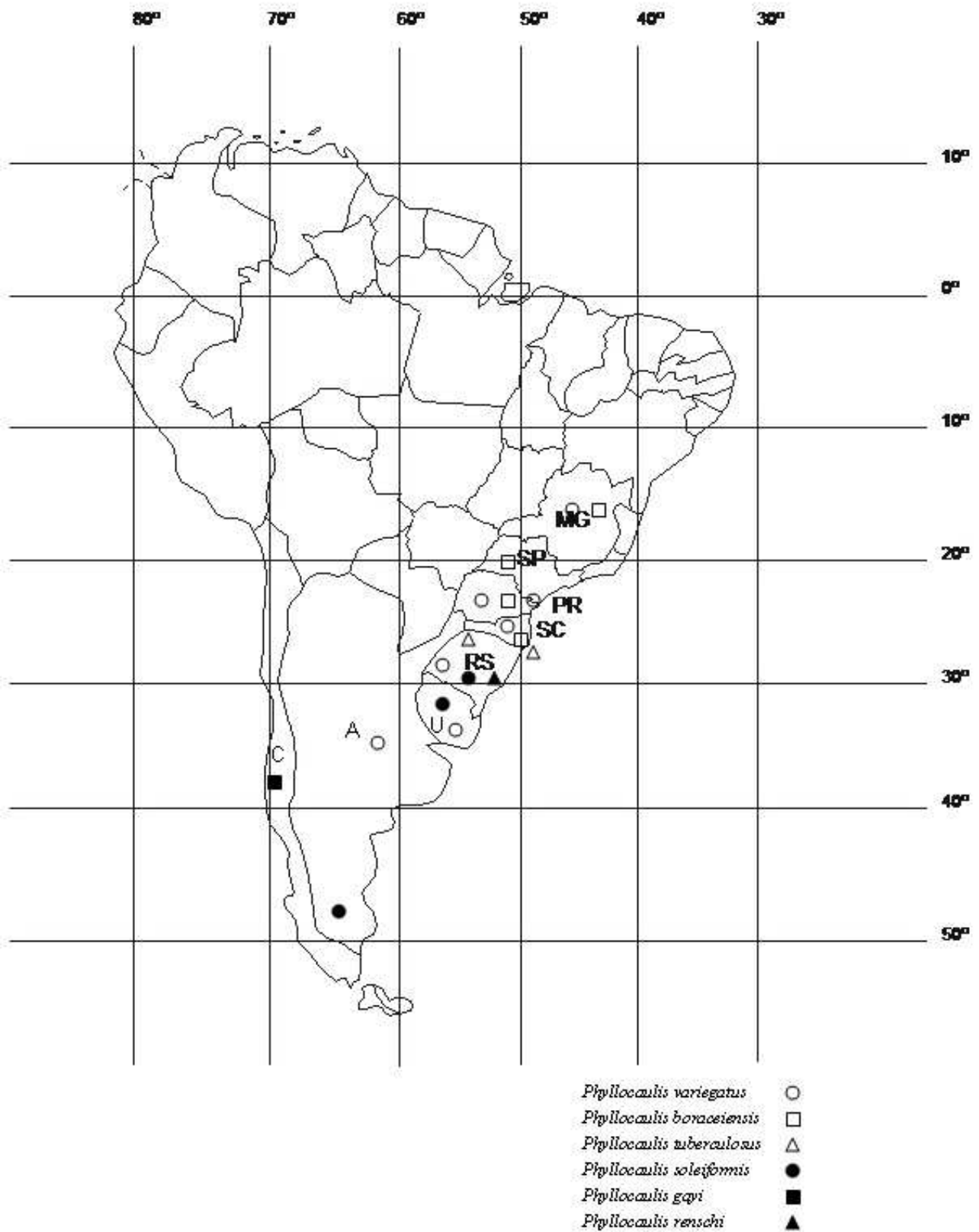


Fig. 1. Mapa de distribuição das espécies do gênero *Phyllocaulis*, na América do Sul.

limite austral de distribuição em Baía Blanca, na Argentina (Cazzaniga & Ronda, 1986). *P. gayi* é a única espécie que se localiza além dos Andes, restringindo sua distribuição geográfica ao sul do Chile.

Esta investigação teve como propósito discutir a validade do uso dos dentes da rádula e do número de ripas da mandíbula como caracteres sistemáticos na diferenciação das espécies do gênero *Phyllocaulis*.

Materiais e Métodos

Procedência dos exemplares

Para análise da rádula e mandíbula foram utilizados exemplares de *P. variegatus* oriundos de Canela (RS); exemplares de *P. boraceiensis* de São Paulo (SP); exemplares de *P. tuberculosus* de Canela e São Francisco de Paula (RS); exemplares de *P. gayi* do sul do Chile; exemplares de *P. soleiformis* das cidades de Porto Alegre (A), Viamão (A), Camaquã (A), Santana do Livramento (B), Riozinho (C) e São Borja (D), RS. Esta última espécie foi subdividida segundo a variação do colorido do noto, sendo agrupada em 5 formas: A, B, C, D e E (Martins, 1998).

Quantificação dos espécimes, mandíbulas, rádulas e dentes

O número de ripas da mandíbula foi avaliado em um exemplar de cada espécie e em três exemplares de cada forma de *P. soleiformis*, totalizando 19 mandíbulas. Para análise dos dentes da rádula foi utilizado um total de 47 espécimes, sendo três de *P. boraceiensis*, três de *P. tuberculosus*, três de *P. gayi*, três de *P. variegatus*. Na espécie *P. soleiformis* foram investigados dez espécimes da forma A; dez da forma B; oito da forma C; cinco da forma D e dois da forma E. Em cada rádula foram analisados três dentes raquidianos e três dentes laterais, compreendendo em *P. soleiformis*: 60 dentes na forma A, 60 na forma B, 48 na forma C; 30 na forma D e 12 na forma E. Em *P. variegatus*, *P. tuberculosus*, *P. boraceiensis* e *P. gayi* foram incluídos na análise 18 dentes de cada espécie.

Metodologia

Para a investigação, utilizaram-se tanto animais fixados previamente, quanto animais coletados no campo. Aqueles capturados vivos foram submetidos à anestesia criogênica por quatro horas ou mais, até que estivessem totalmente distendidos. A dissecação foi realizada sob estereomicroscópio, seguindo metodologia proposta por Lopes & Thomé (1973).

Para as análises de rádulas e mandíbulas retirou-se o bulbo bucal, localizado na região anterior da cavidade interna do animal, com o corte do esôfago e nervos e afastamento das glândulas salivares, liberando-se a peça dos palpos labiais e omatóforos.

O método para preparação da rádula e mandíbula foi baseado em Solem (1972), com modificações. O bulbo bucal foi mergulhado em solução de hipoclorito de sódio (NaClO) e água destilada (1:1) para dissolução do tecido muscular. Após esse banho, o bulbo bucal foi transferido para uma placa de Petri contendo água destilada, procedendo-se a retirada dos tecidos mais externos, amolecidos pelo hipoclorito de sódio. Para a finalização da limpeza das rádulas e mandíbulas, as peças foram transferidas para um microtubo com tampa, contendo água destilada. O conjunto foi colocado em um aparelho de ultra som Branson 2210 com frequência de 47 KHz por cerca de três minutos.

Geralmente, a membrana basal da rádula tende a se enrolar, devido a um encolhimento por ação do hipoclorito de sódio. Para evitar que o manuseio prejudicasse a montagem, foi necessário dar um último banho de álcool etílico 95% ou álcool etílico absoluto até que a rádula fosse montada na posição desejada.

As rádulas e mandíbulas foram analisadas a partir de micrografias obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) marca Phillips XL30 do Centro de Microscopia e Microanálise (CEMM) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

A montagem destas estruturas para microscopia eletrônica envolve sua transferência para uma estrutura metálica (*stubs*) sobre a qual é colada uma fita especial de carbono dupla face, que permite a aderência das mesmas. Para a disposição das rádulas sobre o *stub*, utilizou-se a metodologia de Götting (1985), que

consiste em colocar a rádula sobre o *stub* de modo que ela fique totalmente plana, permitindo estudos biométricos comparativos. Mandíbulas e rádulas foram metalizadas com uma fina camada de ouro fornecido pelo CEMM.

Análise de Dados

A análise da mandíbula envolveu a descrição da sua forma geral e da contagem do número de ripas (costelas) presentes em cada estrutura (Fig. 2). Para as rádulas enfocou-se a forma geral dos dentes, além de dados biométricos. A fim de minimizar possíveis variações originadas pela técnica, as micrografias foram obtidas numa mesma região radular e foi mantido o mesmo aumento (773x). Com o auxílio de um paquímetro digital Mitutoyo, com precisão de 0,01mm, foram tomadas as medidas dos dentes em milímetros sobre as imagens e, posteriormente, transformadas em micrômetros através de regra de três simples.

O comprimento do dente lateral foi aferido a partir da extremidade inferior até o ápice da cúspide e a largura, na porção mais larga do dente. O comprimento do dente raquidiano foi aferido a partir do ponto em que a folha dentária inicia sua elevação até o ápice da cúspide e a largura, na porção mais larga do dente (Fig. 3).

Após a obtenção dos dados, foram calculadas a média e o desvio padrão das medidas dos dentes laterais e raquidianos e calculados os quocientes entre: os comprimentos do dente raquidiano e lateral (CR/CL), larguras do dente raquidiano e lateral (LR/LL), largura e comprimento do dente lateral (LL/CL), largura e comprimento do raquidiano (LR/CR).

A partir das proporções obtidas para os 282 dentes mensurados verificou-se a variação entre os nove grupos e todas as variáveis através da análise de variância multivariada (MANOVA), utilizando-se o *software* SPSS.

Os mesmos dados foram submetidos à análise discriminante (*software* SPSS), objetivando verificar a relação de magnitude de diferenças entre grupos, relativa àquela dentro dos grupos (Monteiro & Reis, 1999). Ao utilizar esta técnica, procurou-se gerar funções que maximizassem a variância existente entre os grupos e minimizassem a variância dentro de cada grupo (Peres-Neto, 1995). Os grupos previamente determinados foram as cinco formas de *P. soleiformis* (A, B, C, D e E) e as demais espécies (*P. variegatus*, *P. tuberculosus*, *P. boraceiensis* e *P. gayi*).

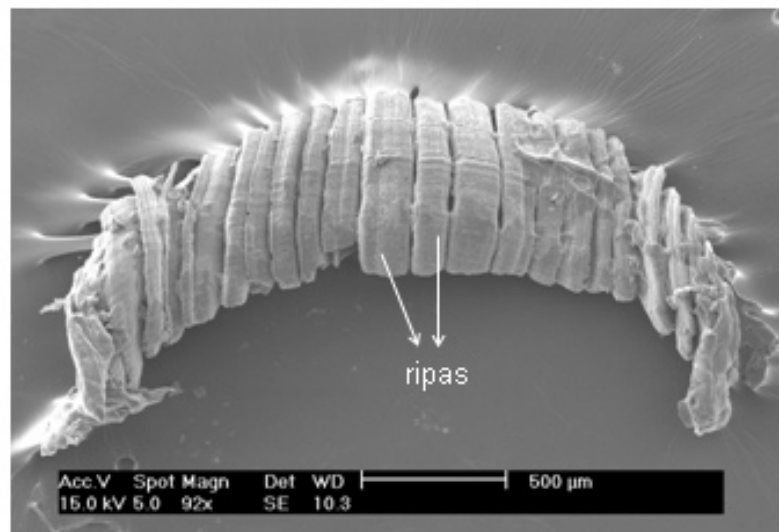


Fig. 2. Micrografia eletrônica da mandíbula de um exemplar de *Phyllocaulis gayi* com indicação das ripas.

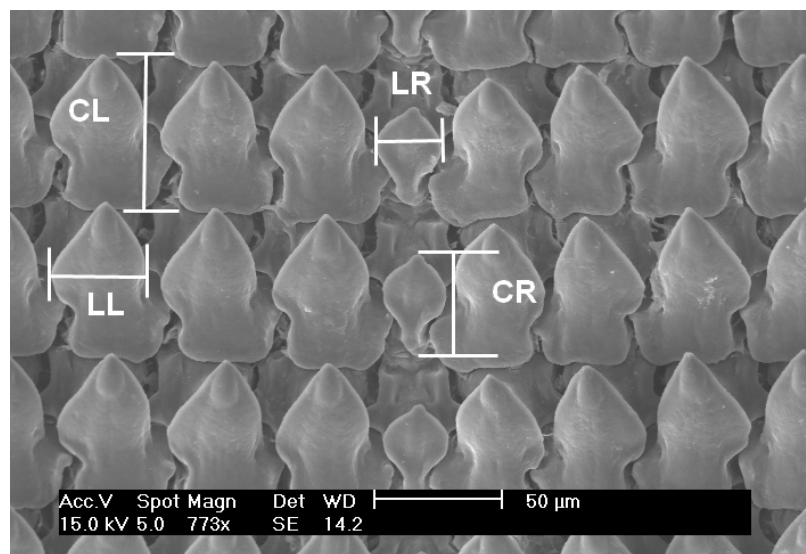


Fig. 3. Micrografia eletrônica da rádula de um exemplar de *Phyllocaulis boraceiensis* com indicação das medidas realizadas nos dentes laterais e raquidianos (CL= comprimento do dente lateral; LL= largura do dente lateral; CR= comprimento do dente raquidiano; LR= largura do dente raquidiano). 15.0kV, spot 5.0, aumento 773x.

