



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Isabela Cristina Brito Gonçalves

**Sistemática e taxonomia do gênero *Heleobia* Stimpson, 1865  
(Caenogastropoda, Truncatelloidea) do estado do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2020

Isabela Cristina Brito Gonçalves

**Sistemática e taxonomia do gênero *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda,  
Truncatelloidea) no estado do Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutora, ao Programa de  
Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Sonia Barbosa dos Santos

Rio de Janeiro

2020



Isabela Cristina Brito Gonçalves

**Sistemática e taxonomia do gênero *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda,  
Truncatelloidea) no estado do Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para  
obtenção do título de Doutora, ao Programa de  
Pós-Graduação em Ecologia e Evolução, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2020.

Orientadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Sonia Barbosa dos Santos  
Departamento de Zoologia – UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Lena Geise  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Alexandra Elaine Rizzo  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Suzete Rodrigues Gomes  
Instituto Oswaldo Cruz

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Monica Lemos Ammon Fernandez  
Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2020

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais (*In memoriam*), que me deram o dom da vida, permitindo a realização desse momento.

À minha avó Maria Izabel, que apesar das dificuldades, enxergou um futuro diferente através do estudo. Seu apoio, amor, investimento e confiança me estimularam até aqui.

A todas as pessoas que conseguiram se multiplicar e “dar conta” dessa difícil tarefa de estudar e trabalhar, por acreditar que era possível apesar de todos os sacrifícios.

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus por essa força superior que me impulsionou para que eu conseguisse chegar até aqui.

À minha orientadora, madrinha de casamento, amiga e mãe acadêmica, Dra. Sonia Barbosa dos Santos, pela confiança, suporte, incentivo e amizade cultivada ao longo desses 12 anos. Mesmo depois de ser chamada para assumir lugar conquistado em concurso público, disse que eu não poderia desistir e que eu conseguiria. MUITO OBRIGADA POR TUDO!!!

Ao meu esposo, companheiro e amigo Igor Miyahira, você, tanto quanto eu, sabemos que seu apoio e parceria foram indispensáveis para finalização desse trabalho. Obrigada pela imensa paciência, pelas inúmeras cobranças, pelas broncas e por tantas vezes abrir mão de viagens e passeios para estar do meu lado nesse momento tão difícil. Sei que não foi nada fácil!

À minha família, Maria Izabel, Walmyr Junior, Cleonice, Paloma, Márcio, Igor, José Evanildo, Lúcia, Renato, Lael, Isabel e Eric por todo carinho, apoio e compreensão por todas as vezes que não visitei ou não almocei com vocês por conta da tese. Agora não tenho mais desculpas!!!

À toda equipe, atual e antiga, do Laboratório de Malacologia da UERJ: Amilcar Brum, Ester Rios, Gleisse Kelly Meneses, Mariana Castro, Jaqueline Lopes, Regiana Salgado, Renata Ximenes, Renata Maia, Maria Eduarda Ximenes, Ximena Ovando, Victor Rodrigues, Geovana Marchi, Letícia Fernandes e Suellen Ferreira. Um muito obrigada por toda ajuda nas coletas e curadoria. Além de tudo, o que seria sem os cafezinhos, as festinhas e o bom humor de todos os integrantes desse laboratório?!

Ao Dr. Amilcar Brum, que doou alguns de seus sábados e domingos para ir ao laboratório preparar algumas rádulas comigo!

À Dra. Ximena Ovando, que me ensinou parte do que aprendi em biologia molecular, desde as etapas de extração até o sequenciamento no LDD (Laboratório de Diagnóstico por DNA na UERJ).

À Maria Eduarda Rocha Ximenes, que em tão pouco tempo de estágio, entrou no meu ritmo acelerado e embarcou nesse desafio. Agradeço por ter me aceitado como sua co-orientadora, e por tantas trocas, aprendizados e energia! E bota energia nisso!!! Quantas conchas fotografadas e medidas para as análises morfométricas! Obrigada por cair de paraquedas em minha vida e me fazer tão bem! Foi uma injeção de ânimo e coragem para continuar a jornada!

Às pequenas coletoras Ágatha Lacerda, minha afilhada, e Clarice Gino, filha de uma amiga, que nos momentos de lazer na Lagoa de Maricá e na Praia da Bandeira, ajudaram nas coletas dos caramujos da dinda e da tia Isabela!

Aos meus amigos do trabalho, minha antiga escola do ensino fundamental, e meu atual local de trabalho, a Escola Municipal Cientista Mário Kroeff. No início foi um pouco difícil aceitarem uma “estranha” com 40 hs naquele local, mas que ao longo dos anos, grandes amizades foram surgindo: Carol, Simone, Hendy, Eduardo, Leandro, Fernanda, Mariana, Marquinhos, Márcia, André, Auristela, Jéssica e Zilmar, obrigada pelos inúmeros cafés após a escola, os incentivos para terminar a tese, as surpresas no aniversário, as ajudas nas feiras de ciências e feira cultural! Agradeço minha diretora Marcia Garrido, que já foi minha professora de Matemática, e sempre apoiou e permitiu a minha ida aos congressos e trabalhos de campo do doutorado. Além dos inúmeros ajustes no horário para eu ganhar mais um tempo para fechar essa tese. E claro, não posso esquecer de agradecer os meus alunos, com tantas responsabilidades em meio a tão pouca idade, sempre carinhosos, calmos e amigos quando eu não estava muito bem.

Meus sinceros agradecimentos a Janine Arruda, Gonzallo Collado, Christian Clavijo, Caroline Porto, Carolina Viana, Fabrizio Scarabino, Sebastian Seba, Gleisse Kelly e Eduardo Lacerda que abriram as portas de suas casas para os trabalho de campo. Mesmo para quem é da área, aceitar os visitantes cheios de bichos e roupas de campo sujas não é pra qualquer um!!!

Aos meus amigos Gleisse Kelly, Luiz Eduardo, Igor Miyahira, Mariana Castro, Caroline Porto, Aline Santos, Thaís Brainer, Fernando Ferreira, Carolina Viana, Simone Maciel e Hendy Helena por toda ajuda psicológica nesses anos puxados da minha vida!

Agradeço também a todos os integrantes do LDD-UERJ que me receberam e me permitiram um conhecimento da biologia até então distante da minha formação, as moléculas. Obrigada à profa. Dayse Aparecida da Silva, Laís Oliveira, Yasmin Rollemberg, Carol, Holly e Silvia por me ajudarem a encontrar as ponteiras ou reagentes, ou mesmo ceder o horário do termociclador para caminhar mais rápido. Todo apoio desde a extração até o sequenciamento foi fundamental para realização dessa etapa.

Aos pesquisadores e curadores das instituições que me enviaram fotografias, emprestaram ou doaram materiais para complementação da tese: Dr. Alexandre Dias Pimenta do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Dr. Luis Ricardo Simone e Simone Lira da Cruz do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Dr. Gustavo Darrigran e Mônica Tassara do Museu de La Plata, Dra. Janine Oliveira Arruda e MSc. Ingrid Heydrich da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Dra. Suzete Rodrigues Gomes e Silvana Thiengo do

Instituto Oswaldo Cruz, Adriana Dias da Universidade Estadual de Campinas, Dr. Robert Hershler do Smithsonian National Museum of Natural History, Dr. Jonathan Ablett do Natural History Museum, London, Dr. Paul Callomon da Academy of Natural Sciences of Drexel University, Philadelphia e Dr. Jochen Gerber do Field Museum of Natural History of Chicago.

À Dra. Lena Geise por não só abrir as portas do seu laboratório, como também me entregar as chaves para utilizá-lo em qualquer horário para as fotografias em sua poderosa lupa com a câmera acoplada!

À Dra. Maria Cristina Pons da Silva, que gentilmente me recebeu na Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul para me passar um pouco de seu conhecimento sobre *Heleobia*, mesmo estando atualmente em outra área.

Ao Dr. Robert Hershler pela doação de seu livro que é a maior referência da família Cochliopidae.

Ao Dr. Gonzallo Gollado, que após me conhecer no CLAMA (Congresso Latinoamericano de Malacologia), me convidou para visitar sua universidade de origem em Chillán, no Chile. Após dois meses do congresso, lá estive por 20 dias aprendendo sobre biologia molecular com sua aluna MSc. Karina Aguayo, e preparando rádulhas para a microscopia eletrônica de varredura.

Aos uruguaiois Fabrício Scarabino e Sebastián Seba que após o CLAMA, me convidaram juntamente com Gonzalo para coletarmos *Heleobia* no Uruguai. Ainda me fizeram dirigir de Piriápolis ao Chuí, e depois voltar a Montevideú por três dias de coleta! Confesso que no início fiquei receosa de coletar e passar o final de semana com três estrangeiros que acabara de conhecer no congresso: afinal as dificuldades de comunicação devido à língua, diferentes personalidades, poderiam resultar em insucesso. Mas acabei indo pelas referências positivas de amigos conhecidos (rsrsrsrs)!!! E foi um campo memorável com direito inclusive ao cartão de crédito bloqueado na locadora do carro!

Aos membros titulares da banca: Dras. Lena Geise, Alexandra Rizzo, Monica Ammom e Suzete Rodrigues, e aos suplentes Dra. Valéria Gallo e Dr. Cléo Dilnei, um SUPER OBRIGADA por terem aceitado o convite e recebido um trabalhão em suas férias merecidas! Agradeço a consideração e contribuições.

Aos funcionários do Departamento de Zoologia e da Secretaria do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, em especial ao Fernando Teixeira e Jessica Azevedo por toda ajuda para o cumprimento do PED (Programa de Estágio Docente) e nas autorizações de entrada na UERJ nos finais de semana.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Química da UERJ e a técnica Jéssica Machado pela obtenção das imagens com toda a paciência para encontrar os melhores ângulos e imagens das ródulas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução (PPGEE) da UERJ pelas aulas ministradas.

À secretaria do PPGEE, em especial a Verusca por toda ajuda nessa reta final de formulários e pareceres das reuniões do CPG. Agradeço também a Sonia (Soninha) pelas dúvidas referentes a bolsas, trancamentos e defesa.

À minha querida UERJ, que ao longo desses 12 anos contribuiu para minha formação acadêmica e profissional. Sou muito grata por tudo que conquistei, principalmente amigos e um casamento (rsrsrsrs)!!!

À toda equipe do CEADS (Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável) sempre solícita no agendamento do campo, ao motorista mais famoso da UERJ, o Cláudio, por todo carinho e conversas na Rodovia Rio Santos, e a equipe de Vila Dois Rios: Dona Graça, Kelly, D. Tereza, sempre fui recebida com um enorme carinho. Obrigada também pelo lanche almoço sempre caprichado!!!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida durante os quatro anos que muito auxiliaram nos trabalhos de campo e análises moleculares.