Os dados das proporções entre os comprimentos e larguras dos dentes raquidianos e laterais também foram submetidos à análise de agrupamento (*Cluster Analysis*) o que permitiu a visualização dos grupos mais próximos, segundo os caracteres considerados (*software* Statistica 5.0).

Resultados e Discussão

Segundo Götting (1985), a forma, a largura e o número de ripas da mandíbula são diferentes em cada espécie do gênero *Phyllocaulis*. Para este autor, *P. soleiformis* teria cerca de 29 ripas nas três formas (A, B e C). No presente trabalho, o número de ripas, nesta mesma espécie, variou de 18 (forma C) até 33 (forma E), sugerindo que este caráter não tem consistência para a diferenciação das formas e espécies. A Tabela 1 apresenta os resultados do número de ripas da mandíbula e desvio padrão para todas as espécies e formas consideradas.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados dos comprimentos médios e larguras médias dos dentes laterais e raquidianos para todas as espécies e formas consideradas.

Tabela 1. Número de ripas da mandíbula e desvio padrão (dp) de cinco espécies e formas de *Phyllocaulis*.

	Mandíbula	
	n° ripas	dp
<i>P. soleiformis</i> A	23	± 2,52
<i>P. soleiformis</i> B	24	± 0,58
<i>P. soleiformis</i> C	18	± 1,53
<i>P. soleiformis</i> D	24	± 0,58
<i>P. soleiformis</i> E	33	± 1,00
<i>P. variegatus</i>	29	-
<i>P. boraceiensis</i>	20	-
<i>P. tuberculosus</i>	28	-
<i>P. gayi</i>	22	-

Tabela 2. Comprimento médio (C)(μm) e largura média (L) (μm) dos dentes das rádulas de cinco espécies e formas de *Phyllocaulis*.

	Dente Lateral		Dente Raquidiano	
	C _{médio}	L _{média}	C _{médio}	L _{média}
<i>P. soleiformis</i> A	55,78 \pm 4,02	28,04 \pm 1,74	34,60 \pm 4,13	15,45 \pm 2,34
<i>P. soleiformis</i> B	55,17 \pm 4,60	29,19 \pm 2,15	37,45 \pm 2,20	17,32 \pm 2,28
<i>P. soleiformis</i> C	40,04 \pm 3,27	22,59 \pm 1,53	25,52 \pm 2,31	11,92 \pm 1,34
<i>P. soleiformis</i> D	48,40 \pm 3,95	25,84 \pm 1,46	31,03 \pm 1,52	15,58 \pm 1,23
<i>P. soleiformis</i> E	47,02 \pm 5,41	27,77 \pm 2,80	32,13 \pm 4,19	15,11 \pm 1,10
<i>P. variegatus</i>	64,31 \pm 4,94	36,60 \pm 2,51	47,85 \pm 3,05	25,07 \pm 1,31
<i>P. boraceiensis</i>	56,50 \pm 3,25	36,20 \pm 1,38	35,98 \pm 3,33	22,26 \pm 2,39
<i>P. tuberculosus</i>	70,27 \pm 8,34	46,41 \pm 4,78	49,32 \pm 6,85	25,92 \pm 2,91
<i>P. gayi</i>	55,32 \pm 1,00	32,05 \pm 1,16	31,90 \pm 1,07	15,41 \pm 2,26

Quanto ao aspecto geral das mandíbulas, as observações corroboraram a descrição de Götting (1985). As micrografias das mandíbulas (Fig. 4) revelaram a variabilidade na forma e no número de ripas nos nove grupos examinados. Em *P. boraceiensis*, as ripas encontraram-se muito unidas, conferindo aspecto de placa única. Nas espécies *P. variegatus*, *P. tuberculosus* e *P. soleiformis* pôde-se perceber as ripas como uma série de pequenas elevações na mandíbula, ocorrendo leves estrias longitudinais. Na forma C desta última espécie, além de estrias longitudinais, ocorreu uma seqüência de sulcos transversais, muito próximos entre si. Nas formas A, D e E visualizaram-se sulcos transversais, porém estes estão afastados. *P. gayi* apresentou mandíbula com as ripas salientes, com comprimento e largura diferentes e observaram-se sulcos transversais espaçados. Martins (1998), ao descrever a mandíbula das cinco formas de *P. soleiformis* com base em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), não evidenciou um padrão que permitisse distinguir as formas.

Os resultados obtidos a partir do número de ripas da mandíbula e das médias e desvios padrão evidenciam a forma C de *P. soleiformis* como aquela que apresenta o menor número de ripas na mandíbula e os menores valores médios de comprimento e largura dos dentes laterais e raquidianos. Martins (1998), ao analisar as medidas médias dos dentes radulares desta espécie, constatou igualmente que os menores dentes ocorriam na forma C com 51,1 μm para o comprimento dos dentes laterais e 35,8 μm para o comprimento do dente raquidiano, enquanto os maiores dentes

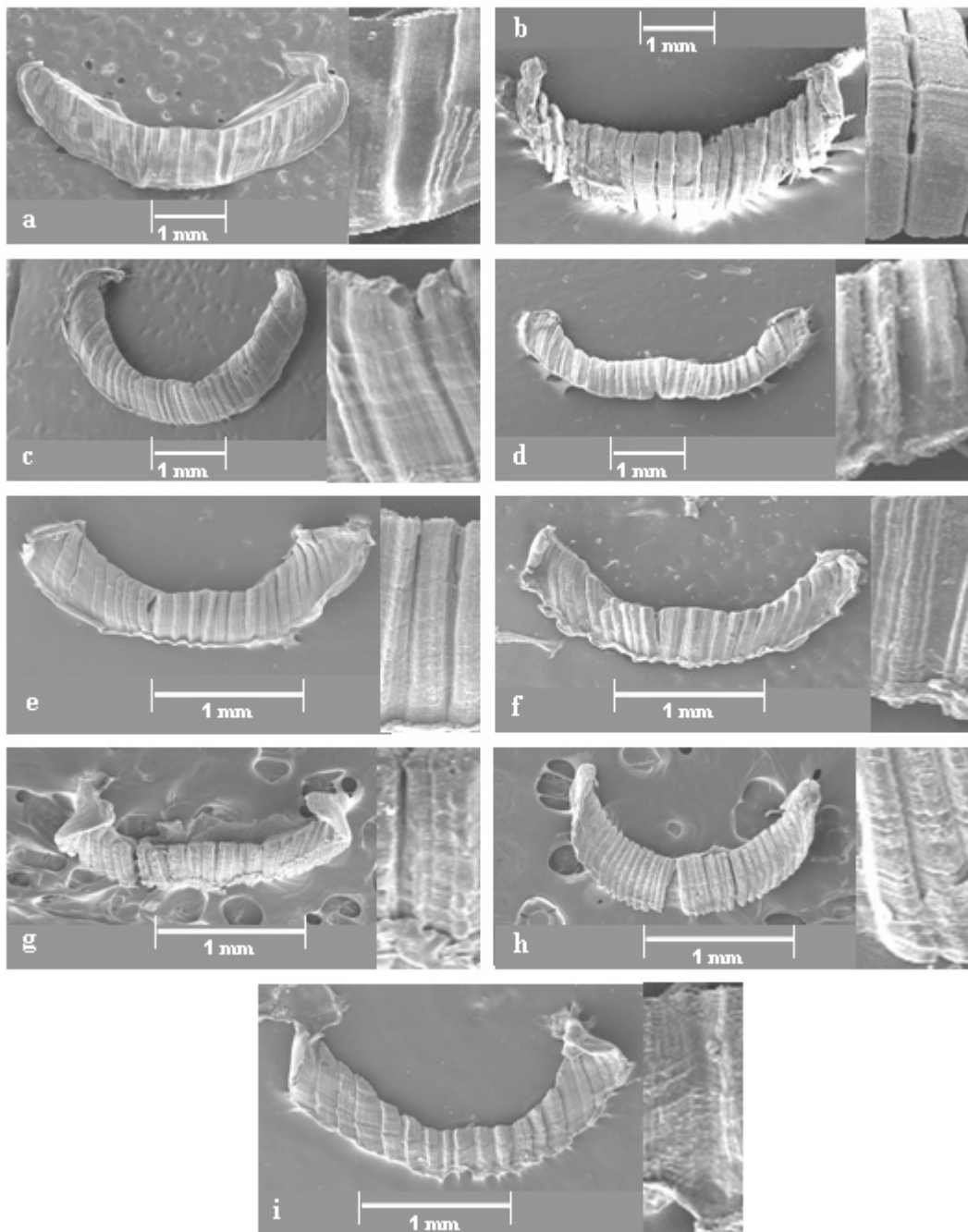


Fig. 4. Micrografias eletrônicas das mandíbulas dos nove grupos de *Phyllocaulis*. 15.0kV, spot 5.0. (a) *P. boracei*; (b) *P. gayi*; (c) *P. tuberculatus*; (d) *P. variegatus*; (e) *P. soleiformis* forma A; (f) *P. soleiformis* forma B; (g) *P. soleiformis* forma D; (h) *P. soleiformis* forma E; (i) *P. renschi*

ocorriam na forma B com 64,7 μm para o comprimento dos dentes laterais e 43,5 μm para o comprimento dos dentes raquidianos.

Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos a partir das proporções estabelecidas entre os dentes laterais e raquidianos.

Tabela 3. Índices médios dos quocientes entre as medidas dos dentes das rádulas das quatro espécies e cinco formas de *Phyllocaulis* (CL = comprimento do dente lateral; CR = comprimento do dente raquidiano; LL = largura do dente lateral; LR = largura do dente raquidiano).

	LL/CL	LR/CR	LR/LL	CR/CL
<i>P. soleiformis</i> A	0,50	0,45	0,55	0,62
<i>P. soleiformis</i> B	0,53	0,46	0,60	0,68
<i>P. soleiformis</i> C	0,57	0,47	0,53	0,64
<i>P. soleiformis</i> D	0,54	0,50	0,60	0,65
<i>P. soleiformis</i> E	0,59	0,47	0,55	0,68
<i>P. variegatus</i>	0,57	0,53	0,69	0,74
<i>P. boraceiensis</i>	0,64	0,62	0,62	0,64
<i>P. tuberculosus</i>	0,66	0,54	0,56	0,70
<i>P. gayi</i>	0,58	0,48	0,48	0,58

Os valores expostos nesta tabela revelam que ocorreu pequena variação entre os quocientes médios nas diferentes formas e espécies. Na relação entre a largura e o comprimento do dente lateral, a forma A de *P. soleiformis* apresentou o dente lateral mais estreito, enquanto *P. tuberculosus* apresentou o dente lateral mais largo, valor próximo de *P. boraceiensis*. Esta última demonstrou na relação entre largura e comprimento do dente raquidiano, o dente mais largo dentre todos os espécimes analisados e a forma A de *P. soleiformis*, o dente raquidiano mais estreito. Na razão entre as larguras do dente raquidiano e lateral, *P. gayi* apresentou o dente raquidiano mais estreito, enquanto *P. variegatus* apresentou este dente com maior largura. O quociente médio entre os comprimentos do dente raquidiano e lateral foi maior em *P. variegatus*, indicando o dente raquidiano mais comprido e, em *P. gayi*, o mais curto. As micrografias das rádulas (Fig. 5) revelaram a variabilidade de tamanho e forma nos nove grupos examinados.