À Faperj, à Capes e ao CNPq, que através de diversos financiamentos de projetos, concedidos à minha orientadora, proporcionaram coletas em diversas localidades do Brasil.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho, muito obrigada!!!

Eu acredito é na rapaziada  
Que segue em frente  
E segura o rojão  
Eu ponho fé no pé da moçada  
Que não foge da fera  
E enfrenta o leão  
Eu vou à luta com essa juventude  
Que não corre da raia  
À troco de nada  
Eu vou no bloco  
Dessa mocidade  
Que não tá na saudade  
E constrói a manhã desejada

*E vamos à Luta- Gonzaguinha*

## RESUMO

GONÇALVES, Isabela Cristina Brito. **Sistemática e taxonomia do gênero *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda, Truncatelloidea) do estado do Rio de Janeiro**. 2020. 137f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

*Heleobia* Stimpson, 1865 é um gênero de gastrópodes de água doce e/ou salobra incluídos na família Cochliopidae. O gênero engloba 104 espécies, sendo a maioria delas na América do Sul. Apesar da diversidade e ampla distribuição, o gênero encontra-se ainda envolto em diversos problemas taxonômicos. Desta forma, o presente trabalho apresenta quatro objetivos principais: 1- Examinar uma espécie não descrita de *Heleobia* para a Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil; 2- Investigar as espécies incluídas no grupo “australis” do gênero *Heleobia* através de dados morfológicos e moleculares; 3- Comparar *Heleobia davisii* e *H. robusta* por meio da taxonomia integrativa, e 4 - Apresentar a diversidade e distribuição de *Heleobia* spp. no estado do Rio de Janeiro. A realização do trabalho envolveu a revisão da literatura, consultas a coleções científicas e coletas em localidades de interesse. Os animais coletados foram anestesiados com mentol, e fixados em etanol 70° para dissecação, e etanol 96° para a análise molecular, e encontra-se tombado na Coleção de Moluscos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A análise molecular seguiu o protocolo de extração do DNA a partir de fenolclorofórmio ou CTAB (*cetyl trimethyl ammonium bromide*), e a região amplificada do DNA mitocondrial foi Citocromo Oxidase I. A partir da fotografia das conchas em estereomicroscópio, realizou-se a morfometria a fim de investigar dimorfismo sexual e variação morfológica entre as espécies. A análise da espécie não descrita da Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ revelou uma morfologia peniana distinta: região mais distal de aspecto mamiliforme, portando uma glândula apócrina proeminente em seu lado côncavo, além de apresentar dimorfismo sexual acentuado na morfometria da concha, e distância genética de 4% para a espécie mais próxima, *Heleobia parchappii*. As espécies incluídas no grupo “australis” são semelhantes nos aspectos morfológicos, como já observado na literatura, e também nos moleculares, sugerindo que se trata de uma única entidade biológica. A comparação entre *H. davisii* e *H. robusta* revelou grande semelhança na morfologia da concha, do pênis, na rádula e na análise molecular, indicando que *H. robusta* é sinônima com *H. davisii*. Além disso, a análise filogenética apresentou uma proximidade das populações estudadas com *H. piscium* em um clado separado das demais espécies de *Heleobia* analisadas, indicando um provável gênero distinto. A diversidade atual de *Heleobia* no estado do Rio de Janeiro é composta de seis espécies: *H. australis*, *H. parchappii*, *H. davisii*, *Heleobia* sp. 1, *Heleobia* sp. 2 e *Heleobia* sp. 3, distribuídas em oito das nove Regiões Hidrográficas (RH) do estado, concentrados na RH VI: Região Hidrográfica Lagos São João. Dessa forma, a utilização de ferramentas morfológicas e moleculares se mostrou apropriada para investigar as questões taxonômicas de *Heleobia*. O trabalho contribuiu para o conhecimento deste gênero, com dados inéditos para as espécies brasileiras, podendo servir de subsídio para estudos ecológicos e de conservação.

Palavras-chave. Água doce. Estuarino. Gastropoda. Cochliopidae. Diversidade. Distribuição.

## ABSTRACT

GONÇALVES, Isabela Cristina Brito. **Systematic and taxonomy of the genus *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda, Truncatelloidea) of the state of Rio de Janeiro**. 2020. 137f. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

*Heleobia* is a genus of freshwater and/or brackish gastropods included in the family Cochliopidae. The genus comprise 104 species, most of them in South America. Although of the diversity and wide distribution, the genus is involved in several taxonomic problems. In this way, the present work has four main objectives: 1- To examine an unspecified species of *Heleobia* for Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brazil; 2- Investigate the species included in the group “australis” of the genus *Heleobia* based morphological and molecular data; 3- Compare *Heleobia davisii* and *H. robusta* through of the integrative taxonomy, and 4 – To present the diversity and distribution of *Heleobia* spp. in the state of Rio de Janeiro. Carrying out of the work involved the literature review, visited in scientific collections and field surveys in relevant locations. The animals collected were anesthetized with menthol, and fixed in 70° ethanol for dissection, and 96° ethanol for molecular analysis, and it is located in the Mollusks Collection at the State University of Rio de Janeiro. Molecular analysis followed the DNA extraction protocol from phenolchloroform or CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), and the amplified region of the mitochondrial DNA was Cytochrome Oxidase I. From the photograph of the shells in a stereomicroscope, morphometry was performed in order to investigate sexual dimorphism and morphological variation between species. The analysis of the species not described from Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ revealed a distinct penile morphology: a more distal region with a nipple aspect, with a prominent apocrine gland on its concave side, in addition to presenting marked sexual dimorphism in the shell morphometry, and distance genetics of 4% for the closest species, *Heleobia parchappii*. The species included in the “australis” group are similar in morphological aspects, like observed in the literature, and also in molecular ones, suggesting that it is a single biological entity. The comparison between *H. davisii* and *H. robusta* revealed great similarity in the morphology of the shell, the verge, the radula and in the molecular analysis, indicating that *H. robusta* is synonymous with *H. davisii*. In addition, the phylogenetic analysis showed a proximity of the populations studied with *H. piscium* in a clade separate from the other species of *Heleobia* analyzed, indicating a probable distinct genus. The current diversity of *Heleobia* in the state of Rio de Janeiro is composed of six species: *H. australis*, *H. parchappii*, *H. davisii*, *Heleobia* sp. 1, *Heleobia* sp. 2 and *Heleobia* sp. 3, distributed in eight of the nine Hydrographic Regions (RH), concentrated in RH VI: Lagos São João Hydrographic Region. Thus, the use of morphological and molecular tools proved to be appropriate to investigate the taxonomic issues of *Heleobia*. The work contributed to the knowledge about this genus, with new data for the Brazilian species. In addition, it can be used as a subsidy for ecological studies and conservation.

Keywords: Freshwater. Brackish. Gastropoda. Cochliopidae. Diversity. Distribution.

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
1	<b>ESTADO DA ARTE DO GÊNERO <i>Heleobia</i> Stimpson, 1865</b> .....	13
1.1	<b>Sistemática</b> .....	13
1.2	<b>Taxonomia</b> .....	15
1.3	<b>Conquiliomorfologia</b> .....	22
1.4	<b>Morfologia Externa e Interna</b> .....	23
1.5	<b>Reprodução e estratégias reprodutivas</b> .....	26
1.6	<b>Estudos Moleculares e o DNA barcoding</b> .....	28
1.7	<b>Diversidade e distribuição geográfica</b> .....	29
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	36
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	<b>Objetivo geral</b> .....	37
3.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	37
4	<b>RESULTADOS</b> .....	38
4.1	<b>Categoria 1: Uma espécie não descrita de <i>Heleobia</i> (Truncatelloidea: Cochliopidae) para o estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil</b> .....	39
4.2	<b>Categoria 2: <i>Heleobia australis</i> (Truncatelloidea: Cochliopidae) na América do Sul: uma espécie de ampla distribuição ou três espécies locais?</b> .....	55
4.3	<b>Categoria 3: Revisão taxonômica entre <i>Heleobia davisii</i> Silva e Thomé, 1985 e <i>Heleobia robusta</i> Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004 (Truncatelloidea: Cochliopidae) com base em dados morfológicos e moleculares</b> .....	84
4.4	<b>Categoria 4: Diversidade e Distribuição Geográfica de <i>Heleobia</i> (Gastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) para o estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil</b> .....	105
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	128
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	130
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	131

## INTRODUÇÃO

Mollusca é o segundo filo em número de espécies viventes, sendo precedido apenas pelo filo Arthropoda (LYDEARD et al., 2004). Estima-se entre 70.000 a 76.000 espécies atuais descritas (ROSENBERG, 2014), porém, esse número pode ser maior ou menor, pois depende das diferentes interpretações dos taxonomistas (agregadores ou separadores) sobre o que é uma espécie (FAURBY et al., 2016). Além disso, revisões taxonômicas agregando dados morfológicos, biogeográficos, ecológicos e moleculares, a chamada taxonomia integrativa (PADIAL et al., 2010), resultam em espécies com extensas listas sinonímicas ou, com a separação de espécies consideradas únicas.

De todas as classes do filo, Gastropoda é a mais diversa e abundante, com estimativa de 60.000 espécies viventes e 15.000 espécies fósseis, ocorrendo nos ambientes marinhos, de água doce e terrestres (FRANSOZO; NEGREIRO-FRANSOZO, 2016).

Os gastrópodes de água viventes estão presentes em todos os continentes com exceção da Antártida. Apesar de terem ampla distribuição, são considerados o grupo de animais aquáticos mais impactados em todo o mundo (LYDEARD et al., 2004). As principais ameaças são a perda de hábitat, como poluição e assoreamento, e a introdução de espécies invasoras, que podem levar à diminuição ou extinção das espécies nativas (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; STRONG et al., 2008).

Quanto à diversidade dos gastrópodes límnicos, existem aproximadamente 4000 espécies válidas distribuídas em 26 famílias (ROSENBERG, 2014), entre os clássicos prosobrânquios (operculados, respiração branquial) e pulmonados (não-operculados, respiração aérea, “pulmonar”). Dentre estas famílias, destacamos Cochliopidae (Caenogastropoda: Littorinimorpha: Truncatelloidea), que engloba o gênero *Heleobia* Stimpson, 1865, com 104 espécies descritas, presentes na Europa, África, Ásia e América do Sul. Apesar de amplamente distribuído nos sistemas límnicos e estuarinos, o conhecimento ainda é incipiente, principalmente em relação aos aspectos morfológicos, ecológicos. Isso se deve a carência de pesquisas na área de gastrópodes límnicos e estuarinos, além da dificuldade em estudar esses animais pelo tamanho reduzido, medindo entre 3 e 9 mm de comprimento.

## 1 ESTADO DA ARTE DO GÊNERO *Heleobia* Stimpson, 1865

### 1.1 Sistemática

De acordo com a classificação mais atual, o gênero *Heleobia* está incluído no clado Caenogastropoda, nome proposto pela primeira vez por Cox (1960), em oposição aos Archaeogastropoda. Embora o nome tenha sido adotado por diversos autores subsequentes, uma definição objetiva foi proposta pela primeira vez com base em sinapomorfias por Haszprunar (1985). Embora criticada por alguns autores que questionaram a monofilia de Caenogastropoda (Graham, 1985; Ponder, 1990), estudos posteriores têm comprovado a sua monofilia, tanto através de dados morfológicos (HASZPRUNAR, 1988; BIELER, 1990, 1992; PONDER; LINDBERG, 1997) como moleculares (COLGAN et al., 2007). De acordo com Ponder e Lindberg (2008), este clado compreende 60% dos gastrópodes vivos, correspondendo aproximadamente aos mesogastrópodes e aos neogastrópodes da antiga subclasse “Prosobranchia” (COLGAN et al., 2007; STRONG et al., 2008).

Segundo Simone (2011), Caenogastropoda apresenta como sinapomorfias: glândula pediosa imersa na musculatura do pé e respectivo sulco ocupando toda a margem anterior do pé; septo separando a hemocele da massa visceral; osfrádio alongado; rim com cavidade oca, com par de lobos, um deles circundando o intestino; nefróstoma isolado na membrana entre rim e cavidade palial; um par de pregas dorsais internas na cavidade bucal; musculatura peri-bucal reunida em dois feixes; dois pares de músculos tensores dorsais da rádula; diminuição para um par de músculos tensores ventrais da rádula; um par de músculos protratores ventrais do odontóforo; um par de dentes laterais e dois pares de dentes marginais na rádula; um par de pregas longitudinais no esôfago; diminuição das alças intestinais viscerais; desenvolvimento do vaso deferente palial; anel nervoso posicionado mais posteriormente, no nível médio da massa bucal; e gânglios bucais bem definidos (apesar dos termos serem subjetivos, esses foram utilizados por Simone (2011) em seu trabalho).

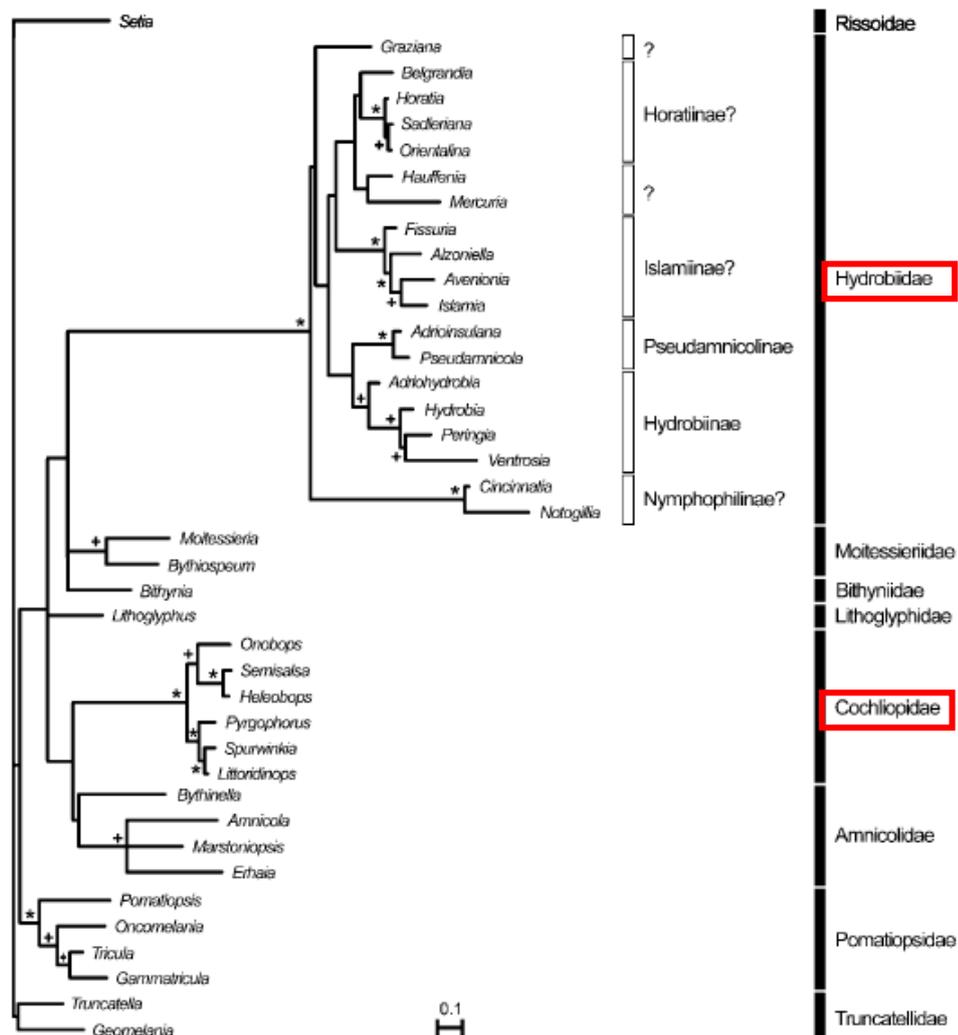
Hoje o clado Caenogastropoda é reconhecido como válido, mas as relações internas ainda estão longe de serem resolvidas, especialmente pela ausência de dados morfológicos e moleculares em muitas espécies das 136 famílias consideradas válidas (COLGAN et al., 2007; OSCA et al., 2015).

Segundo Bouchet e Rocroi (2005) e Strong et al. (2008), o clado Caenogastropoda está dividido em quatro clados menores: Architaenioglossa, Sorbeoconcha, Littorinimorpha e

Neogastropoda, cujas definições variam de acordo com os autores (STRONG et al., 2008; PONDER et al., 2008; SIMONE, 2011). Atualmente, Littorinimorpha abriga 22 superfamílias (CRISCIONE; PONDER 2013; WORMS, 2019), incluindo Truncatelloidea, superfamília onde se situam os Cochliopidae, que por sua vez, abriga o gênero *Heleobia*.

Tradicionalmente, *Heleobia* estava alocado na subfamília Cochliopinae dentro de Hydrobiidae (MARCUS; MARCUS, 1965, GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; HERSHLER; THOMPSON, 1992; SILVA, 2003; SIMONE, 2006.). Wilke et al. (2001), através de dados moleculares, elevaram o status da subfamília a família, passando a Cochliopidae (Figura 1). Nesse trabalho, os autores utilizaram sequências de *Heleobia* oriundas da Europa, além dos gêneros *Heleobops* Thompson, 1968 e *Onobops* Thompson, 1968, que pertencem à mesma subfamília.

Figura 1 - Posição sistemática das famílias Cochliopidae e Hydrobiidae na antiga superfamília Rissoidae.



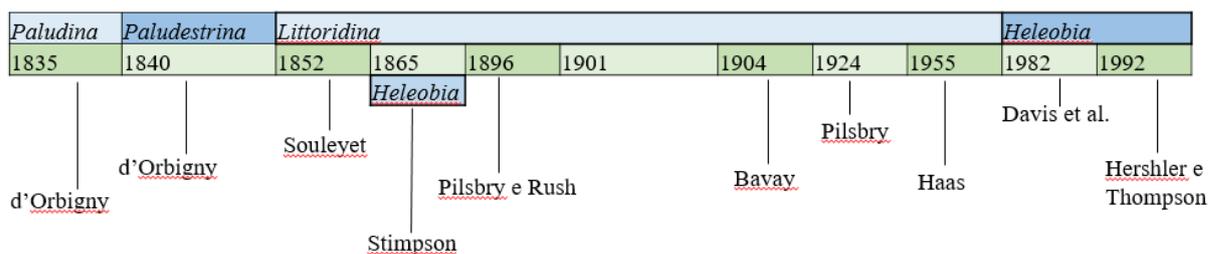
Fonte: Wilke et al. (2001).

Ambas as famílias, Hydrobiidae e Cochliopidae, estavam alocadas na superfamília Rissosoidea no trabalho de Wilke et al. (2001). Contudo, Criscione e Ponder (2013) sugeriram a mudança da maioria das famílias que antes pertenciam a Rissosoidea, entre elas Hydrobiidae e Pomatiopsidae, para Truncatelloidea, a partir de dados morfológicos e moleculares. Apesar de não ter sido utilizado na análise de Criscione e Ponder (2013), Cochliopidae, por ser um grupo aparentado, também foi alocado em Truncatelloidea por autores subsequentes (SZAROWSKA et al., 2014; COLLADO et al., 2016a; COLLADO et al., 2019). Esta superfamília inclui muitos gêneros de água doce e salobra da América do Sul, como *Heleobia*, incluído em Cochliopidae, *Potamolithus* Pilsbry e Rush, 1896, em Tateidae e *Idiopyrgus* Pilsbry, 1911, em Pomatiopsidae.

## 1.2 Taxonomia na América do Sul

A taxonomia do gênero *Heleobia* é confusa, devido aos diversos nomes propostos (Figura 2). A seguir, sumarizamos em uma linha do tempo os principais nomes atribuídos ao gênero, assim como a autoria e a data, além de acontecimentos relevantes na história taxonômica.

Figura 2 - Linha do tempo da taxonomia de *Heleobia*, incluindo os autores e acontecimentos relevantes.



Legenda: Azul: Os gêneros propostos. Verde: O ano de cada publicação com novo nome, ou fato relevante.

A seguir, descreveremos cada etapa de acordo com a ordem cronológica. Inicialmente, as espécies foram classificadas no gênero *Paludina* Lamarck, 1819 por d'Orbigny (1835) com a descrição de sete espécies para a América do Sul: *P. peristomata* d'Orbigny, 1835, *P. lapidum* d'Orbigny, 1835, *P. andicola* d'Orbigny, 1835, *P. cumingii* d'Orbigny, 1835, *P. piscium* d'Orbigny, 1835, *P. parchappii* d'Orbigny, 1835 e *P. australis* d'Orbigny, 1835.

Em outro trabalho, d'Orbigny (1840) afirmou que no gênero *Paludina* havia duas formas, que ele distinguiu criando dois subgêneros: *Paludina s. strictu* e *Paludestrina*, que se

diferenciavam em relação a posição do olho e formato do opérculo. O subgênero *Paludina* abrigava espécies com os olhos na ponta dos tentáculos e opérculo com linhas concêntricas, sendo *P. vivipara* Lamarck, 1835 a espécie-tipo. E o subgênero *Paludestrina* abrigava espécies com os olhos na base dos tentáculos e opérculo com linhas espirais, alocando *Paludina acuta* Draparnaud, oriunda da França, sob o nome *Paludina (Paludestrina) acuta*. Todas as populações encontradas na América do Sul, designadas por ele em 1835 como *Paludina*, seriam, portanto, *Paludestrina*. Os trabalhos de d'Orbigny (1835; 1840) concentraram na descrição das espécies com base nas conchas e habitats. Salientamos que ao incluir as espécies sulamericanas em *Paludestrina*, d'Orbigny (1840) chamou *Paludina andicola* como *Paludestrina andecola*. Esse erro foi seguido por muitos autores, mas no presente trabalho utilizaremos *P. andicola* por ser o correto seguindo o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, atendendo o Princípio de Prioridade.