A simples comparação dos quocientes médios não permitiu diferenciar qualquer uma das formas ou mesmo as espécies, pois, com algumas exceções, os valores médios se equivalem. Esses resultados corroboraram aqueles de Martins (1998) que

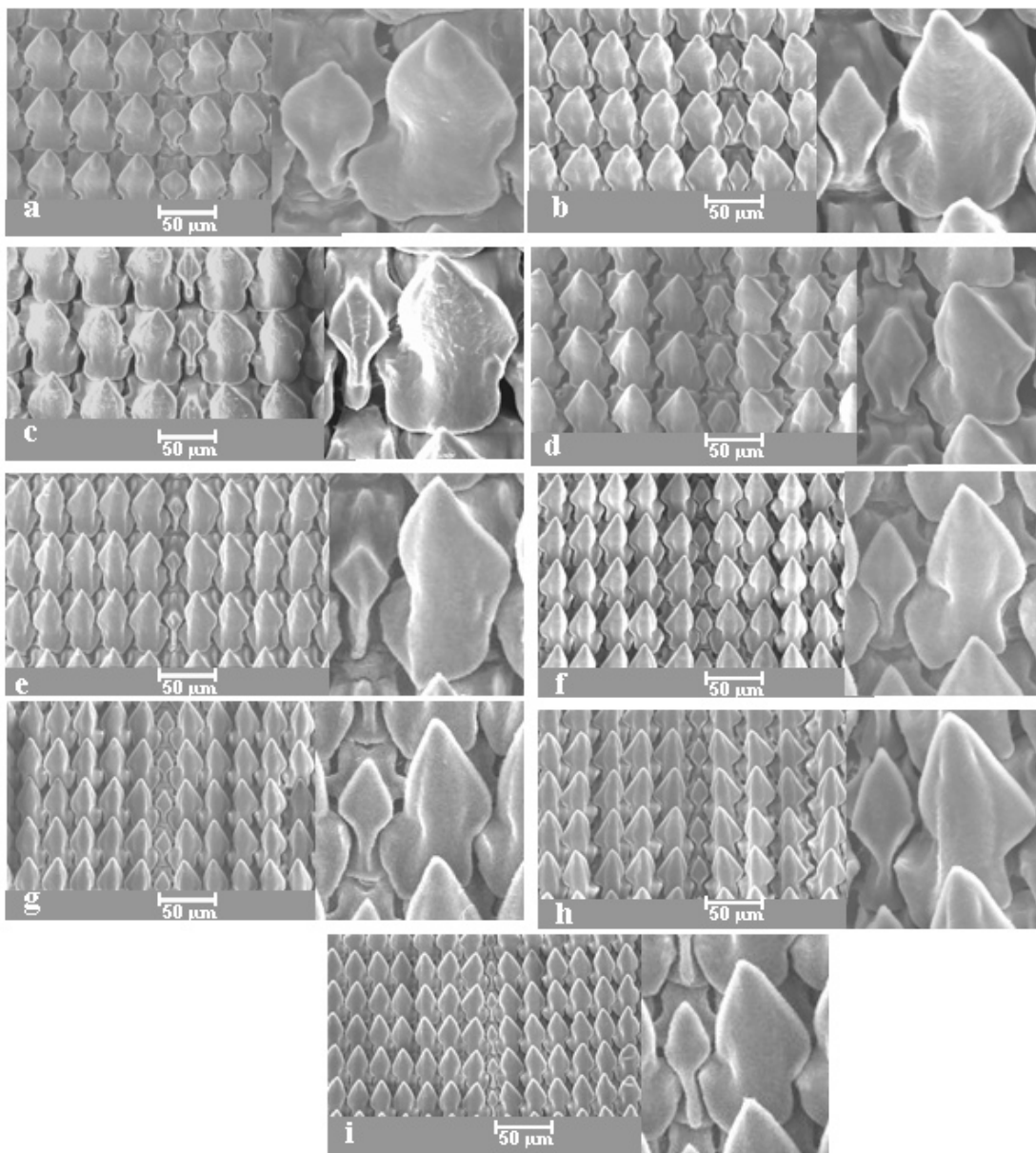


Fig. 5. Micrografias eletrônicas das rádulas dos nove grupos de *Phyllocaulis*. 15.0kV, spot 5.0, aumento 773x. (a)*P. boraceiensis*; (b) *P. gayi*; (c)*P. tuberculosus*; (d) *P. variegatus*; (e) *P. soleiformis* forma A; (f) *P. soleiformis* forma B; (g) *P. soleiformis* forma D; (h) *P. soleiformis* forma E; (i) *P. renschi*

concluiu não serem estes parâmetros seguros para diferenciar as formas de *P. soleiformis*. No decorrer deste trabalho constatou-se que a simples comparação entre as médias das proporções “mascaram” as diferenças entre os grupos, distinguindo apenas os mais evidentes. Para evitar este “mascaramento” de dados, nas análises de variância, discriminantes canônicas e agrupamento, utilizaram-se os quocientes de todos os 282 dentes, aplicando-se um teste de homogeneidade das variâncias através do teste “Box M” para múltiplas variáveis dependentes (Box M= 364,53; Qui-quadrado= 307,30; gl= 80; p<0,0001) (Anderson, 1958).

Na análise de variância de todos os grupos e todas as variáveis (quocientes), utilizou-se análise de variância multivariada (MANOVA) e aplicou-se o teste Wilks’ Lambda, que pode assumir desde o valor zero, indicando uma discriminação perfeita, até o valor um, indicando que não há discriminação. A MANOVA entre os nove grupos de *Phyllocaulis* apresentou os seguintes resultados: a) razão LR/CR: F= 133,94; b) razão CR/CL: F= 70,34; c) razão LR/LL: F= 69,45; d) razão LL/CL: F=57,99. O nível de significância (p) resultou em valores inferiores a 0,0001 para todas as variáveis. Os resultados atestaram a significativa variância entre os dentes das diferentes formas e espécies investigadas [Wilks’ Lambda= 0,01938; distribuição de Rao R (32, 477) = 28,53]. (Rao, 1952; Tatsuoka, 1971; Lindeman et al. 1980).

As mesmas medidas dos dentes radulares foram submetidas à análise das funções discriminantes canônicas. Fischer (apud Monteiro & Reis, 1999) salienta a importância da utilização do cálculo das variáveis canônicas para a discriminação de populações. A Tabela 4 apresenta os autovalores, a correlação canônica, testes Wilks’ Lambda e Qui-quadrado, graus de liberdade, percentual de variância e percentual cumulativo da variância e os coeficientes das funções discriminantes canônicas.

Tabela 4. Autovalores e variância das funções discriminantes canônicas (* nível de significância <0,0001).

Função	Autovalores	Correlação canônica	Wilks’ Lambda	χ^2	df	% variância	% variância cumulativa
1	11,233	0,9583*	0,0194	526,39	32	84,59	84,59
2	1,364	0,7597*	0,2372	192,08	21	10,27	94,86
3	0,466	0,5642*	0,5609	77,20	12	3,52	98,38
4	0,215	0,4211*	0,8227	26,05	5	1,62	100,00

A Tabela 5 apresenta a correlação dos quocientes entre os dentes laterais e raquidianos e as funções canônicas. Estes resultados definiram as variáveis que serão dispostas nos eixos canônicos. Verificou-se que o primeiro eixo (Função I) compreende 84,59% da variação entre os grupos, sendo o quociente entre a largura e o comprimento do dente raquidiano e o quociente entre os comprimentos do dente raquidiano e lateral os caracteres que mais contribuíram na discriminação, ao longo deste eixo. No segundo eixo canônico (Função II), que contém 10,27% da variação entre os grupos, constatam-se a importância dos quocientes entre as larguras dos dentes raquidiano e lateral, bem como do quociente entre a largura e o comprimento do dente lateral.

Tabela 5. Correlação das variáveis nas funções canônicas (I, II, III e IV) nos nove grupos de *Phyllocaulis* (LL= largura dente lateral; CL= comprimento dente lateral; LR= largura dente raquidiano; CR= comprimento dente raquidiano. * = significativo).

Variáveis	Função I	Função II	Função III	Função IV
LL/CL	0,498	- 0,651*	0,546	- 0,171
LR/CR	0,843*	0,072	0,522	0,109
LR/LL	0,558	- 0,687*	- 0,306	0,351
CR/CL	0,598*	- 0,173	- 0,538	- 0,569

Através da Fig. 6 pode-se constatar a discriminação dos grupos, principalmente das espécies *P. tuberculosus*, *P. variegatus*, *P. boraceiensis* e *P. soleiformis* C. Observou-se que a espécie *P. gayi* apresenta-se próxima das formas A, B, D e E de *P. soleiformis*, porém, em seu conjunto, não se sobrepõe a essas.

No eixo I, onde as variáveis se distribuem segundo o quociente entre largura e comprimento do dente raquidiano e o quociente entre os comprimentos dos dentes raquidiano e lateral, não foi possível distinguir claramente as formas A e B de *P. soleiformis*. A forma D, no entanto, apresentou os dentes raquidianos ligeiramente mais estreitos e curtos que as formas A e B, formando um grupo intermediário entre as formas A e B e a forma C de *P. soleiformis*.

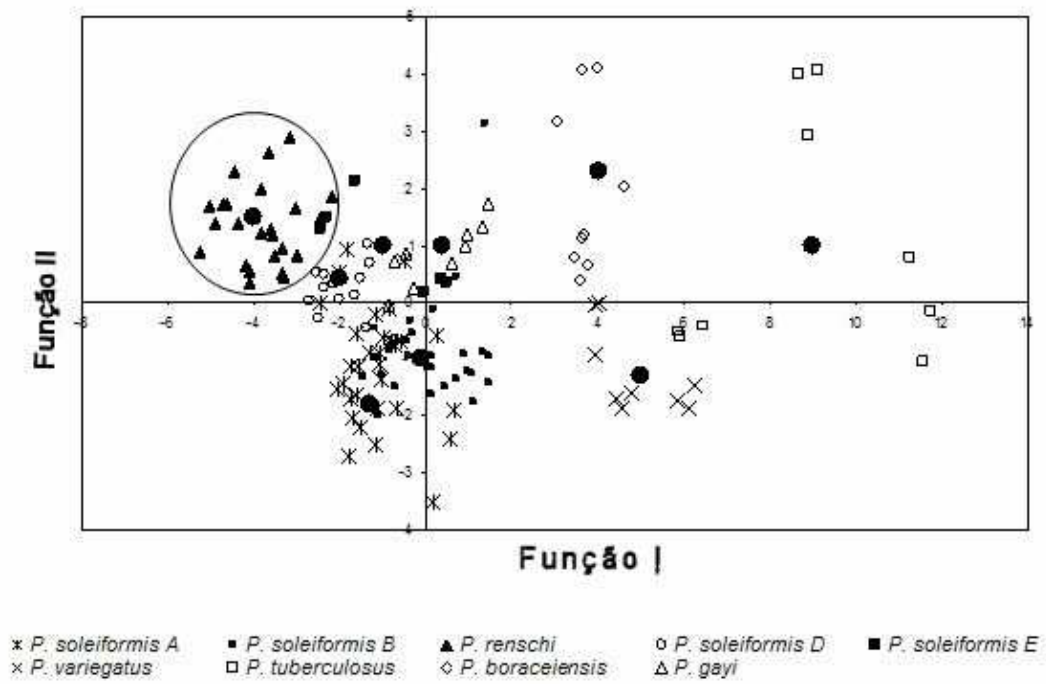


Fig. 6. Gráfico das funções discriminantes canônicas (Função I x Função II).
 (●) = centróides.

O resultado mais surpreendente foi o agrupamento coeso da forma C de *P. soleiformis*, que se separou totalmente dos demais grupos, por apresentar os dentes raquidianos mais estreitos e curtos dentre todos os grupos analisados. As espécies *P. variegatus* e *P. boraceiensis* estão distribuídas no eixo positivo ocupando posições semelhantes. *P. tuberculosus*, por apresentar os dentes raquidianos mais largos e longos dentre todos os grupos, está distribuída na posição mais extrema do eixo positivo.

No eixo II, definido pelos quocientes entre as larguras dos dentes raquidiano e lateral e entre a largura e comprimento do dente lateral, verificou-se a discriminação entre *P. variegatus* e *P. boraceiensis*, por esta última apresentar o dente raquidiano mais largo. *P. tuberculosus*, por apresentar a maior amplitude de variação para os caracteres considerados, distribui-se tanto no eixo positivo quanto no negativo. As formas A e B de *P. soleiformis* distinguiram-se das demais formas da espécie e de *P. gayi* por apresentarem os dentes raquidianos mais estreitos quando comparados à largura dos laterais e os dentes laterais, mais estreitos quando comparados ao seu comprimento.

Analisando-se o gráfico (Fig. 6) como um todo, observou-se que as formas A, B, D e E estão próximas, sobrepondo-se em algumas regiões, porém os grupos centróides encontram-se distanciados nas cinco formas da espécie *P. soleiformis*, principalmente quando comparados à forma C. Martins (1998), apesar de ter verificado diferenças entre o tamanho dos dentes laterais e raquidianos na forma B e uma menor fórmula radular na forma C, não as considerou significativas a ponto de diferenciá-las em táxons independentes.

Através das medidas dos dentes das rádulas e das proporções estabelecidas entre elas, pôde-se fazer uma análise de agrupamento (*Cluster Analysis*) procurando verificar aqueles grupos mais próximos, segundo a semelhança dos dentes radulares. Diferentemente do que ocorre na análise discriminante, este método não exige o estabelecimento prévio dos grupos, ou seja, os agrupamentos são construídos segundo a semelhança dos caracteres sob análise.