Souleyet (1852) propôs o gênero *Littoridina* Souleyet, 1852, sendo a espécie-tipo *Littoridina gaudichaudi* Souleyet, 1852. Ele estabeleceu esse gênero para pequenos moluscos que se assemelhavam à *Littorina* Férussac, 1822, mas cuja concha é semelhante à de *Paludina*. Portanto, ele criou o gênero *Littoridina*, a fim de separá-la de *Littorina*, que apesar de serem parecidas pela morfologia externa, como por exemplo, olhos na base do tentáculo, pênis emergindo atrás do tentáculo direito e pé mais estreito, apresentam diferenças na morfologia interna como a forma das brânquias e algumas partes do sistema reprodutor e sistema digestivo. A brânquia de *Littoridina* é simples e não apresenta as dobras que revestem o teto da cavidade branquial, como em *Littorina*. Nos machos de *Littoridina*, o testículo é formado por lóbulos ramificados e o vaso deferente é dotado de um tubo completo, diferindo de *Littorina*, onde forma um sulco simples na porção distal. O pênis em *Littoridina* é muito robusto, com cinco ou seis apêndices digitiformes. A concha de *Littoridina* é geralmente oval-cônica, fina, com voltas convexas, coberta com uma camada esverdeada e por vezes enegrecida; abertura em formato oval-arredondado. No trecho final de seu trabalho, ele aponta que dentre todos os caracteres, a concha é mais semelhante entre *Littoridina* e *Paludina*, e ressalta por último, que o opérculo de *Littoridina* é sempre córneo, paucispiral e fino, como em *Littorina*. É interessante destacar nesse trabalho, que Souleyet (1852) não mencionou o subgênero *Paludestrina*, como sendo “sinonímia” para as espécies de *Paludina* da América do Sul, que ele mesmo alocou no gênero *Littoridina*. Este foi o primeiro trabalho a comparar a anatomia interna trazendo grande contribuição.

Stimpson (1865) apresentou uma lista de características da família Rissoidae Gray, 1847, e propôs cinco subfamílias, sendo uma delas Hydrobiinae, onde alocou o gênero

*Paludestrina*, que antes estava alocado na família Littorinidae por d'Orbigny (1840), Gray (1847) e Adams e Adams (1853-1858). Stimpson (1865) justificou essa mudança devido à presença de dentículos basais no dente raquidiano, que Troschel (1857) em seu trabalho sobre a dentição da rádula na taxonomia dos gastrópodes, apresentou como característica da família Rissoidae. Stimpson (1865) acabou elevando o status taxonômico de *Paludestrina* ao nível genérico, tendo em vista que foi descrito como um subgênero de *Paludina*. Além disso, propôs que a espécie-tipo do gênero deveria ser *Paludestrina auberiana* d'Orbigny, 1841, descrita para Cuba, seguida das espécies da América do Sul, já que d'Orbigny (1840) não havia citado nenhuma espécie-tipo para *Paludina* e *Paludestrina*. Porém, essa colocação foi equivocada, pois as primeiras espécies de *Paludestrina* foram publicadas em d'Orbigny (1835) como *Paludina*, e não em 1841, como proposto por Stimpson (1865). Esse erro também foi relatado por Parodiz (1955), que afirmou que outros autores também seguiram esse pensamento (DOLFUS, 1912; THIELE, 1931).

No mesmo trabalho, Stimpson (1865) relatou que d'Orbigny (1841), quando descreveu *Paludina auberiana*, apresentou como localidade-tipo “areias marinhas de Cuba”, ou seja, se tratava de uma espécie marinha. Ele apontou que se *P. auberiana* realmente fosse uma espécie marinha, não deveria pertencer a *Paludestrina*, mas sim, ao gênero *Hydrobia* Hartmann, 1821. Porém, a partir de um observador que localizou essa espécie em ambiente de água doce, ele confirmou a conclusão de d'Orbigny (1841) de que se tratava de *Paludestrina*. Stimpson (1865) ainda destacou que se a conclusão dele e de d'Orbigny (1841) estivessem erradas, *P. auberiana* deveria ser incluída em *Hydrobia*, e as demais espécies de água doce e salobra, incluídas anteriormente em *Paludestrina*, deveriam ser alocadas em um novo gênero, designado por ele como *Heleobia* Stimpson, 1865, cuja espécie-tipo seria *Paludestrina culminea* d'Orbigny, 1840.

Bourguignat (1887) revisou algumas espécies de *Paludestrina* e afirmou que embora *P. acuta* fosse de água salobra, d'Orbigny (1840) propôs 11 espécies de água doce e 4 marinhas. Após estudo das descrições e investigação das figuras dessas espécies, Bourguignat (1887) reconheceu pelo menos sete espécies de paludestrinas semelhantes à *Littoridina*: *P. piscium*, *P. parchappii*, *P. australis*, *P. charruana*, *P. isabelleana*, *P. cumingi* e *P. culminea*. Além destas, destacou três espécies como sendo de gêneros incertos: *P. andecola* (sic), *P. petitiana* e *P. peristomiata*.

Os autores subsequentes classificaram estas espécies em diferentes gêneros como *Paludestrina* (DOERING, 1884), *Hydrobia* (STROBEL, 1874), *Littoridina* (PILSBRY, 1911) e *Littorinida* (sic) (IHERING, 1895; CORSI, 1901).

Ihering (1895) apontou *Paludestrina peristomata* como espécie-tipo de *Paludestrina*, pois foi a primeira espécie que d'Orbigny (1840) listou e descreveu. Além disso, ele propôs que as espécies incluídas por d'Orbigny em *Paludestrina*, fossem atribuídas ao gênero *Littorinida* (*sic*) Souleyet, 1852 e *L. gaudichaudi* como espécie-tipo do gênero.

Corsi (1901) elaborou um catálogo de moluscos do Uruguai, e relatou a presença de algumas *Paludestrina* de d'Orbigny utilizando o gênero *Littorinida* (*sic*) para elas: *Littorinida australis*, *Littorinida charruana* e *Littorinida isabellei*.

Bavay (1904), a partir das coletas do Dr Neveu-Lemaire, concluiu que *Paludestrina andicola* (d'Orbigny, 1835) é semelhante à *Paludestrina culminea* d'Orbigny, 1840, afirmando que estas não poderiam ser consideradas espécies diferentes. Ele ainda afirmou que *P. andicola* deveria ser considerada como válida, pois foi citada e descrita primeiro (d'ORBIGNY, 1835; BAVAY, 1904). Pilsbry (1911) ressaltou essa observação, mas em seu trabalho elas permaneceram como espécies distintas.

No mesmo trabalho, Pilsbry (1911) considerou *Heleobia* proposto por Stimpson (1865), como sendo subgênero de *Littoridina* Souleyet, 1852. Ele sugeriu incluir em *Littoridina* todas as formas ovíparas da América do Sul, com conchas lisas, alongadas e estreitas que possuíam a abertura cortante. Porém, ele considerou apenas parte das espécies de *Paludestrina* como *Littoridina*. As espécies *Paludestrina peristomata* e *Paludestrina lapidum* foram alocadas no gênero *Potamolithus*. Os gêneros *Potamolithus* e *Littoridina* ainda foram alocados na família Amnicolidae Tryon, 1862, diferindo da proposta de Stimpson (1865) que os havia alocado em Rissoidae.

Haas (1955), fez uma consideração sobre *Heleobia* Stimpson, 1865, complementando Pilsbry (1911): “No entanto, acho prematuro usar o nome *Heleobia* antes que as espécies em que se baseia tenham sido estudadas anatomicamente e comparadas com as verdadeiras littoridinas. Os resultados de uma investigação em andamento mostrarão se o nome *Heleobia* pode ou não ser empregado e para quais espécies ele deve ser usado.” (Tradução Livre). Ainda nesse trabalho, Haas (1955) revisou as espécies *L. andecola* (*sic*), *L. culminea* e *L. neveui* do Lago Titicaca, Bolívia, apresentando similaridades entre elas e propondo as subespécies: *L. andecola* (*sic*) *andecola*, *L. andecola culminea* e *L. andecola neveui*. Ao descrever sobre a subespécie *L. a.(sic) culminea*, ele incluiu *Paludestrina culminea* como sinônimo desta espécie.

Durante grande parte do século XX, as espécies da América do Sul originalmente descritas como *Paludestrina* foram consideradas como *Littoridina* por diversos autores (PILSBRY, 1911; 1924; HAAS, 1955; HUBENDICK, 1955; MARCUS; MARCUS, 1965;

GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; SILVA; THOMÉ, 1985; AGUIRRE; FARINATI, 2000; SIMONE, 2006).

Para as espécies mais ao Sul do continente, Gaillard e Castellanos (1976) separaram as espécies de *Littoridina*, da Argentina e do Uruguai em quatro grupos bem definidos de acordo com os seguintes aspectos morfológicos: forma da concha, do pênis e da rádula. No Quadro 1 estão representados esses grupos com suas respectivas espécies.

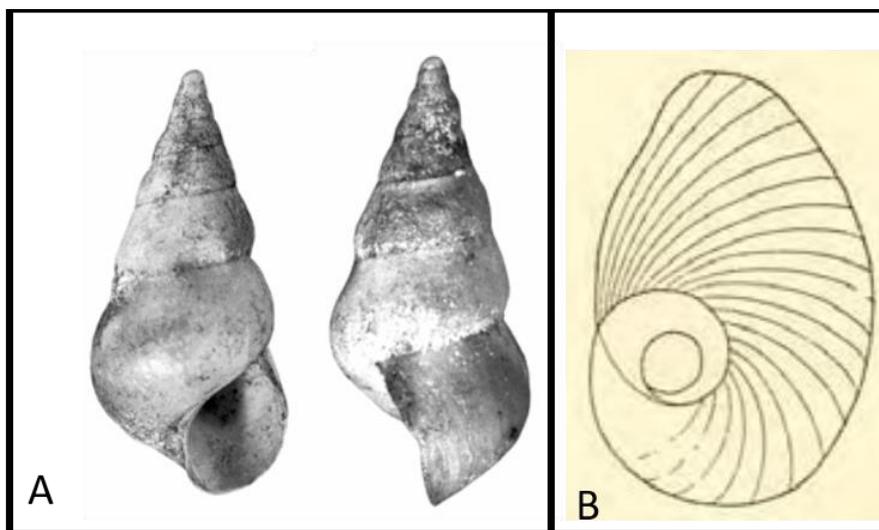
Quadro 1 – Grupos de *Littoridina sensu* Gaillard e Castellanos (1976).

<b>I Grupo australis</b>	<i>Littoridina australis australis</i> (d'Orbigny, 1835) <i>Littoridina australis crassa</i> Gaillard, 1974 <i>Littoridina australis nana</i> Marcus & Marcus, 1963 <i>Littoridina isabelleana</i> (d'Orbigny, 1840)
<b>II Grupo piscium</b>	<i>Littoridina piscium</i> (d'Orbigny, 1835) <i>Littoridina guaranítica</i> (Doering, 1884)
<b>III Grupo parchappei</b>	<i>Littoridina parchappii</i> (d'Orbigny, 1835) <i>Littoridina kusteri</i> (Strobel, 1874) <i>Littoridina occidentalis</i> (Doering, 1884) <i>Littoridina montana</i> (Doering, 1884) <i>Littoridina vianai</i> Parodiz, 1960 <i>Littoridina peiranoi</i> Weyrauch, 1963 <i>Littoridina tucumana</i> Gaillard, 1974 <i>Littoridina castellanose</i> Gaillard, 1974 <i>Littoridina conexa</i> Gaillard, 1974 <i>Littoridina rionegrina</i> Gaillard, 1974
<b>IV Grupo hatcheri</b>	<i>Littoridina hatcheri</i> Pilsbry, 1911 <i>Littoridina sublineata</i> Pilsbry, 1911

Fonte: Gaillard e Castellanos (1976).

Essa classificação só foi modificada após o trabalho de Davis et al. (1982), que compararam a espécie-tipo do gênero *Littoridina*, *L. gaudichaudi*, atualmente extinta segundo Bouchet (1996), com outras espécies da América do Sul e do Norte. Utilizando comparações anatômicas, ficou claro para Davis et al. (1982) que as espécies da América do Sul não pertenciam ao gênero *Littoridina*, mas a *Heleobia*. Os autores confirmaram a proposta de Stimpson (1865), aceitando o gênero *Heleobia*, cuja espécie-tipo por designação original é *Paludestrina culminea* d'Orbigny, 1840 sinônima de *H. andicola culminea* (Figura 3).

Figura 3 – Síntipo de *Heleobia andicola culminea* (d'Orbigny, 1840), espécie-tipo do gênero *Heleobia* segundo Hershler e Thompson (1992) e Silva (2003).



Legenda: *Heleobia andicola culminea* (d'Orbigny, 1840). A- Concha em vista frontal e lateral. (Síntipo em vista frontal e lateral (6,48 mm de comprimento). B- Opérculo de topotipo do tipo paucispiral.  
 Fonte: A- Silva (2003); B- Haas (1955).

Diante do exposto, Davis et al. (1982) foram de suma importância na sistemática do grupo, modificando formalmente a posição genérica das espécies sul americanas antes incluídas em *Littoridina* para *Heleobia*.

Outro trabalho de grande importância para a sistemática e taxonomia da família foi o de Hershler e Thompson (1992) que revisaram a antiga subfamília Cochliopinae, até então pertencente à família Hydrobiidae. Os autores apresentaram uma lista de todos os gêneros atribuídos à subfamília de forma detalhada, com diagnose, lista sinonímica, distribuição e uma lista nominal de espécies. Neste trabalho, eles aceitaram a proposta de Davis et al. (1982) adotando o gênero *Heleobia* para as espécies de *Littoridina*, além de incluírem outros gêneros na lista sinonímica. Como apresentado, Hershler e Thompson (1992) aceitaram a classificação de Haas (1955) com as três subespécies de *H. andicola*: *H. a. andicola* (d'Orbigny, 1835), *H. a. culminea* (d'Orbigny, 1840) e *H. a. neveui* (Bavay, 1904). Destas, consideraram *H. a. culminea* como tipo do gênero.

A lista sinonímica de *Heleobia* proposta por Hershler e Thompson (1992) inicia com *Heleobia (Eupaludestrina)* J. Mabile, 1877, seguido de gêneros monotípicos: *Brachypyrgulina* Haas, 1955, *Heligmopoma* Haas, 1955, *Limnothauma* Haas, 1955, *Rhamphopoma*, Haas, 1955, *Ecpomastrum* Haas, 1957, *Falsihydrobia* Chukhchin, 1975 e *Strombopoma* Haas 1955, em sua maioria descritos por Haas (1955, 1957) para a região do Lago Titicaca. Além destes, *Semisalsa*

Radoman 1974 e *Falsihydrobia* possuem representantes na Europa, Ásia, e África. E por sua vez, *Lyrodes* Doering, 1884 com representantes na Argentina e no Brasil.

Alguns autores não concordaram com as conclusões de Davis et al. (1982) e utilizaram o gênero *Littoridina* em seus trabalhos (AGUIRRE; FARINATI, 2000; AGUIRRE; URRUTIA, 2002; AGUIRRE et al., 2002; SIMONE, 2006; ZARGES, 2006). Aguirre e Farinati (2000) justificaram a permanência do nome *Littoridina* no lugar de *Heleobia*, devido aos critérios propostos para a mudança do gênero não serem suficientemente sólidos. Entretanto, a proposta de Davis et al. (1982) é amplamente aceita na literatura, assim como outros trabalhos importantes para a sistemática e taxonomia do grupo, tais como Hershler; Thompson (1992), Silva (2003) e Cazzaniga (2011).

Aguirre e Farinati (2000) e Aguirre e Urrutia (2002) discutiram a variação morfológica de populações fósseis e recentes de *H. australis*, sugerindo a sinonímia de *H. australis crassa*, *H. australis nana*, *H. isabelleana* e *H. conexa* (Gallard, 1974) com *H. australis*. Porém, o trabalho não investigou a morfologia dessas espécies, sendo este não considerado por autores subsequentes, e as espécies continuaram como válidas (SILVA 2003; DE FRANCESCO; ISLA, 2004; SIMONE 2006; SZAROWSKA, 2006; RUMI et al., 2008; CAZZANIGA 2011; ETCHEGOIN; MERLO; 2011).

De todos os gêneros dispostos na lista sinonímica, as espécies de *Heleobia* alocadas anteriormente em *Semisalsa*, têm sido estudadas do ponto de vista morfológico e molecular, resultando em contribuições taxonômicas. Szarowska (2006), realizou uma revisão de alguns gêneros da família Cochliopidae a partir da morfologia (concha, rádula, sistema reprodutor masculino e feminino) e molecular, e concluiu que *H. tritonum* (Bourguignat, 1852) pertencia a outro gênero que a mesma publicou no ano seguinte, como *Radomaniola* Szarowska, 2007. Szarowska et al. (2014) sinonimizaram *H. maltizani*, *H. dalmatica*, *H. scamandri* e *H. foxianensis* com *H. stagnorum*.

Cazzaniga (1981) e De Francesco (2007) baseados na morfologia da concha, sugeriram que *H. vianai* (Parodiz, 1960) fosse sinonímia de *H. occidentalis* (Doering, 1884). Rumi et al. (2008) ao realizarem um levantamento de moluscos de água doce da Argentina, inseriram *H. vianai* na lista como válida, mas apontaram a ressalva apontada pelos autores anteriores.

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, o cenário se modificou e alguns trabalhos foram realizados na tentativa de auxiliar a esclarecer a taxonomia e sistemática do gênero. Koch et al. (2015), aproximadamente 40 anos depois do trabalho de Gaillard e Castellanos (1976), contribuíram com a taxonomia das espécies da Argentina com dados

moleculares (usando o marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I). Os autores testaram a validade dos grupos propostos por Gaillard e Castellanos (1976) e obtiveram resultados que indicaram *H. occidentalis*, e *H. vianai* como sinônimas de *H. parchappii*. *Heleobia kusteri* (Strobel, 1874) é sinalizada como muito próxima a *H. parchappii*, mas Koch et al. (2015) decidiram manter a espécie como válida, afirmando que estudos anatômicos são necessários, assim como o uso de outros marcadores, com o intuito de confirmar a validade da espécie. Eles sugeriram também que *Heleobia hatcheri* (Pilsbry, 1911) não pode ser considerada *Heleobia*, pois a espécie se apresentou no cladograma, mais próxima do gênero *Potamolithus*. A morfologia corrobora o resultado da análise molecular pela presença de um nodo nucal, que ocorre somente em fêmeas; características esta que não ocorre em *Heleobia*, mas sim, no gênero *Potamolithus*.

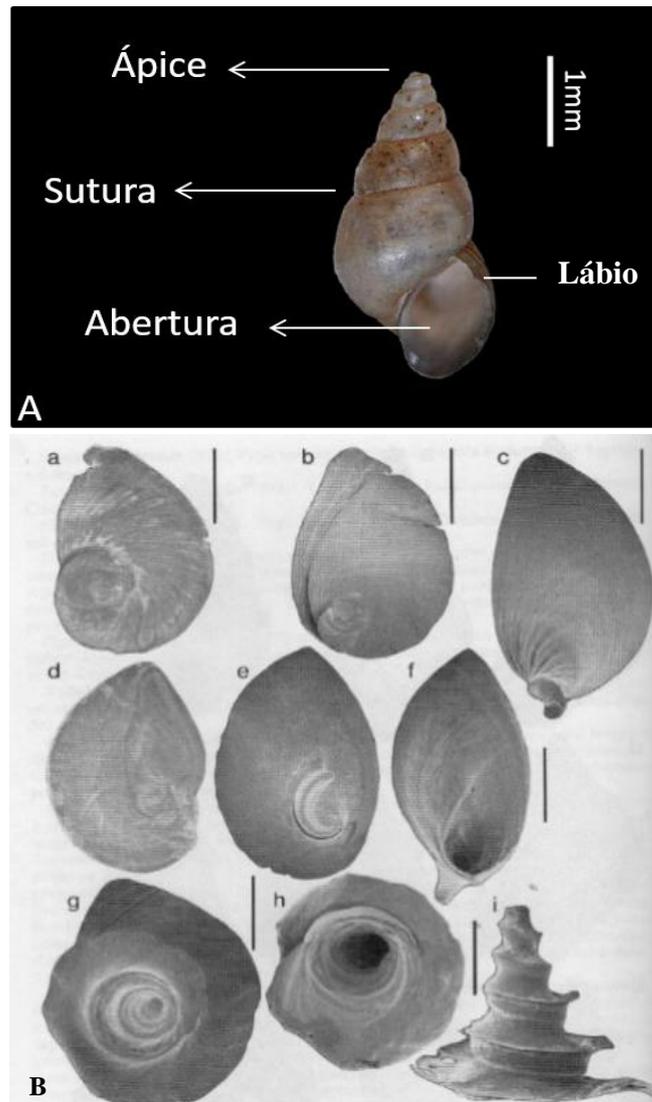
Cazzaniga (1981) já havia sinalizado diferenças morfológicas que justificavam a criação de um novo gênero para *H. hatcheri*, propondo *Strobeliella* Cazzaniga, 1981. Porém, o nome trata-se de um homônimo júnior de *Clausilia* (*Strobeliella*) de Nordsieck (1977), outro gastrópode. Diante disso, Cazzaniga (2017) propôs o novo gênero *Strobelitatea* para *H. hatcheri* já com a confirmação dos resultados moleculares. Até esse momento, nenhuma espécie brasileira possuía contribuições moleculares, que complementasse as descrições das espécies, e auxiliasse na sistemática e taxonomia do grupo.