O dendrograma (Fig. 7) resultou na formação de três grandes agrupamentos. O primeiro, composto por todos os espécimes da forma C de *P. soleiformis*, alguns espécimes da forma D e alguns da forma E. O segundo agrupamento

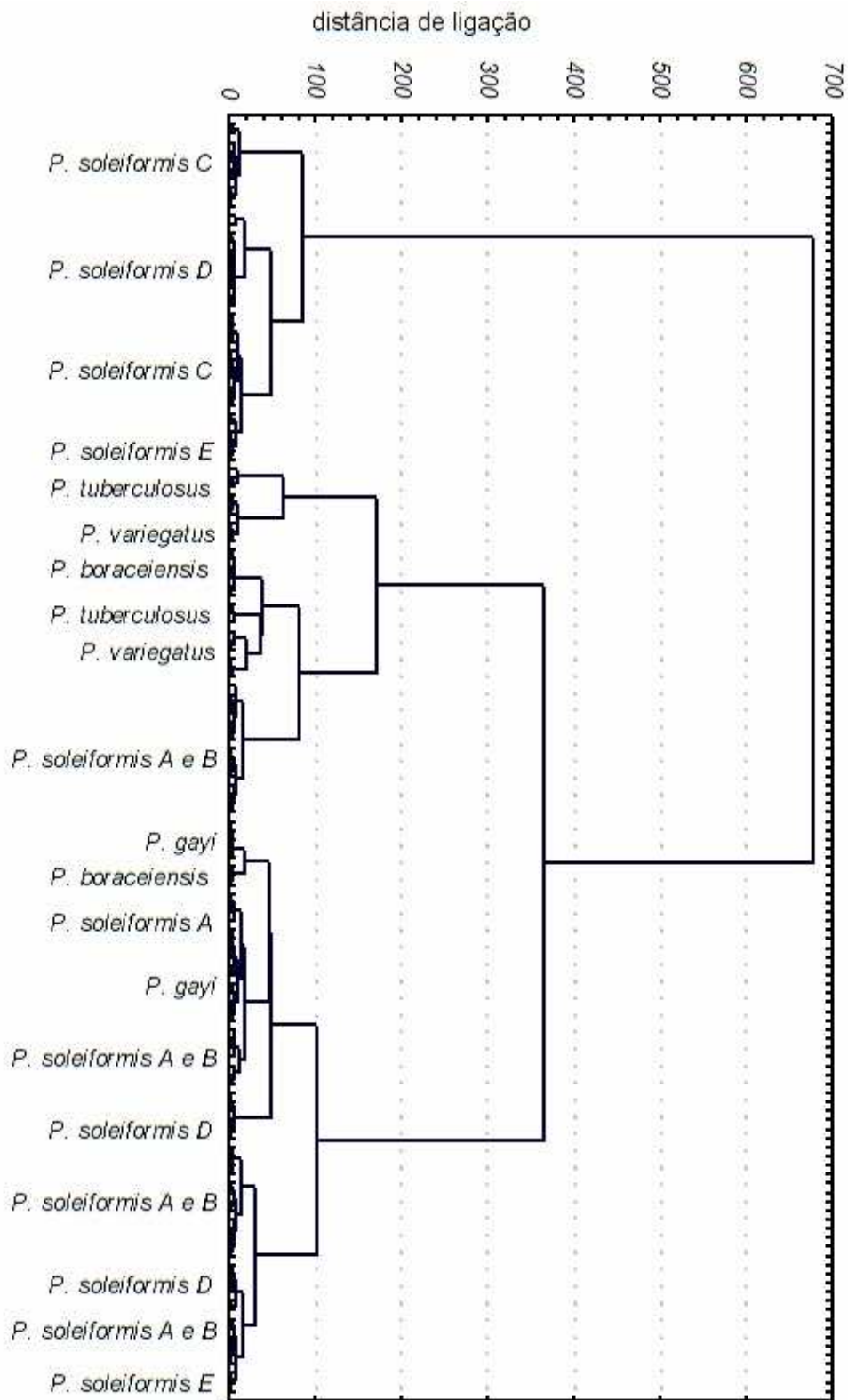


Fig. 7. Dendrograma apresentando o agrupamento dos nove grupos de *Phyllocaulis*, segundo as semelhanças entre os dentes da rádula.

reuniu todos os espécimes de *P. tuberculosis*, todos os de *P. variegatus*, a maioria dos espécimes de *P. boraceiensis* e alguns espécimes de *P. soleiformis* A e B. O terceiro agrupamento foi formado, majoritariamente, pelas formas A e B de *P. soleiformis*, alguns espécimes da forma D e E, todos os espécimes de *P. gayi* e alguns espécimes de *P. boraceiensis*.

Götting (1985), a partir da análise de rádulas de *Phyllocaulis boraceiensis*, *P. gayi*, *P. tuberculosis*, *P. variegatus* e *P. soleiformis* (A, B e C), dividiu-as em dois grandes grupos, de acordo com a semelhança entre os dentes: o primeiro, formado por *P. soleiformis* C, *P. boraceiensis* e *P. gayi*, sendo as duas últimas mais próximas entre si. O segundo grupo, formado por *P. variegatus*, *P. soleiformis* (A, B) e *P. tuberculosis*. As duas últimas espécies mostraram-se mais próximas entre si. O autor não analisou ou considerou as formas D e E de *P. soleiformis* incluídas na presente investigação.

A determinação das espécies de *Phyllocaulis* está baseada quase que exclusivamente na descrição de caracteres morfológicos, principalmente a forma do pênis, da espata e da glândula peniana. Devido a essa similaridade, Thomé (1976) sugeriu que as espécies *P. boraceiensis*, *P. tuberculosis* e *P. variegatus* deveriam estar mais próximas entre si, especialmente pela maior semelhança do pênis e da glândula peniana em relação a *P. gayi* e *P. soleiformis*, que também se acham mais próximas entre si, do que com as três outras espécies.

Nesta investigação, verificou-se que a biometria da rádula das espécies de *Phyllocaulis* corrobora as hipóteses de proximidade entre as espécies proposta por Thomé (1976), construída a partir dos caracteres morfológicos, e diferem da proposição de Götting (1985), realizada a partir da análise dos dentes radulares.

Em *P. soleiformis* e *P. variegatus*, freqüentemente são descritas variações morfológicas entre indivíduos da mesma espécie (Thomé, 1965; Martins, 1998; Soares, 2001), mas a dificuldade de estabelecer caracteres morfológicos consistentes impede que seja realizada a separação definitiva de um grupo de espécimes ou a confirmação de que todos os espécimes compõem uma única espécie.

Thomé (1965), ao analisar e redescrever holótipo e parátipos de *P. soleiformis*, propôs que os espécimes coletados em Nova Petrópolis (RS) fossem considerados como uma espécie nova a qual denominou de *P. renschi*. Em um estudo

posterior (1976), o próprio autor colocou a espécie em sinonímia com *P. soleiformis*, devido à dificuldade de discriminar os espécimes apenas pela descrição morfológica.

Todos os resultados obtidos atestaram que a biometria da rádula é uma técnica válida para discriminação das espécies de *Phyllocaulis*. A definição dos dentes como um caráter válido para a determinação de espécies em Veronicellidae é de extrema importância, visto serem estes as únicas estruturas relativamente rígidas nesses animais. Até o momento, todas as determinações foram realizadas com base na morfologia e morfometria dos órgãos internos, o que faz com que eles possam variar, dependendo do modo de distensão, fixação, dissecação e conservação.

Com base nas extensivas descrições morfológicas realizadas por Martins (1998) e nos resultados da presente investigação, que também indicam que a forma C de *P. soleiformis* está mais próxima do grupo formado por *P. tuberculosus*, *P. boraceiensis* e *P. variegatus* do que das demais formas de *P. soleiformis*, sustenta-se a hipótese desta, efetivamente, ser outra espécie, o que autoriza a propor aqui a revalidação do nome *P. renschi*, Thomé 1965, elevando-se para seis o número de espécies válidas para o gênero *Phyllocaulis*: *P. boraceiensis*, *P. variegatus*, *P. tuberculosus*, *P. renschi*, *P. soleiformis* e *P. gayi*.

Referências

- Anderson TW (1958): *An introduction to multivariate statistical analysis*. New York: Wiley.
- Bertschinger RB, Thomé JW (1987): Contribuição à recharacterização de *Phyllocaulis soleiformis* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Veronicellidae). *Revta bras Zool* 4: 215-233.
- Bertschinger RB, Thomé JW (1988): Contribuição à recharacterização de *Phyllocaulis variegatus* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae). *Veritas* 33: 573-592.
- Bonilha SMP (1991): Criação em laboratório, preferência alimentícia e reprodução de *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny, 1835), *Belocaulus angustipes* (Heynemann, 1885) e *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Mollusca; Gastropoda; Veronicellidae). Porto Alegre, *Dissertação de Mestrado em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul*, pp.1-170.
- Calvo IS (1987): Rádulas de gastrópodes marinhos brasileiros. Rio Grande, Editora da FURG.
- Cazzaniga NJ, Ronda CD (1986): Las babosas Veronicellidae más australes de la Argentina (Gastropoda). *Spheniscus* 2: 19-22.
- Chaves DL, Thomé JW (1997). Observações sobre a constituição da mandíbula e rádula de *Belocaulus angustipes* (Heynemann, 1885)(Mollusca: Gastropoda: Veronicellidae). *Biociências* 1:219-229.
- Götting KJ (1985): Kiefer und Radula in der Gattung *Phyllocaulis* Colosi (Pulmonata: Soleolifera: Veronicellidae). *Archiv für Molluskenkunde* 116: 47-56.
- Hoffmann H (1925): Die Vaginuliden. Ein Beitrag zur Kenntnis ihre Biologie, Anatomie, Systemat, geographischen Verbreitung und Phylogenie. *Z Naturw* 61: 1-374.
- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1989). Histologia do esôfago e papo de *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca; Gastropoda; Veronicellidae). *Ciênc e Cult* 41: 1000-1004.
- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1990): Microanatomia e histologia do sistema digestivo de *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda, Veronicellidae) – III. Tubo digestivo (do estômago ao reto). *Caatinga* 7: 76-104.
- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1991a): Microanatomia e histologia do sistema digestivo de *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca; Gastropoda; Veronicellidae). II. Bulbo bucal. *Acta Biol Leopold* 13: 17-48.
- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1991b): Microanatomia e histologia do sistema digestivo de *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca; Gastropoda; Veronicellidae). IV. Glândula salivar. *Comun Mus Ciênc PUCRS* 4: 16-27.
- Lindeman RH, Merenda PF, Gold R (1980): *Introduction to bivariate and multivariate analysis*. New York, Scott, Foresman & Co.
- Lopes VLR, Thomé JW (1973): Aulas práticas de zoologia, I. Dissecção de um molusco gastrópode desprovido de concha. *Iheringia* 3: 34-45.

- Martins RS (1998): Aspectos da morfologia e biometria de cinco formas de *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny, 1835) (Gastropoda; Soleolifera; Veronicellidae). Porto Alegre, *Dissertação de Mestrado em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul*, pp.1-123.
- Monteiro LR, Reis SF (1999): *Princípios da morfometria geométrica*. Ribeirão Preto, Holos.
- Peres-Neto PR (1995): Introdução a análises morfométricas. In: Peres-Neto PR, Valentin JL, Fernandez F, eds., *Tópicos em Tratamentos de Dados Biológicos. Oecologia Brasiliensis, vol II*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, pp. 57-89.
- Rao CR (1952): *Advanced statistical methods in biometric research*. New York, Wiley.
- Runham NW (1975): Alimentary canal. In: Fretter V, Peake J, eds., *Functional Anatomy and Physiology*. Academic Press, London, pp. 53-104.
- Runham NM, Thornton PR (1967): Mechanical wear of the gastropod radula: a scanning electron microscope study. *Jour Zool* 153: 445-452.
- Santos PH, Thomé JW (2000): Estudo biométrico e avaliação da conversão alimentar das espécies de *Phyllocaulis boraceiensis* Thomé e *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny) (Veronicellidae, Gastropoda, Mollusca). *Biociências* 8: 85-101.
- Soares BM (2001): Variabilidade morfológica de *Phyllocaulis variegatus* (Semper, 1885) (Mollusca, Gastropoda, Veronicellidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre, *Dissertação de Mestrado em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul*, pp. 1-86.
- Solem A (1972): Malacological applications of scanning electron microscopy. II. Radular structure and functioning. *Veliger* 14: 327-336.
- Sordelli F (1874): Anatomia del *Vaginulus bonariensis*, Strobel. *Bibltca Malacologica* 4: 107-120.
- Tatsuoka MM (1971): *Multivariate analysis*. New York, Wiley.
- Thomé JW (1965): *Phyllocaulis renschi*, eine neue Veronicellidae (Mollusca) aus Rio Grande do Sul/Brasilien. *Zool Anzeiger* 174: 202-209.
- Thomé JW (1976): Revisão do gênero *Phyllocaulis* Colosi, 1922 (Mollusca; Veronicellidae). *Iheringia* 49: 67-90.

PADRÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO DO DNA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Phyllocaulis* (MOLLUSCA: GASTROPODA: VERONICELLIDAE) OCORRENTES NO CENTRO SUL DO BRASIL

Georgina Gonçalves Mansur¹
Jarbas Rodrigues de Oliveira²
José Willibaldo Thomé³

Resumo

A análise do táxon Veronicellidae, que utiliza métodos morfológicos e anatômicos, freqüentemente conduz a resultados controversos. Por esta razão, foi investigada a existência de sítios para enzimas de restrição na estrutura molecular das espécies *Phyllocaulis soleiformis*, *P. boraceiensis*, *P. tuberculosus* e *P. variegatus*, comparadas à *Belocaulus angustipes* e *Sarasinula linguaeformis* a partir da técnica RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). A espécie *P. soleiformis*, devido à sua variabilidade morfológica, foi desmembrada em quatro formas diferentes (A, B, C e D). Em todos os espécimes analisados, os resultados obtidos indicaram uma grande similaridade do peso molecular do produto amplificado. A análise conjunta dos fragmentos das catorze enzimas de restrição utilizadas permitiu verificar maiores semelhanças entre os exemplares de *P. soleiformis*, formas A e D e entre os espécimes de *Sarasinula linguaeformis* e *P. soleiformis*, forma B. A forma C de *P. soleiformis* foi a que apresentou a maior similaridade da região do ITS1 com os demais táxons, evidenciando que a região é altamente conservada nos grupos estudados. A árvore de distância gênica apresentou a forma C como um elo de ligação entre os dois principais agrupamentos.