### 1.3 Conquiliomorfologia

*Heleobia* é um gênero de moluscos pequenos, atingindo no máximo 9mm de comprimento.

A diagnose, fornecida por Hersler e Thompson (1992), baseia-se em caracteres conquiliológicos: “conchas estreitas a largas, curtas a longas, forma globosa a turriforme (mais comum, cônica alongada), voltas bem próximas umas das outras, raramente desenrolada e pouco umbilicada; protoconcha lisa; teleoconcha lisa ou com estrias espirais. Abertura da concha subcircular de forma crescente, lábio interno às vezes grosso e refletido (Figura 4A). Opérculo na maioria das espécies é paucispiral, ou mais raramente multispiral (Figura 4B). Pode ser de forma simples ou córneo, em vista dorsal, e em vista ventral, variando de delgado a um leve espessamento, ou com exceções, para um elevado número de voltas em formato de "saca-rolhas", como em *H. ortonii ortonii* (Pilsbry, 1924).”

Figura 4 – Morfologia da concha e opérculo de *Heleobia* Stimpson, 1865.



Legenda: A- Caracteres da morfologia da concha. B- Variação de opérculos de acordo com as espécies de *Heleobia*: a;d- vista dorsal e ventral de *H. a. andicola* USNM 873378 (escala= 0,6 mm); b; e – vista dorsal e ventral de *H. umbilicata* (Haas, 1955) USNM 874057 (escala= 0,38 mm); c; f- vista dorsal e ventral de *H. magna* (Haas, 1955) USNM 873387 (escala= 0,43 mm); g; h; i- vista dorsal, ventral e lateral de *H. ortoni ortoni* (Pilsbry, 1924) USNM 873424 (escala= 250 $\mu$ c).

Fonte: A - A autora, 2020. B – Hershler e Thompson, 1992.

#### 1.4 Morfologia externa e interna

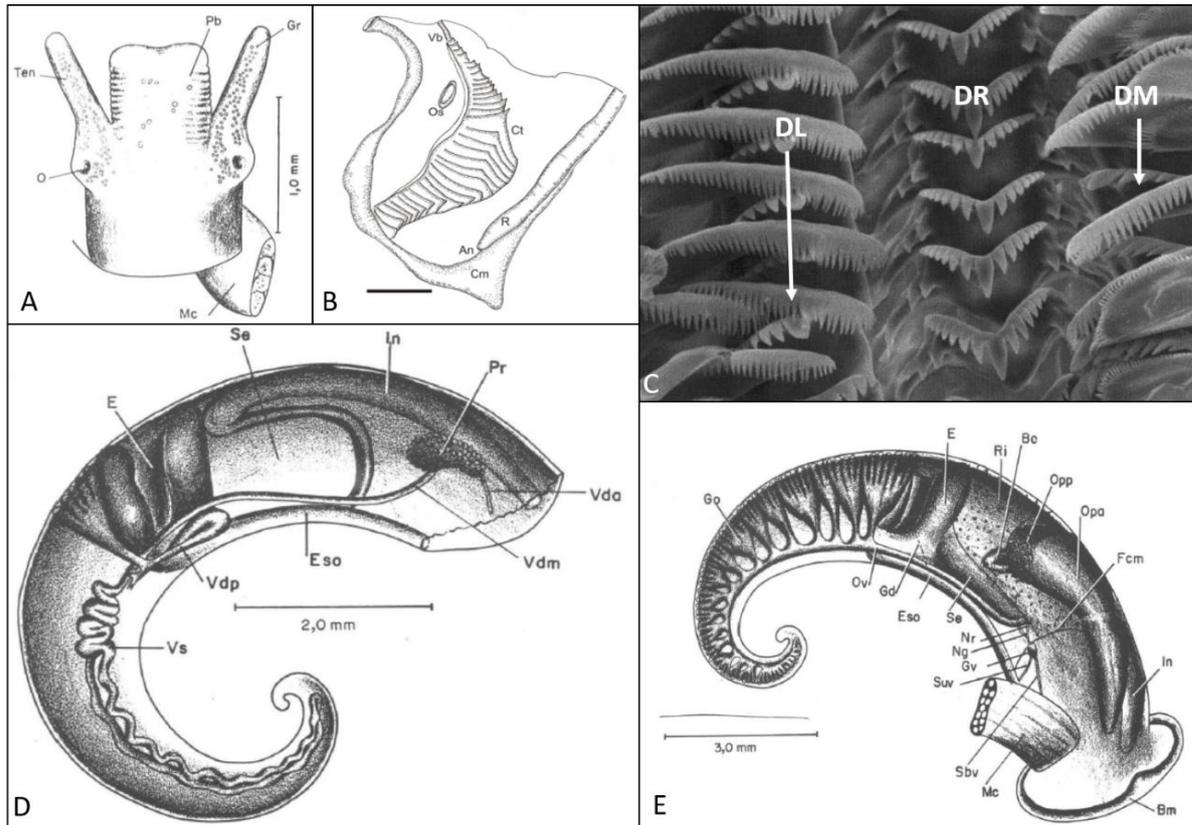
Quanto a anatomia, a característica mais utilizada em muitos trabalhos para identificar as espécies é o formato do pênis, como apresentado por Gaillard; Castellanos (1976), Collado et al. (2013; 2014) e Cazzaniga (1980). O trabalho com mais caracteres anatômicos detalhados e desenhados de *Heleobia* foi de Silva e Thomé (1985) na descrição de *H. davisi* Silva e Thomé, 1985. As informações aqui apresentadas serão referentes a este trabalho, além da descrição de *H. robusta* Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004.

O animal apresenta a cabeça com pigmentação cinza em sua grande maioria (varia de claro a escuro), e uma probóscide muitas vezes bilobada e pigmentada. Possui um par de tentáculos, com ou sem pigmentação, e um par de olhos negros na sua base (Figura 5A).

No manto, estão presentes o osfrádio, ctenídio, reto e ânus (Figura 5B). Apresenta brânquia com filamentos alongados, ou em formato triangular. Silva e Thomé (1985) afirmaram que o formato dos filamentos branquiais pode auxiliar na identificação entre as espécies. O número de filamentos branquiais pode variar entre 20 e 40 nas diferentes espécies. Osfrádio geralmente pequeno, circular ou oval ocupando menos de 25% do comprimento do ctenídio.

A rádula é do tipo tenioglossa, apresentando a fórmula (2-1-1-1-2), sendo uma única fileira do dente central ou raquidiano, uma fileira de cada lado de dente lateral, e duas fileiras, também de cada lado, de dentes marginais (interno e externo) (Figura 5C). O número de fileiras longitudinais de dentes varia de 50 a 60. O dente raquidiano vai variar na forma e no número de cúspides conforme a espécie. É utilizado também como um caráter diagnóstico (GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; SILVA; THOMÉ, 1985). De acordo com Hershler; Thompson (1992) uma diagnose de *Heleobia* é apresentar um par de cúspides basais no dente raquidiano. Porém, Silva e Veitenheimer-Mendes (2004), observaram em *H. robusta*, cúspides basais variando de uma a dois pares. Gaillard e Castellanos (1976) descreveram o gênero *Heleobia* possuindo de uma a quatro cúspides basais.

O sistema reprodutor masculino inicia-se com o testículo (gônada) que está alocado na massa visceral, ocupando duas ou mais voltas. É formado por um conjunto de lobos digitiformes. Da base desses lobos parte um canal que se liga ao vaso deferente. Este vaso parte do testículo e percorre de forma retilínea entre a gônada e a glândula digestiva. Ao se aproximar da região do estômago, o vaso fica todo enovelado, originando a vesícula seminal, que se estende até o esôfago. Da vesícula em diante, inicia-se o vaso deferente médio caminhando em linha reta até chegar a próstata. A próstata tem formato de rim, e se liga ao vaso deferente palial, que percorre a parede lateral direita da cavidade do manto, até penetrar no tegumento, junto a base do músculo columelar até chegar ao pênis (Figura 5D). O vaso deferente penetra na base do pênis e percorre o interior até a extremidade apical. O pênis é alongado com base roliça, afilando-se para a extremidade, e geralmente curvado com aspecto de foice, apresentando uma face convexa e outra côncava. Nessas faces, são encontradas papilas, ou glândulas apócrinas, que irão variar no número, tamanho, formato e posição. Este caráter é muito difundido e utilizado para diferenciar as espécies (HERSHLER; THOMPSON, 1992; GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; SILVA, 2003; SZAROWSKA, 2006; COLLADO et al., 2011).

Figura 5 – Morfologia de *Heleobia*.

Legenda: A- Cabeça de *H. davisii* Silva e Thomé 1985. B - Porção da cavidade palial de *H. tucumana* (Gaillard, 1974) escala: 0,5 mm. C- Rádula de *H. robusta*. D, E: *H. davisii*: D – Sistemas digestório e reprodutor masculino. E – Sistema reprodutor feminino. Abreviações: Figura A: gr: granulações; mc: músculo columelar; o: olho; pb: probóscide; ten: tentáculo; Figura B: an: ânus; cm: colar do manto; ct: ctenídio. os: osfrádio; r: reto vb: veia branquial. Figura C: dl: dente lateral; dr: dente raquidiano; dm: dente marginal. Figuras D e E: e: estômago; eso: esôfago; in: intestino; pr: próstata; se: saco do estilete; vda: vaso deferente anterior; vdm: vaso deferente médio; vdp: vaso deferente posterior; vs: vesícula seminal; bc: bolsa copuladora; bm: borda do manto; fcm: fundo da cavidade do manto; Gd: limite anterior da glândula digestiva; Go: gônada; Gv: gânglio visceral; Ng: nervo da gônada; nr: nervo subvisceral; suv: conectivo supravisceral.

Fonte: A, D e E – Silva e Thomé (1985); B - Ovando; De Francesco (2011); C - Silva e Veitenheimer-Mendes (2004).