Palavras chave: *Phyllocaulis*, *Belocaulus*, *Sarasinula*, Veronicellidae, RFLP, enzimas de restrição.

¹ Doutoranda em Biociências, PUCRS.

² Laboratório de Biofísica, PUCRS.

³ Laboratório de Malacologia, PUCRS

ABSTRACT

PATTERN OF RESTRICTION FRAGMENTS IN SPECIES OF THE GENUS *PHYLLOCAULIS* (MOLLUSCA: GASTROPODA: VERONICELLIDAE) FOUND IN SOUTHERN BRAZIL.

The application of anatomical and morphological methods in the analysis of the taxon Veronicellidae has frequently produced controversial results. For this reason it was decided to investigate the existence of restriction enzymes sites in the molecular structure of the species, *P. soleiformis*, *P. boraceiensis*, *P. tuberculosus*, *P. variegatus*, *Belocaulus angustipes* and *Sarasinula linguaeformis* by means of the RFLP technique (Restriction Fragment Length Polymorphism). The species *Phyllocaulis soleiformis* was subdivided into four, A, B, C, and D due to its variable morphology. In each of the specimens analysed the results indicated a high degree of similarity of the molecular weight of the amplified product. The comparative analysis of the fragments of fourteen restriction enzymes used confirmed greater similarity between the examples *P. soleiformis*, forms A and D as well as between the species *Sarasinula linguaeformis* and *P. soleiformis* form B. Form C of *P. soleiformis* was that which presented greatest similarity in the ITS1 region in relation to the other taxons, showing that the region is highly conservative in the groups studied. The gene distance tree showed that form C to be a link between the two principal groups.

Key Words: *Phyllocaulis*, *Belocaulus*, *Sarasinula*, Veronicellidae, RFLP, restriction enzymes.

Introdução

Os moluscos da família Veronicellidae Gray, 1840 têm sido alvo de muitos estudos por manterem uma estreita relação com o homem, principalmente no que diz respeito à saúde e à agricultura. Estes animais apresentam características próprias que os diferenciam dos demais grupos do Filo Mollusca, entre elas, a ausência de concha inclusive na fase embrionária (Hoffmann, 1925).

Apesar da extensa bibliografia com estudos e notícias sobre a família de distribuição pantropical, sente-se a falta de um estudo mais abrangente que permita diferenciar os táxons e, ainda, as dúvidas na controversa classificação da família entre os gastrópodes (Thomé, 1993).

Historicamente, o uso de caracteres morfológicos tem se mostrado insuficiente para a resolução de grupos mais complexos onde os caracteres diferenciais não são evidentes, como é o caso de espécies crípticas, espécies incipientes ou superespécies (Mayr, 1998). Segundo este autor, a despeito da variabilidade oriunda do caráter genético único de cada indivíduo, existe uma unidade específica da espécie, relativa ao DNA de quase todas elas. Essa onipresença da espécie coloca um grande número de problemas de origem e de sentido, problemas esses que ocupam uma parte muito expressiva das atuais pesquisas na biologia.

O surgimento de técnicas eletroforéticas propiciou, inicialmente, a execução de trabalhos que relacionassem diferenças populacionais com o uso de isoenzimas (Wright & File, 1968; Jelnes, 1977; Brock, 1978; Buth, 1984; Jelnes & Pointier, 1985; Mascara & Morgante, 1991). Atualmente, o avanço tecnológico associado ao desenvolvimento de novos métodos permite o estudo mais preciso e aprofundado do material genético de grupos que apresentam diferenças interespecíficas ou intraespecíficas, fornecendo subsídios relevantes para a sistemática (Steinbruck et al., 1991; Schlegel et al., 1991; Lenaers & Bhaud, 1992; Dohlen & Moran, 1995; Armbruster, 1995; Jacob, 1996; Trontelj et al., 1996).

Por apresentarem diversos tipos de problemas em nível taxonômico, os moluscos têm levado os sistematas a utilizarem dados obtidos através da região do genoma que inclui seqüências que codificam para RNA ribossomal em suas análises filogenéticas (Tilliers, 1992; Winnepenninx et al., 1996; Rosenberg et al., 1997). Alguns autores como Armbruster (1995), por exemplo, utilizam dados morfológicos e

dados moleculares, que têm se revelado eficientes para o esclarecimento taxonômico das diferenças populacionais do gênero *Cochlicopa* Férussac, 1821. O autor analisou a forma da concha e a anatomia genital juntamente com dados moleculares, propondo uma hipótese evolutiva para o grupo.

Atualmente, a técnica de PCR-RFLP vem sendo intensivamente utilizada (Caldeira et al. 1998; Vidigal et al., 1998; Byrne, 1999; Triantafyllidis et al., 1999) para detectar a diferenciação molecular entre os gêneros e estimar a distância genética dos mesmos. Diferenças no tamanho evidenciam mutações na seqüência nucleotídica dos segmentos de DNA estudados e refletem diferenças na locação da respectiva seqüência de reconhecimento e, portanto, diferenças na seqüência de genes dos táxons comparados (Steinbrück et al., 1991).

Apesar da reconhecida importância dos veronicelídeos nas áreas médica e agrícola (Graeff-Teixeira et al., 1989; Andrews, 1989), ainda se carece de dados que levem ao esclarecimento definitivo da classificação do grupo. Espécies dos gêneros *Phyllocaulis*, *Belocaulus* e *Sarasinula* foram amplamente estudadas sob diferentes aspectos: morfológico, morfométrico, histológico, etológico, citogenético e parasitológico (Pitoni & Thomé, 1981; Bertschinger & Thomé, 1987, 1988; Leal-Zanchet et al., 1989, 1990, 1991a, 1991b; Bonilha, 1991; Mansur, 1993; Silva & Thomé, 1995; Bonetti & Graeff-Teixeira, 1998; Martins, 1998; Santos & Thomé, 2000; Soares, 2001). Tais estudos permitiram a definição de estruturas morfológicas que conduzem à caracterização da maioria das espécies desses três gêneros.

Algumas dessas investigações envolveram comparações entre populações de *P. variegatus* (Soares, 2001) e entre populações de *P. soleiformis* (Martins, 1998) e constataram diferenças sutis, porém constantes, a ponto de permitirem a formação de subgrupos dentro da mesma espécie. No entanto, com base apenas em caracteres morfológicos, não tem sido possível explicar tais variabilidades.

Mayr (1998) afirma que a existência de espécies morfológicamente idênticas, mas isoladas reprodutivamente, vem sendo registrada desde o século XVIII, tendo sido denominadas de “variedades” ou “raças biológicas” e, desde então, este assunto tem gerado controvérsias nos diversos campos da biologia. Segundo este autor, uma vez que a maioria das espécies se origina como geograficamente isolada, poder-se-ia esperar que certa percentagem de populações isoladas se situe no limite entre

subespécies, espécies e espécies bem constituídas e, nesses casos, a denominação passa a ser, necessariamente, arbitrária. Para este autor, se acreditamos em evolução, devemos admitir a existência desses “casos de fronteira”.

Até o momento, nada se pode afirmar sobre a existência de isolamento reprodutivo entre as populações de *P. variegatus* ou de *P. soleiformis*, mas com base em sua reduzida mobilidade e, portanto, baixa capacidade de dispersão natural, a possibilidade de fluxo gênico entre as populações torna-se reduzida. Segundo Futuyma (1992), quanto menor o fluxo gênico, maior a variabilidade interpopulacional e, quanto mais distanciadas se encontrarem as populações, maiores serão as diferenças entre os caracteres fenotípicos.

A Fig. 1 apresenta fotografias de exemplares das espécies *Belocaulis angustipes* (Heynemann, 1885), *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885), *Phyllocaulis boraceiensis* Thomé, 1976, *P. tuberculosus* (Martens, 1868), *P. variegatus* (Semper, 1885) e *P. soleiformis* (Orbigny, 1835) (formas A, B, C e D). Nesta última espécie, pode-se evidenciar a variação no colorido do noto, um dos caracteres externos que permitem a formação de subgrupos. Estas espécies e formas foram analisadas molecularmente e um mapa físico de restrição foi estabelecido com o propósito de verificar as distâncias taxonômicas.



Fig. 1. Fotografia da região dorsal de exemplares de *Belocaulus angustipes*, *Sarasinula linguaeformis*, *Phyllocaulis boraceiensis*, *P. tuberculosus*, *P. variegatus* e *P. soleiformis* A, *P. soleiformis* B, *P. soleiformis* C e *P. soleiformis* D.

Materiais e Métodos

A biologia molecular tem se mostrado uma eficiente ferramenta no diagnóstico de diferentes grupos de seres vivos e, neste trabalho, foi utilizada a técnica de PCR-RFLP para a análise de moluscos dos gêneros *Sarasinula*, *Belocaulus* e *Phyllocaulis*. Os animais capturados vivos foram mantidos no vivário do Laboratório de Malacologia da PUCRS. A alimentação dos animais consistia basicamente de alface (*Lactuca sativa*), couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*) e cenoura (*Daucus carota*). A análise molecular foi realizada, inicialmente, na Eberhard–Karls- Universität Tübingen, na Alemanha, tendo seqüência, posteriormente, nos laboratórios da PUCRS. Os animais utilizados foram sacrificados por criogênese, sendo etiquetados e acondicionados em gelo para transporte.

Para a análise molecular, além desses animais, também foram utilizados espécimes fixados e conservados em álcool 70%, pertencentes às coleções do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB-RS) e Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS.

Os locais de procedência dos espécimes coletados para este estudo são: *B. angustipes* procedentes de Viamão e Gravataí (RS); *S. linguaeformis* oriundos de Nova Itaberaba (SC); *P. boraceiensis*, de São Paulo (SP); *P. variegatus*, de Canela (RS); *P. tuberculosus* de Viamão (RS) e *P. soleiformis* oriundas de Porto Alegre, Viamão, Riozinho, São Borja e Santana do Livramento (RS). Esta última espécie foi separada em 5 formas (A, B, C, D e E) segundo características morfológicas externas e internas (Martins, 1998). A forma E, com registros de ocorrência para a cidade de Pelotas (RS) em 1966, não foi coletada durante as amostragens de campo e esteve presente em apenas dois lotes da MCT/RS da coleção de moluscos sob os n.º 1972, contendo 24 indivíduos, e n.º 1959, com sete indivíduos. Devido à impossibilidade de extração de rDNA dos espécimes, face à forma de preservação e à possível extinção das populações na área de ocorrência, optou-se por desconsiderar a forma E das análises.

Material fixado examinado

FZB-RS - *P. tuberculosus* - 1218 (3 ex.): Morro do Coco, Viamão, RS; 1906 (2 ex.): Morro do Coco, Viamão, RS; *P. boraceienseis* - 30.136 (1 ex.): São Paulo, SP; 3262 (2 ex.): São Paulo, SP; *Belocaulus angustipes* - 30.279 (16 ex.): Sapucaia do Sul, RS.

MCT - *Sarasinula linguaeformis* - lotes 7957 (4 ex.), 7958 (5 ex.), 7959 (3 ex.), 7960 (8 ex.), 7961 (3 ex.): Nova Itaberaba, SC; *Phyllocaulis variegatus* - lotes 6784 (3 ex.), 7962 (1 ex.), 7963 (1 ex.), 7983 (5 ex.): Canela, RS; *P. boraceienseis* - lotes 7965 (3 ex.), 7966 (1 ex.), 7967 (1 ex.), 7968 (5 ex.): São Paulo, SP; *Belocaulus angustipes* - lotes 7969 (1 ex.): Viamão, RS; 7970 (5 ex.): Gravataí, RS; 7971 (5 ex.) Gravataí, RS; 7972 (2 ex.): Gravataí, RS; 7973 (1 ex.): Viamão, RS; 7974 (2 ex.): Gravataí, RS; *Phyllocaulis soleiformis* - lotes 7977 (2 ex.), 7978 (2 ex.), 7979 (6 ex.): Camaquã, RS (forma A); 7980 (5 ex.) Santana do Livramento, RS (forma B); 7981 (6 ex.) Riozinho, RS (forma C); 7982 (6 ex.): São Borja, RS (forma D).

Análise Molecular

Segundo Steinbrück et al. (1991) o 18S rDNA é um mosaico evolutivo que consiste de regiões conservadas e parcialmente conservadas e, por isso, pode ser usado tanto em organismos muito relacionados quanto em organismos mais distantes. Assim, utilizaram-se seqüências específicas conservadas em eucariontes, amparadas nas extremidades conservadas do gene ribossomal 18S rDNA, realizando-se ampliações *in vitro* de regiões codificadas com alta fidelidade. Estas ampliações foram iniciadas com pequenas quantidades de DNA, usando-se os protocolos da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (Fig. 2).

a) Extração do rDNA

O rDNA foi extraído do pé e do tegumento dos animais, conforme descrito por Vidigal et al. (1994) e Steiner et al. (1995), com modificações. O tecido de cada animal foi lisado mecanicamente com nitrogênio líquido. Adicionou-se tampão de lise [50mM NaCl, 50mM EDTA, 1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)] e Proteinase K na concentração final de 50µl/µl. Esta mistura ficou incubada durante 12 horas a 37°C. Logo após, adicionou-se 1 volume de fenol saturado em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM; pH 8,0), misturado e centrifugado por 10 minutos a 13.000 rpm.

Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se a este 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:25:1), misturando-se manualmente (Hayashi & Chiba, 2000). Centrifugou-se por 10min a 13.000 rpm e retirou-se o sobrenadante. Após a adição de fenol/clorofórmio (1:1), a mistura foi centrifugada e o sobrenadante foi retirado, sendo adicionados, desta vez, 0,1 volume de Acetato de Sódio 3M (AcNa) e 2 volumes de Etanol Absoluto. Para a precipitação do DNA a -20°C durante, pelo menos, 3 horas. Decorrido este tempo, centrifugou-se por 20 minutos a 13.000 rpm e retirou-se o Etanol sem remover o *pellet* (DNA). Deixou-se o *pellet* secar, sendo o mesmo eluído em água. Outra técnica utilizada para a extração do DNA foi o uso do Kit Qiagen para sangue e tecidos (Chou et al., 1992).

A quantificação do DNA foi feita através do espectrofotômetro com o comprimento de onda em 260nm e a análise da integridade da amostra, feita através de uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Neste caso, a agarose foi dissolvida e aquecida em solução tampão TBE 1x (Tris-HCl 0,1M; Ácido Bórico 0,083M; EDTA 0,001M – pH 8,3) e corada com 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Brometo de Etídio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$).

b) Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O PCR consiste na obtenção de cópias de um segmento de DNA. Estas cópias podem ser obtidas por amplificação através de um sistema de síntese de DNA consecutiva. Para um volume total de 50 μl , foram utilizados na reação: 4,5mM MgCl_2 ; 20mM tampão Tris+HCl 10x pH 8,0; 2,0mM dNTP's; 1,5 μg DNA; 0,6pmol/ μl de cada *primer* e 5U/50 μl de Taq-polimerase (Gibco).

O segmento de DNA a ser amplificado foi separado em fitas simples (desnaturação) a temperatura de 94°C e, em seguida, a mistura foi resfriada à temperatura de 60°C e, logo após, incubada com a enzima (Taq DNA polimerase) a 72°C , juntamente com os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfatos (Dntp's). Participaram, ainda, da reação: MgCl_2 (Cloreto de Magnésio) que otimiza a reação da Taq DNA polimerase e solução tampão que mantém o pH.

Para obtenção de cópias múltiplas de DNA, utilizaram-se 30 ciclos e as temperaturas ideais para cada fase (desnaturação, hibridização e síntese enzimática) foram calculadas conforme a constituição dos *primers*. A região amplificada foi ITS1, partindo-se do 18S rDNA até 5-8S rDNA com a utilização dos seguintes *primers*:

FORWARD 5' - TAA CAA GGT TTC CGT AGT GAA – 3'

REVERS 5' - GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC – 3'

Utilizaram-se esses *primers* por serem altamente conservados na evolução dos seres vivos (Hillis & Davis, 1987; Trontelj et al., 1996; Hayashi & Chiba, 2000).

A temperatura média [$T_m = 2^\circ\text{C} (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ (\text{G}+\text{C})$] para a otimização do primeiro *primer* foi de 58°C e para o segundo *primer*, 62°C. Para a hibridização (anelamento) foi utilizada a média entre estas temperaturas, ou seja, 60°C.

A visualização da Reação em Cadeia de Polimerase foi realizada, em uma primeira fase, através de gel de agarose 1% corado com 0,5µl/ml de brometo de etídio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) e, na segunda fase, com gel de poliacrilamida a 8%, utilizando, como corante, nitrato de prata (AgNO_3).

c) Análise RFLP (polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)

Para avaliar as possíveis enzimas que poderiam fornecer RFLP informativo das regiões ITS1, catorze enzimas de restrição foram usadas: Hae III, Hinc II, Hinf I, Eco RI, Hpa I, Rsa I, Bam HI, Xho I, Dra I, Pvu II, Cla I, Nsi I, Mbo II, Bsm I (Gibco) . Foram utilizadas 10U de enzima para cada reação. O produto amplificado foi submetido à incubação durante quatro horas, com cada uma das enzimas de restrição e seu respectivo tampão. Concluída a corrida eletroforética, as bandas que apareceram nos géis de agarose foram visualizadas através de uma lâmpada UV (ultra-violeta) e, em poliacrilamida, foram visualizadas com luz branca direta. As análises foram realizadas a partir de registros fotográficos.

A corrida eletroforética da porção do rDNA amplificado foi repetida por, no mínimo, três vezes em cada espécie e em cada forma de *P. soleiformis*, resultando sempre em um mesmo padrão de fragmentos de restrição. Aqueles resultados decorrentes de erros ocasionais, durante a reação de amplificação pela Taq-polimerase, foram descartados tão logo constatados, não prejudicando a análise dos fragmentos de restrição.

Com base em metodologia adotada por Caldeira et al. (1998), realizou-se a análise quantitativa dos perfis de restrição – as bandas observadas em cada “digestão”

foram comparadas com todas as demais do mesmo gel. Uma matriz de táxons e caracteres foi construída com base na presença ou ausência de cada fragmento. Os fragmentos mais facilmente distinguíveis foram considerados para análise. Com o *software* FreeTree para Windows foi calculada a distância genética usando-se o coeficiente de Nei e Li. Foram construídas as matrizes de distâncias gênicas e as árvores através do método *neighbor-joining*(NJ), para comparar espécies e populações. A validade das árvores foi assegurada pelo método *bootstrap* com 1000 pseudoreplicações.

Resultados e Discussão

As amplificações da região ITS1 de *P. soleiformis*, *P. boraceiensis*, *P. tuberculatus*, *P. variegatus*, *B. angustipes* e *S. linguaeformis* resultaram em um produto de, aproximadamente 720 pares de bases. Nas Fig. 2 e 3 são apresentados o produto amplificado por PCR e RFLP dos fragmentos pela ação das enzimas de restrição em gel de agarose e poliacrilamida. Na Tabela 1 pode-se observar a grande similaridade no peso molecular do produto amplificado entre todas as espécies investigadas, situando-se entre 670 e 770 pares de bases. O rDNA amplificado pôde ser digerido por dez das catorze enzimas de restrição utilizadas. As enzimas Pvu II, Eco RI, Xho I e Nsi I não encontraram sítios de restrição em nenhum dos espécimes analisados e, portanto, não foram consideradas nos resultados.

O perfil RFLP mais informativo, para o propósito de identificação dos grupos, foi produzido pela enzima Hae III, que encontrou sítios de restrição em todos os táxons. Isto indica que o local de ação desta enzima representa uma porção conservada do rDNA nos grupos estudados. Ainda que algumas bandas de baixo peso molecular apareçam divididas em alguns dos táxons, é possível identificar o perfil global do grupo.

A enzima Mbo II só não encontrou sítio de restrição em *P. tuberculatus*, possivelmente porque esta porção do DNA ribossomal sofreu alterações no decorrer de seu processo evolutivo.

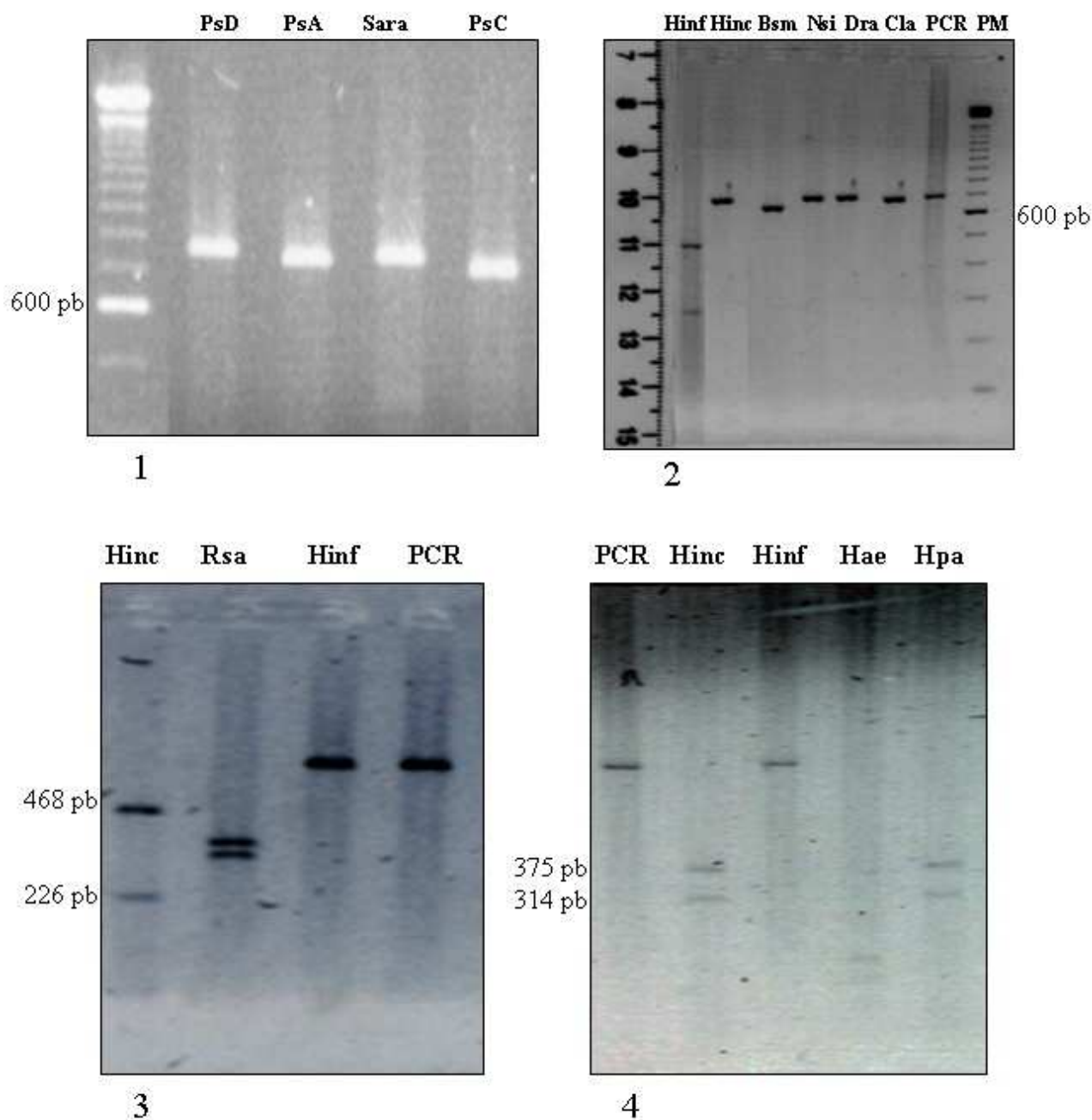


Fig. 2. Fotografias de géis de agarose 1%. 1) Análise por PCR do produto amplificado de *Phyllocaulis soleiformis* D (PsD), *P. soleiformis* A (PsA), *Sarasinula linguaeformis* (Sara), *P. soleiformis* C (PsC); 2) Análise por RFLP dos fragmentos obtidos pela ação das enzimas de restrição em PsC; 3) Análise por RFLP dos fragmentos obtidos pela ação das enzimas de restrição em PsA; 4) Análise por RFLP dos fragmentos obtidos pela ação das enzimas de restrição em *P. tuberculosis*.

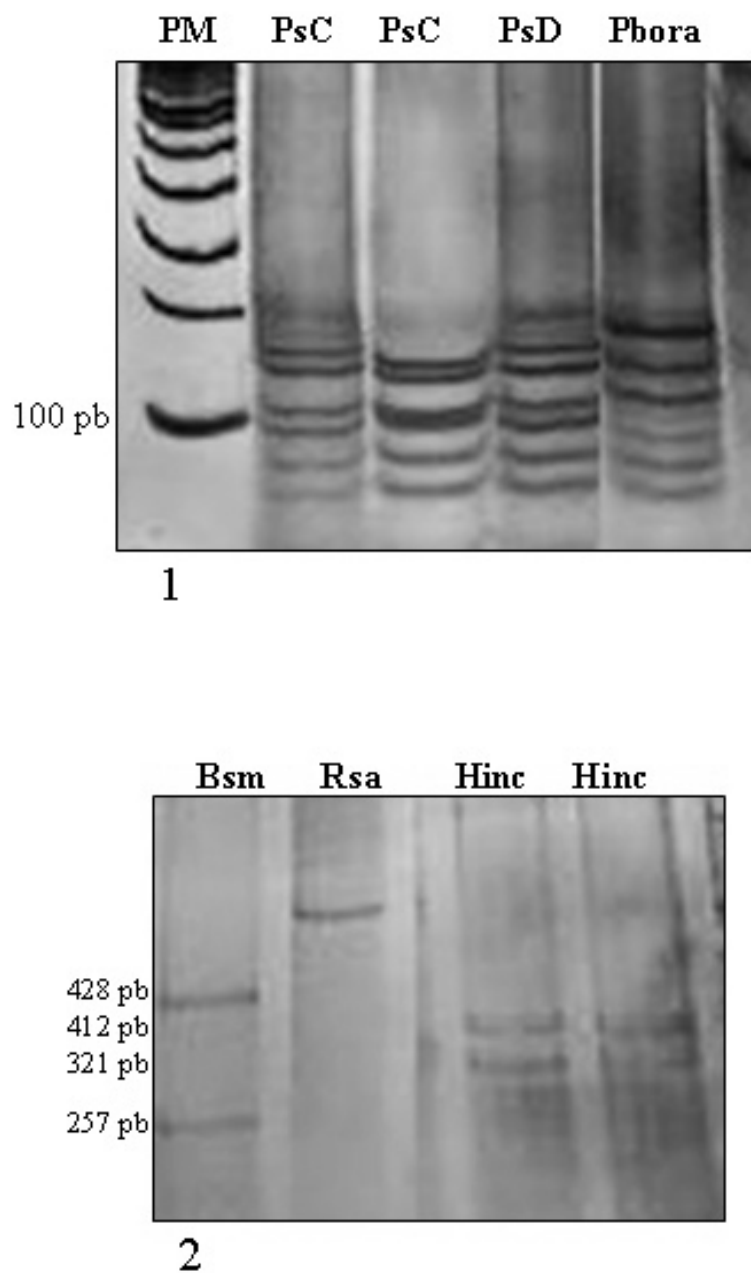


Fig. 3. Fotografias de géis de poliacrilamida 8% mostrando fragmentos de restrição obtidos pela técnica de RFLP 1) enzima Hae III em *Phyllocaulis soleiformis* C, *P. soleiformis* C, *P. soleiformis* D (PsD) e *P. boraceiensis*; 2) enzimas de restrição em *P. soleiformis* B.