O sistema reprodutor feminino tem início pelo ovário, se alojando sobre a glândula digestiva, e ocupando de uma a duas voltas do ápice. O ovário é ramificado, composto por um conjunto de lobos alongados, formando cachos. O oviduto percorre toda a base do ovário, e estende-se de forma retilínea para o corpo do animal, até se ligar à extremidade posterior do espermiduto, seguindo em direção à glândula de albúmen. Bolsa copuladora normalmente dobrada sobre seu ducto, posicionada póstero-ventralmente à glândula de albúmen, e coberta por esta. O ducto da bolsa une-se ao espermiucto para formar um curto espermiotubo o qual se abre no fundo da cavidade palial. Glândula de albúmen normalmente menor que a glândula da casca, que geralmente ocupa mais de 90% do oviduto palial posterior, dividida em duas áreas

de tonalidades diferentes. A abertura do oviduto palial localiza-se à direita do reto, próximo ao ânus (Figura 5E).

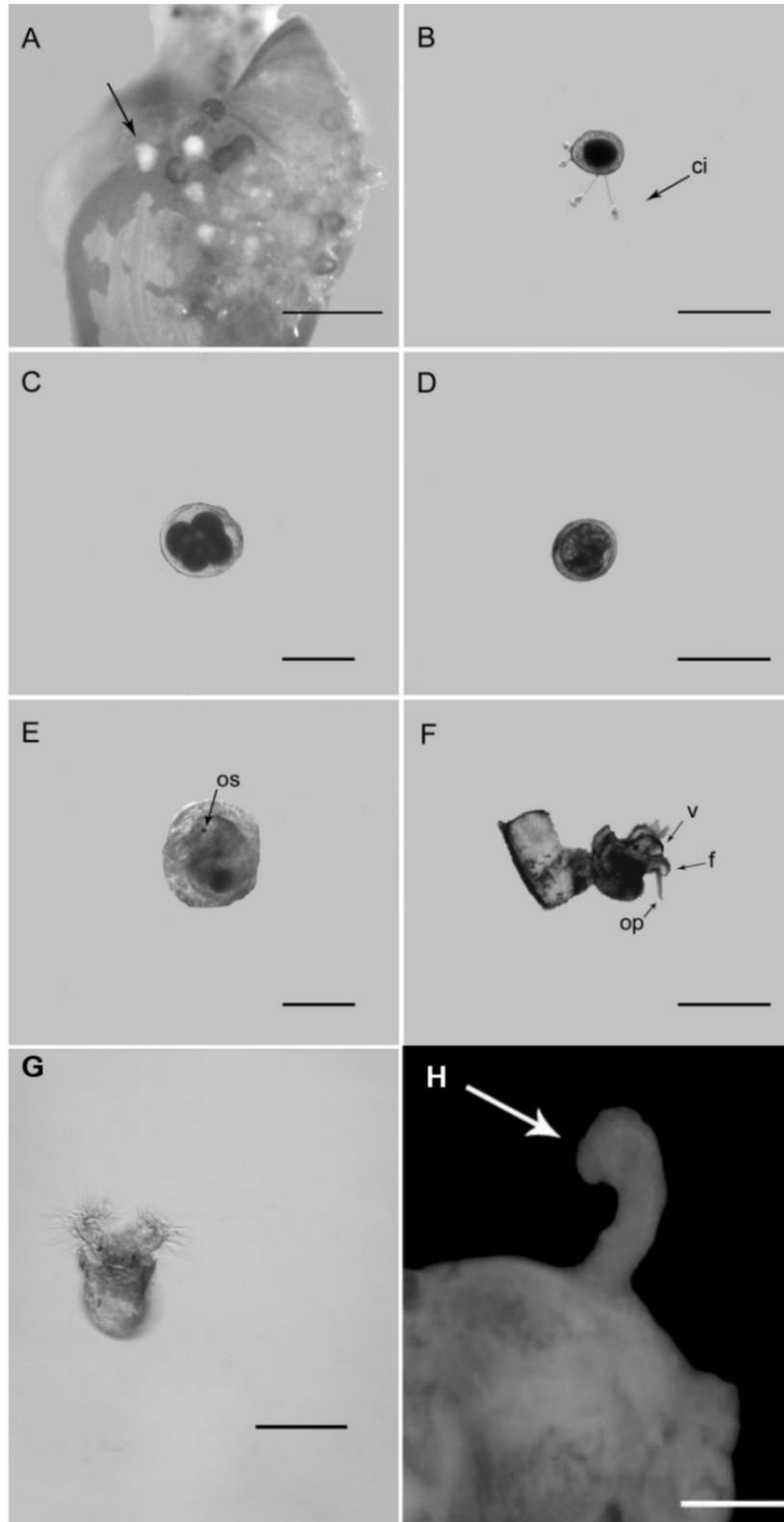
### 1.5 Reprodução e Estratégias Reprodutivas

O gênero em sua maioria é ovíparo, mas algumas espécies podem ser ovovivíparas, como *H. choapaensis* (Biese, 1944). Collado e Méndez (2011) afirmaram que não encontraram machos de *H. choapaensis* (Biese, 1944), sendo necessários estudos que comprovem que se trata de uma espécie partenogenética. Porém, Koch et al. (2015) afirmaram que a partenogênese não ocorre em *Heleobia*, tendo em vista que a diagnose do gênero é apresentar um pênis com papilas em ambos os lados (côncavo e convexo).

São animais dioicos, com a maioria apresentando desenvolvimento direto. *Heleobia australis* e *Heleobia charruana* apresentam fecundação interna e desenvolvimento indireto. As fêmeas adultas põem massas amarelas de ovos que incubam de 10 a 15 cápsulas que contém um ovo branco que se desenvolve em larva véliger e esta emerge na coluna d'água (NEVES et al., 2010; COLLADO; MÉNDEZ, 2011) (Figura 6A-G). Após a fêmea de *H. australis* liberar a massa ovígera no substrato, a eclosão em véliger leva aproximadamente três dias. A fase pelágica da espécie é curta, devido ao pequeno tamanho e simplicidade do velum, estrutura que segundo Kohn et al. (1987) indica a duração da vida pelágica.

Neves et al. (2013) registraram pela primeira vez imposex em *H. australis* oriunda da Baía de Guanabara na cidade do Rio de Janeiro. No trabalho, foi possível observar um pênis nas fêmeas dessa população (Figura 6H), no qual os autores associaram aos grandes índices de TBT (tributileno) presentes na água da baía. As fêmeas que sofreram com imposex, corresponderam a 3% do total coletado durante um ano. Além disso, os autores observaram um baixo índice de parasitismo da população, associando também à alta carga de TBT.

Figura 6 - Desenvolvimento de *Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835).



Legenda: A. Massa de ovos em conchas de caramujos adultos. B. Ovo antes do estágio inicial. C. Estágio de quatro células. D. Véliger pré torção. E. Véliger pós torção. F. Ecloração. G. Natação da véliger. H. Fêmeas afetadas por Imposex. Legenda: ci: cílios epibiontes; os: osfrádio; v: velum; f: pé; op: opérculo. Escala: A = 0,01 mm; B - G: 100  $\mu$ m; H: 200  $\mu$ m.

Fonte: A - G Neves et al. (2010); H - Neves et al. (2013).

## 1.6 Estudos Moleculares e o DNA barcoding

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, alguns trabalhos foram realizados, na tentativa de auxiliar a esclarecer a sistemática do gênero.

Em relação às espécies sul americanas, Kroll *et al.* (2012) apresentaram um dos mais importantes trabalhos com moluscos da região do lago Titicaca. O trabalho consistiu na biogeografia das espécies de *Heleobia* presentes no lago, com a proposta de testar o relógio molecular a partir do DNA mitocondrial Citocromo Oxidase I. O estudo contou com 17 espécies, sendo oito do lago, e as demais de outras localidades como a costa do Chile, Argentina e algumas espécies da Europa. Eles observaram que as espécies endêmicas do Lago Titicaca são mais jovens do que o próprio lago, justificando assim que o elevado grau de endemismo é em grande parte intralacustre. Essa grande diversificação foi desencadeada pelas variações do nível do lago, associado a mudanças ambientais. Eles afirmaram ainda, que o estudo de fósseis da região são necessários a fim de calibrar o relógio molecular e corroborar as conclusões apresentadas.

Collado *et al.* (2013) trabalharam no Planalto Chileno e no Deserto do Atacama, e sequenciaram a partir dos marcadores obtidos a partir de DNA mitocondrial 16S e 12S, oito espécies e seis subespécies, além de comparar o pênis das mesmas. Eles concluíram que as análises moleculares e a diferenciação do pênis validaram nominalmente as seguintes espécies: *H. chimbaensis* (Biese, 1944), *H. atacamensis* (Philippi, 1860) *H. transitória* (Biese, 1947) e *H. ascotanensis* (Courty 1907), enquanto que o status de *H. opachensis* (Biese, 1947) e *H. loanensis* (Biese, 1947) não puderam ser resolvidas. Ainda sugeriram que a uma explicação mais plausível para a distribuição das espécies nesses locais seria a vicariância.

Koch *et al.* (2015) sequenciaram quatro espécies argentinas a partir do marcador molecular COI (Citocromo oxidase I): *H. hatcheri*, *H. kusteri*, *H. piscim* e *H. sp.* Além dessas, outras duas espécies argentinas, *H. australis* e *H. parchappi*, já haviam sido sequenciadas por Kroll *et al.* (2012). A partir dessas sequências e outras disponíveis no GenBank de trabalhos anteriores já reportados, eles montaram uma árvore filogenética baseada em 17 espécies de *Heleobia* oriundas da Bolívia, Chile, Peru, Argentina, e alguns países da Europa, além de espécies de *Potamolithus* (Pilsbry e Rush, 1896). No cladograma, *H. hatcheri* ficou posicionada fora dos clados que possuíam espécies de *Heleobia*, ficando posicionada dentro do clado com espécies de *Potamolithus* (Pilsbry & Rush, 1896). A partir desse resultado, eles sugerem que essa espécie deve ser revista, pois a mesma é dotada de um “nodo nugal” nas fêmeas, característica que até o momento é considerada exclusiva de *Potamolithus*.

Em relação à Europa, 16 espécies de *Heleobia* (*Semisalsa*) são registradas, e destas, sete estão sequenciadas a partir do marcador molecular COI (Hershler *et al.* 1999; Falniowski *et al.* 2008; Kroll *et al.*, 2012; Szarowska *et al.*, 2014).

Diante do exposto, percebemos que nenhuma espécie brasileira apresenta sequenciamento genético, que possa complementar as descrições das espécies, e auxiliar na filogenia do grupo.