P. soleiformis B difere das demais formas de *P. soleiformis* e de todas as demais espécies pela ação das enzimas Rsa I que, apenas neste grupo, não encontrou sítio de restrição e Bsm I, que digeriu o produto amplificado apenas nesta forma. O fato destas enzimas agirem de maneira diferenciada em *P. soleiformis* B e da enzima Dra I encontrar os mesmos sítios de restrição apenas nesta forma e em *S. linguaeformis* faz com que *P. soleiformis* B se distancie das demais formas de sua espécie e fique mais próxima de *S. linguaeformis*.

A enzima Cla I só encontrou sítio de restrição em *P. variegatus*, indicando que a ação desta enzima se dá em uma porção do rDNA que sofreu alteração ao longo do processo evolutivo, o que pode expressar um caráter específico.

As demais enzimas não evidenciaram um padrão claro de modo a permitir a caracterização consistente de cada espécie ou do gênero *Phyllocaulis*. Assim, a enzima Bam HI digeriu o produto amplificado de *P. soleiformis* D, de *P. boraceiensis* e de *S. linguaeformis*; a enzima Hinc II encontrou sítio de restrição em todas as formas de *P. soleiformis*, com exceção da forma C, distinguindo-a das demais; as enzimas Hinf I e Hpa digeriram o produto amplificado nas formas B e C, mas não nas formas A e D de *P. soleiformis*. A ação da Hinf I também ocorreu em *P. variegatus*, *B. angustipes* e *S. linguaeformis* e da Hpa I em *P. tuberculosus* e *S. linguaeformis*. Os resultados obtidos com essas enzimas tornaram complexa qualquer explicação de proximidades entre os grupos.

Para a construção da matriz de dados, utilizou-se o peso molecular do número de fragmentos. Devido ao fato de alguns fragmentos de restrição apresentar pesos moleculares muito baixos, optou-se por estabelecer “classes de pesos”, ou seja, fragmentos com peso molecular entre 100 e 199 pb foram classificadas como ocorrentes na faixa de peso molecular 100 e, assim, sucessivamente. A análise totalizou 81 bandas. A partir da tabela dos táxons e caracteres construída em código binário (1/0), segundo a presença (1) ou ausência (0) de cada banda, foi gerada uma matriz de distância de Nei e Li, com todas as enzimas de restrição (Tabela 2).

Tabela 2. Matriz de distâncias genética construída a partir do coeficiente de distância de Nei e Li. *Phyllocaulis soleiformis* A (PsA), *P. soleiformis* B (PsB), *P. soleiformis* C (PsC), *P. soleiformis* D (PsD), *P. boraceiensis* (Pbora), *P. tuberculosus* (Ptube), *P. variegatus* (Pvarie), *Belocaulus angustipes* (Belo) e *Sarasinula linguaeformis* (Sara).

	PsA	PsB	PsC	PsD	Pbora	Ptube	Pvarie	Belo	Sara
PsA	-	0,8095	0,4666	0,2000	0,5384	0,6363	0,8666	0,8461	0,8000
PsB		-	0,7500	0,8333	0,8181	0,8000	0,7500	0,8181	0,5172
PsC			-	0,5555	0,6250	0,5714	0,6666	0,7500	0,7482
PsD				-	0,5000	0,7142	0,7777	0,8750	0,7391
Pbora					-	0,6666	0,8750	0,7142	0,8095
Ptube						-	0,8571	0,6666	0,8947
Pvarie							-	0,6250	0,6521
Belo								-	0,7142
Sara									-

A árvore de distâncias genética resultante (Fig. 3) sugere que *P. soleiformis* formas A e D são, dos táxons analisados, aqueles que apresentam os perfis enzimáticos de restrição mais semelhantes, com maior valor de confiança. A forma B de *P. soleiformis* apresenta as maiores diferenças enzimáticas quando comparada às demais formas de sua espécie, aproximando-se, primeiramente, de *S. linguaeformis* e, secundariamente, do grupamento formado pelas espécies *P. variegatus* e *B. angustipes*.

A forma C de *P. soleiformis* apresentou a maior similaridade da região do ITS1 com os demais táxons, demonstrando que a região é altamente conservativa nos grupos estudados. A análise comparativa do peso de cada banda, considerando-se as catorze enzimas de restrição, permitiu a constatação de que esta forma possui uniformidade no número de sítios de restrição que são comuns (presença ou ausência), não apenas com as demais formas de *P. soleiformis*, mas também, com as demais espécies do gênero e com os outros gêneros investigados. A forma C de *P. soleiformis* possui 27 caracteres comuns com a forma A, praticamente, a mesma quantidade encontrada em *P. tuberculosus* (26), *S. linguaeformis* (23) e *B. angustipes* (22). Isto demonstra que a forma C sofreu poucas alterações ao longo de seu processo evolutivo.

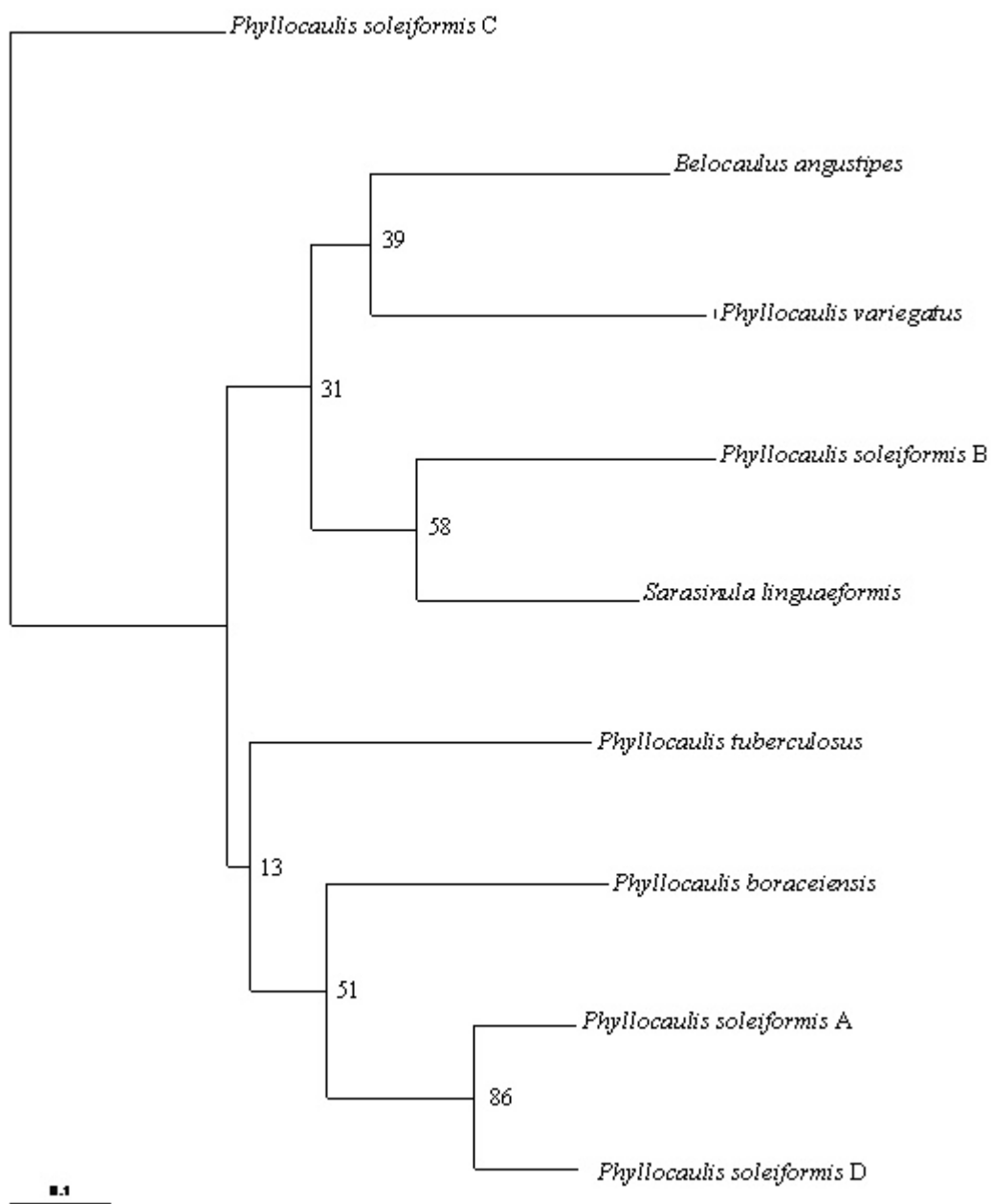


Fig. 3. Árvore dos táxons construída através do método *neighbor-joining*. Os números nos ramos são os valores de *bootstrap* com base em 1000 repetições.

A Tabela 3 apresenta o número de caracteres comuns entre os táxons.

Tabela 3. Quantificação de caracteres comuns entre os táxons. *Phyllocaulis soleiformis* A (PsA), *P. soleiformis* B (PsB), *P. soleiformis* C (PsC), *P. soleiformis* D (PsD), *P. boraceiensis* (Pbora), *P. tuberculosus* (Ptube), *P. variegatus* (Pvarie), *Belocaulus angustipes* (Belo) e *Sarasinula linguaeformis* (Sara).

	PsA	PsB	PsC	PsD	Pbora	Ptube	Pvarie	Belo	Sara
PsA	-	17	27	31	27	27	21	23	18
PsB		-	16	14	16	18	16	16	19
PsC			-	24	24	26	21	22	23
PsD				-	26	24	20	20	17
Pbora					-	26	22	24	17
Ptube						-	22	26	17
Pvarie							-	24	19
Belo								-	19
Sara									-

Mayr (1998) afirma que o princípio da evolução mosaica, segundo o qual os diversos componentes do fenótipo podem evoluir a taxas altamente desiguais, também se aplica à evolução molecular. A forma C de *P. soleiformis*, por possuir a região de ITS1 semelhante aos outros táxons, parece não ter sofrido grandes modificações ao longo do processo evolutivo, enquanto a forma B e as formas A e D, parecem ter se diferenciado a taxas maiores no decorrer deste processo.

Martins (1998) ao investigar *P. soleiformis* constatou que a forma C se diferencia das demais pela coloração do noto, largura do corpo, região de afastamento dos nervos pediosos e paliais, comprimento da espata em relação ao pênis, largura da glândula, diâmetro da papila de glândula peniana e localização de penetração do ducto de ligação na bolsa de copulação. Além desses caracteres diferenciais a autora constatou que *P. soleiformis* forma C possui a menor fórmula radular dentre todas as formas analisadas. É possível que alguns indivíduos de uma população tenham sido transportados para novas regiões geográficas, submetidos a diferentes pressões seletivas e isto, associado à variabilidade genética e à baixa capacidade de dispersão pode ter conduzido às diferenças genéticas verificadas nos diferentes grupos de *P. soleiformis*.

A variabilidade na morfologia externa e interna de *P. soleiformis* forma C, apenas inferida em trabalhos anteriores (Bertschinger & Thomé, 1987; Martins, 1998), foi confirmada através da biologia molecular, provando ser esta uma técnica segura no entendimento da sistemática de grupos complexos como os Veronicellidae. Os resultados pioneiros aqui obtidos permitem propor a revalidação do nome *P. renschi* Thomé, 1965.

Referências

- Andrews KL (1989): Slug pests of dry beans in Central América. In: Henderson I, ed., Proceedings of a Symposium organised by the BCPC in association with the Malacological Society of London and held at the University of Surrey. *Slug and Snails World Agriculture*, Guildford, Thornton Heath: British Crop Council, pp. 85-89.
- Armbruster G. (1995): Die mitteleuropäischen *Cochlicopa*-Arten (Gastropoda: Pulmonata: Cochlicopidae) – eine untersuchung zur formenvielfalt anhand schalenmorphometrischer, genitalanatomischer und molekularer merkmale. Tübingen, *Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*, 136p.
- Bertschinger RBE, Thomé JW (1987): Contribuição à recharacterização de *Phyllocaulis soleiformis* (D'orbigny, 1835) (Gastropoda, Veronicellidae). *Revta bras Zool* 4: 215-233.
- Bertschinger RB, Thomé JW (1988): Contribuição à recharacterização de *Phyllocaulis variegatus* (Semper, 1885) (Gastropoda, Veronicellidae). *Veritas* 33: 573-592.
- Bonetti VCBDO, Graeff-Teixeira C (1998): *Angiostrongylus costaricensis* and the intermediate hosts: observations on elimination of L3 in the mucus and inoculation of L1 through the tegument of molluscs. *Revta Soc Bras Medic Trop* 31: 289-294.
- Bonilha SMP (1991): Criação em laboratório, preferência alimentícia e reprodução de *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny, 1835), *Belocaulus angustipes* (Heynemann, 1885) e *Sarasinula linguaeformis* (Semper, 1885) (Mollusca; Gastropoda; Veronicellidae). Porto Alegre, *Dissertação de Mestrado em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul*, 170pp.
- Brock V (1978): Morphological and biochemical criteria for the separation of *Cardium glaucum* (Bruguère) from *Cardium edule* (L.). *Ophelia* 17:207-14.
- Buth DG (1984): The application of electrophoretic data in systematic studies. *Ann. Ver. Ecol. Syst.* 15:501-22.
- Byrne M (1999): High genetic identities between three oil mallee taxa, *Eucalyptus kochii* ssp. *kochii*, ssp. *plenissima* and *E. horistes*, based on nuclear RFLP analysis. *Heredity* 82: 205-211.
- Caldeira RL, Vidigal THDA, Paulinelli ST, Simpson AJG, Carvalho OS (1998): Molecular identification of similar species of the genus *Biomphalaria* (Mollusca: Planorbidae) determined by a Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length polymorphism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 219-225.
- Chou Q, Russel M, Birch DE, Raymond J, Bloch W (1992): Prevention of PRE-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy- number amplifications. *Nucl. Acids. Research* 20: 1717-1723.

- Dohlen CDV, Moran NA (1995): Molecular phylogeny of the homoptera: a paraphyletic taxon. *Journal of Molecular Evolution* 41:211-223.
- Futuyma DJ (1992): *Evolutionary biology*. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética/CNPq.
- Graeff-Teixeira C, Thomé JW, Pinto SCC, Camillo-Coura L, Lenzi HL (1989): *Phyllocaulis variegatus* - an intermediate host of *Angiostrongylus costaricensis* in south Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 65-68.
- Hayashi M, Chiba S (2000): Intraspecific diversity of mitochondrial DNA in the land snail *Euhadra peliomphala* (Bradybaenidae). *Biol Jour Linn Society* 70: 391-401.
- Hillis DM, Davis SK (1987): Evolution of the 28S Ribosomal RNA Gene in Anurans: Regions of variability and their phylogenetic implications. *Molec Biol Evol* 4: 117-125.
- Hoffmann H (1925): Die Vaginuliden. Ein Beitrag zur Kenntnis ihrer Biologie, Anatomic, Systematik, geographischen Verbreitung und Phylogenie (Fauna et Anatomia Ceylanica, 3°, n.1). *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft* 61: 1-374.
- Jacob NK (1996): Phylogenetic Studies on the Internal Transcribed Spacers of Ribosomal RNA Genes in Hypotrichous Ciliates: Congruence of Morphogenetic, Biochemical and Molecular Markers. *Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften, Tübingen*, 127 pp.
- Jelnes JE (1977): An electrophoretic character useful in the distinction between *Bulinus tropicus* and *B. permembranaceus* (Gastropoda, Planorbidae). *Steenstrupia* 4:139-41.
- Jelnes JE, Pointier JP (1985): Taxonomie expérimentale de *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) - III. Mobilités enzymatiques considérées comme éléments de diagnostic pour les *Biomphalaria* antillais. Étude de sept systèmes enzymatiques. *Malacologia* 26:137-143.
- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1989): Histologia do esôfago e papo de *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca; Gastropoda; Veronicellidae). *Ciência e Cultura* 41: 1000-1004.
- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1990): Microanatomia e histologia do sistema digestivo de *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda, Veronicellidae) – III. Tubo digestivo (do estômago ao reto). *Caatinga* 7: 76-104.
- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1991a): Microanatomia e histologia do sistema digestivo de *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca; Gastropoda; Veronicellidae). II. Bulbo bucal. *Acta Biol Leopold* 13: 17-48.

- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1991b): Microanatomia e histologia do sistema digestivo de *Phyllocaulis soleiformis* (Mollusca; Gastropoda; Veronicellidae). IV. Glândula salivar. *Com Mus Ciênc PUCRS* 4: 16-27.
- Lenaers G, Bhaud M (1992): Molecular phylogeny of some polychaete annelids: na initial approach to the Atlantic-Mediterranean Speciation Problem. *J. Mol. Evol.* 35:429-435.
- Mansur GG (1993): *Sarasinula* (Veronicellidae, Gastropoda): biologia e sistemática das espécies de ocorrência neotropical. Porto Alegre, *Dissertação de Mestrado em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul*, 57pp.
- Martins RS (1998): Aspectos da morfologia e biometria de cinco formas de *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny, 1835) (Gastropoda; Soleolifera; Veronicellidae). Porto Alegre, *Dissertação de Mestrado em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul*, 123pp.
- Mascara D, Morgante JS (1991): Enzyme polymorphism and genetic structure of *Biomphalaria tenagophila* (Gastropoda, Planorbidae) populations: founder effect. *Rev. Brasil. Genet.* 14:631-44.
- Mayr (1998): *O desenvolvimento do pensamento biológico*. Brasília, Editora Universidade de Brasília, pp. 1-1107.
- Pitoni VLL, Thomé JW (1981): Revisão do gênero *Belocaulus* Hoffmann, 1925 (Mollusca, Veronicellidae). *Revta Bras Biol* 41: 585-93.
- Rosenberg G, Tillier S, Tillier A, Kuncio GS, Hanlon RT, Masselot M, Williams CJ (1997): Ribosomal RNA phylogeny of selected major clades in the Mollusca. *J. Moll. Stud.* 63:301-309.
- Santos PH, Thomé JW (2000): Estudo biométrico e avaliação da conversão alimentar das espécies de *Phyllocaulis boraceiensis* Thomé e *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny) (Veronicellidae, Gastropoda, Mollusca). *Biociências* 8: 85-101.
- Schlegel M, Steinbruck G, Kramer M, Brockmeyer V (1991): Restriction fragment patterns as molecular markers for species identification and phylogenetic analysis in the genus *Enchytraeus* (Oligochaeta). *Z. zool. Syst. Evolut.* 29:362-372.
- Silva MGO, Thomé JW (1995): Microanatomia da vesícula seminal, complexo de fertilização e glândula acessória de *Belocaulus angustipes* (Heynemann, 1885) (Gastropoda; Veronicellidae; Soleolifera). *Biociências* 3: 95-112.
- Soares BM (2001): Variabilidade morfológica de *Phyllocaulis variegatus* (Semper, 1885) (Mollusca, Gastropoda, Veronicellidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. Porto Alegre, *Dissertação de Mestrado em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul*, 86pp.

- Steinbruck G, Schlegel M, Kramer M, Kupfermann H, Willig S (1991): Identification and phylogenetic analysis of four *Tisbe* species (Copepoda, Harpacticoida) using DNA restriction site variation. *Z. zool. Syst. Evolut* 29:393-408.
- Steiner JJ, Poklemba CJ, Fjellstrom RG, Elliot LF (1995): A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Research* 23: 2569-2570.
- Thomé JW (1965): *Phyllocaulis renschi*, eine neue Veronicellidae (Mollusca) aus Rio Grande do Sul/Brasilien. *Zool Anz* 174: 11-19.
- Thomé JW (1993): Estado atual da sistemática dos Veronicellidae (Mollusca, Gastropoda) americanos, com comentários sobre sua importância econômica, ambiental e na saúde. *Biociências* 1: 61-75.
- Tilliers S, Masselot M, Philippe H, Tillier, A (1992): Phylogénie moléculaire des Gastropoda (mollusca) fondée sur le séquençage partiel de l'ARN ribosomique 28S. *Evolution*. C.R. Acad. Sci. Paris, 314:79-85.
- Triantafyllidis A, Abatzopoulos TJ, Economids PS (1999): Genetic differentiation and phylogenetic relationships among Greek *Silurus glanis* and *Silurus aristotelis* (Pisces, Siluridae) populations, assessed by PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA segments. *Heredity* 82: 503-509.
- Trontelj P, Sket B, Dovc P, Steinbrück G (1996): Phylogenetic relationships in European erpobdellid leeches (Hirudinea: Erpobdellidae) inferred from restriction-site data of the 18S ribosomal gene and ITS2 region. *Syst Evol Research* 34: 85-93.
- Vidigal, THDA, Neto ED, Carvalho OS, Simpson AJG (1994): *Biomphalaria glabrata*: extensive genetic variation in Brazilian isolates revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Exper Parasitol* 79: 187-194.
- Vidigal THDA, Spatz L, Nunes DN, Simpson AJG, Carvalho, OS, Neto ED (1998): *Biomphalaria* spp: identification of the intermediate snail hosts of *Schistosoma mansoni* by Polymerase Chain Reaction Amplification and restriction enzyme digestion of the ribosomal RNA gene intergenic spacer. *Exper Parasitol* 89: 180-187.
- Winnepenninx B, Backeljau T, Wachter RD (1996): Investigation of molluscan phylogeny on the basis of 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 13:1306-1317.
- Wright CA, File SK (1968): Digestive gland esterases in the genus *Bulinus* (Mollusca, Planorbidae) *Comp. Biochem. Physiol.* 27:871-874.

CONCLUSÕES

1. Biometria de rádulas no gênero *Phyllocaulis* (Mollusca, Gastropoda, Veronicellidae)
 - 1.1. A forma da mandíbula e o número de ripas não se mostraram caracteres sistemáticos válidos na diferenciação das formas e espécies do gênero por apresentarem grandes variações dentro dos mesmos grupos, não mantendo uniformidade.
 - 1.2. Os dentes da rádula mostraram-se eficazes para a diferenciação das espécies no gênero estudado. A biometria dos dentes laterais e raquidianos permitiu diferenciar a forma C de *Phyllocaulis soleiformis* das outras formas (A, B, D e E) e das outras espécies, através de três diferentes procedimentos estatísticos (Análise de Variância Multivariada, Análise das Funções Discriminantes Canônicas e Análise Cluster).
2. Padrão dos fragmentos de restrição em espécies do gênero *Phyllocaulis* (Mollusca, Gastropoda, Veronicellidae) ocorrentes no centro sul do Brasil.
 - 2.1. As amplificações da região ITS1 de *P. soleiformis* (formas A, B e D), *P. boraceiensis*, *P. tuberculosus*, *P. variegatus*, *Belocaulus angustipes* e *Sarasinula linguaeformis* resultaram em um produto de, aproximadamente, 720 pares de bases. O produto amplificado de menor valor foi encontrado na *Phyllocaulis soleiformis* forma C que apresentou 673 pares de bases.
 - 2.2. Com a utilização da porção ITS1 nas amplificações e a submissão à digestão de quatorze enzimas de restrição, foi possível constatar que a forma C de *P. soleiformis* apresenta a maior similaridade entre os táxons, razão pela qual se apresenta como um elo de ligação entre os dois grandes grupos, formados pelas demais espécies e formas, na árvore de distância gênica.

2.3. Os resultados das duas investigações autorizam a proposição da revalidação do nome *Phyllocaulis renschi* para a forma C de *P. soleiformis*.

APÊNDICE

Apêndice 1. Matriz de presença (1) e ausência (0) referente aos fragmentos de restrição para os táxons *Phyllocaulis soleiformis* forma A (PsA), *P. soleiformis* forma B (PsB), *P. soleiformis* forma C (PsC), *P. soleiformis* forma D (PsD), *P. boraceiensis* (Pbora), *P. tuberculosus* (Ptube), *P. variegatus* (Pvarie), *Belocaulus angustipes* (Belo), *Sarasinula lingueformis* (Sara). Na coluna da esquerda são apresentadas cada uma das enzimas com as respectivas “classes de pesos”.

	PsA	PsB	PsC	PsD	Pbora	Ptube	Pvarie	Belo	Sara
Hinc4	1	1	0	1	0	0	0	0	0
Hinc3	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Hinc2	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Bsm4	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Bsm2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Mbo4	1	0	1	1	0	0	0	0	1
Mbo3	0	1	0	0	1	0	0	0	0
Mbo2	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mbo1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Cla4	1	0	1	1	1	0	1	0	1
Cla2	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Rsa4	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Rsa3	1	0	1	1	1	1	0	0	0
Rsa2	0	0	1	0	0	1	1	1	1
Rsa1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
Dra3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Dra2	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Dra1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Hinf4	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Hinf3	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Hinf2	0	1	1	0	0	0	1	0	1
Hinf1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Bam4	0	0	0	1	1	0	0	0	0
Bam3	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Bam2	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Bam1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Hae3	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Hae2	0	1	0	0	0	0	1	1	1
Hae1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
Hpa4	0	1	1	0	0	0	0	0	1
Hpa3	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Hpa2	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Hpa1	0	0	1	0	0	0	0	0	0