Percebe-se uma ampla utilização do marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I. Na base de dados do *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> acesso em Junho de 2019) estão depositadas 670 sequências, sendo 443 ou 66% de espécies oriundas do Chile. desse quantitativo chileno, somente um estudo populacional de Valadares *et al.* (2019) foram responsáveis por 329 sequências de *H. ascotanensis*.

As sequências são distribuídas na Europa, Chile, Bolívia, Peru e Argentina. O uso do marcador mitocondrial é incondicionalmente o mais utilizado. Do total das sequências, mais de 400 são referentes a COI. Vale destacar que o vasto uso desse marcador molecular ocorre através da identificação de espécies através do projeto DNA barcoding, desenvolvido por em 2003 com o intuito de padronizar métodos moleculares para identificar espécies de organismos vivos, auxiliando no estudo da taxonomia (HEBERT *et al.*, 2003). Dentre os principais motivos, destacam-se a ampla utilidade em diferentes estudos, a fácil amplificação, sequenciamento e análise.

### 1.7 Diversidade e distribuição geográfica

O gênero *Heleobia* possui 104 espécies nominais com distribuição na Ásia, Europa, África e América. Desse total, 84 espécies, ou 81%, são reportadas para a América do Sul. (Figura 7). O gênero ocorre em rios, lagoas e estuários (HERSHLER; THOMPSON, 1992).

Figura 7 - Riqueza do gênero *Heleobia* para a América do Sul.



Legenda: Os números indicam a quantidade de espécies para cada país.

No Quadro 2 apresentamos uma lista atual com todas as espécies nominiais do gênero e sua localidade-tipo. Muitas espécies estão localizadas na região conhecida como “Altiplano Andino” que é caracterizado por uma vasta área de planalto, com uma altitude média de 3800 m, distribuídos pelo norte da Argentina, oeste da Bolívia, norte do Chile e sul do Peru. Nesta região, está presente o lago Titicaca que abriga mais de 20 espécies (KROLL et al., 2012).

Quadro 2 - Lista nominal de táxons descritas para *Heleobia* Stimpson, 1865.

	<b>Espécie e autoria</b>	<b>Localidade-tipo</b>
1	<i>H. achaja achaja</i> (Clessin, 1878)	Ilha de Evia, Grécia
2	<i>H. achaja sorella</i> (Westerlund e Blanc, 1879)	Ilha de Evia, Grécia
3	<i>Heleoba adamsi</i> (Preston 1912)	Montevidéu, Uruguai
4	<i>Helebia ameghini</i> (Doering, 1884)	Pampeana Superior, perto de Lujan, Buenos Aires, Argentina
5	<i>H. andicola andicola</i> (d'Orbigny, 1835)	Lago Titicaca, Bolívia.
6	<i>H. andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1840)	Lago Titicaca, Bolívia.
7	<i>H. andicola neveui</i> (Bravay, 1904)	Lago Titicaca, Bolívia.
8	<i>H. angustiarum</i> (Preston, 1915)	Estreito de Magalhães, Chile
9	<i>H. aperta</i> (Haas, 1955)	Baía de Molinopampa, Lago Titicaca, Peru
10	<i>H. aponensis</i> (Maertens, 1858)	Collaredo di Monte Albano, Itália
11	<i>H. ascotanensis</i> (Courty, 1907)	Salar de Ascotán (Antofagasta), Chile
12	<i>Helebia atacamensis</i> (Philippi, 1860)	Tiloposo, Salina de Atacama, Província de Antofagosta, Chile
13	<i>H. australis australis</i> (d'Orbigny, 1835)	Montevidéu, Uruguai
14	<i>H. australis crassa</i> (Gaillard, 1974)	San Antonio Oeste, Rio Negro, Argentina.
15	<i>H. australis nana</i> (Marcus & Marcus, 1963)	Cananea, São Paulo, Brasil
16	<i>H. berry</i> (Pilsbry, 1924)	Yunguyo Lago Titicaca, Bolívia.
17	<i>H. bertoniana</i> (Pilsbry, 1911)	Porto Bertoni, Paraguai
18	<i>Helobia bigugliana</i> (Caziot, 1908)	Corsica, França
19	<i>H. bruninensis</i> (Biese, 1944)	Rio Chalinga, Salamanca, Coquimbo, Chile
20	<i>H. carcotensis</i> Collado, 2016b	Salina Carcote, Chile
21	<i>H. carinifera</i> (Haas, 1955)	Sucun, Lago Titicaca, Peru
22	<i>H. castellanosae</i> (Gaillard, 1974)	Lago de Palermo, Buenos Aires, Argentina
23	<i>H. charruana</i> (d'Orbigny, 1840)	Arroio ao norte de Montevidéu, Uruguai
24	<i>H. chimbaensis chimbaensis</i> (Biese, 1944)	Quebrada de La Chimba, Antofagasta, Chile
25	<i>H. chimbaensis conica</i> (Biese, 1947)	Quebrada Taltal, Antofagasta Chile
26	<i>H. choapaensis</i> (Biese, 1944)	Rio Choapa, Salamanca, Chile
27	<i>H. compacta</i> (Biese, 1944)	Rio Chalinga, Salamanca, Chile
28	<i>H. conexa</i> (Gaillard, 1974)	Albufera, Mar Chiquita, Buenos Aires, Argentina
29	<i>H. contempta</i> (Dautzenberg, 1894)	Nahr-el-Haroun, Síria
30	<i>H. copiapoensis</i> (Biese, 1944)	Canal Ojancos, Rio Copiapó, Copiapó, Atacama, Chile
31	<i>H. coquimbensis</i> (Biese, 1944)	Rio Limari, Ovalle, Província Coquimbo, Chile
32	<i>H. crawfordi</i> (Haas, 1955)	Ilha Titicaca, Lago Titicaca, Bolívia
33	<i>H. cuminguii</i> (d'Orbigny, 1835)	Rio Rimac, Callao, Lima, Peru
34	<i>H. cuzcoensis</i> (Pilsbry, 1911)	Cuzco, Peru
35	<i>H. dantoni</i> (German, 1911)	Lac de Gohum, próximo ao Irã

36	<i>H. davisi</i> Silva e Thome, 1985	Rio Guaiba, Vila Elsa, Rio Grande do Sul, Brasil
37	<i>H. deserticola</i> Collado, 2015	Água de Chorrillos, Costa Pacífica do Deserto do Atacama, Chile
38	<i>H. dobrogica</i> (Grossu e Negrea, 1989)	Chile
39	<i>H. doellojuradoi</i> (Parodiz, 1960)	Rio Gualeguaycho, afluente do rio Uruguai, Entre Rios, Argentina
40	<i>H. duveyrieri</i> (Bourguignat in Duveyrier, 1864)	Rio da Tunísia
41	<i>H. faminensis</i> (Preston, 1915)	Porto da Fome, Estreito de Magalhães, Chile
42	<i>H. forsteri</i> (Blume, 1958)	Lago Uinamarca, Lago Titicaca, Bolívia
43	<i>H. galiaeae</i> (Preston, 1914)	Lago de Tiberias, Israel
44	<i>H. glabra</i> (Tryon, 1865)	Bolívia
45	<i>H. gracilis</i> (Biese, 1944)	Los Canelos, Rio Puelo, Llanquihue, Chile
46	<i>H. guaranítica</i> (Doering, 1884)	Arroyo Barrancas, Argentina
47	<i>H. haasi</i> Heshrler & Tompson, 1992	Lagunilla, Lago Titicaca, Peru
48	<i>H. hernandezae</i> (Weyrauch, 1963)	Cuzco Las Salinas, sul do Peru
49	<i>H. inconspicua</i> (Haas, 1938)	Lagoa do norte, Alagoas, Brasil
50	<i>H. isabelleana</i> (d'Orbigny, 1840)	Arroio nas proximidades de Montevideo, Uruguai
51	<i>H. kusteri kusteri</i> (Strobel, 1874)	San Carlos e Aguanda, Mendoza, Argentina
52	<i>H. kusteri cordilerae</i> (Strobel, 1874)	Serra de Mendoza, Mendoza, Argentina
53	<i>H. lacustris</i> (Haas, 1955)	Paton, Sucune, Taman, Chiflon Bay, Lago Titicaca, Bolívia
54	<i>H. languiensis</i> (Haas, 1955)	Lago Langui, desembocadura de tributário do Amazonas, Peru
55	<i>H. limariensis</i> (Biese, 1944)	Rio Limari, Ovalle, Coquimbo, Chile
56	<i>H. limosa</i> (Preston, 1915)	Porto da Fome, Estreito de Magalhães, Chile
57	<i>H. lioneli</i> (Preston, 1915)	Porto da Fome, Estreito de Magalhães, Chile
58	<i>H. loanensis</i> (Biese, 1947)	Rio Loa, Calama, Antofagasta, Chile
59	<i>H. longiscata</i> (Bourguignat, 1856)	Proximo Sayda, Síria
60	<i>H. mallaganica</i> (Biese, 1947)	Água Fresca, Punta Arenas, Chile
61	<i>H. magna</i> (Haas, 1955)	Chococoya, Lago Titicaca, Peru
62	<i>H. miaulis</i> (Marcus & Marcus, 1965)	Jardim de Botânica da Fac. Filosofia (USP), São Paulo, Brasil
63	<i>H. mirandoi</i> (Weyrauch, 1963)	Fazenda Jocos, Distrito Citacochoa, Cajabamba, Norte do Peru
64	<i>H. mirum</i> (Haas, 1957)	Baía de Puno, Lago Titicaca, Peru
65	<i>H. montana</i> (Doering, 1884)	Serra de Córdoba e Serra de São Luis, Córdoba, Argentina
66	<i>H. oblonga oblonga</i> (Biese, 1944)	Los Canelos, Rio Puelo, Llanquihue, Chile
67	<i>H. oblonga biesei</i> Hershler e Thompson, 1992	Puelo Alto, Rio Puelo, Llanquihue, Chile
68	<i>H. obtusa</i> (Biese, 1944)	Los Canelos, Rio Puelo, Llanquihue, Chile
69	<i>H. opachensis</i> (Biese, 1947)	Rio San Salvador, Calama, Antofagasta, Chile

70	<i>H. ortonii ortonii</i> (Pilsbry, 1924)	Lago Titicaca
71	<i>H. ortonii schindleri</i> (Blume, 1958)	Lago Titicaca, Uinamarca. Entre Hutajata e Puerto Perez, Bolívia
72	<i>H. pachyspira</i> (Biese, 1944)	Rio Puelo, Llanquihue, Chile
73	<i>H. palmyrae</i> (Dautzenberg, 1894)	Rio Palmyra, Síria
74	<i>H. parchappii</i> (d'Orbigny, 1835)	Pampa, Argentina
75	<i>H. parva</i> (Haas, 1955)	Molinopampa, Lago Titicaca, Peru
76	<i>H. peiranoi</i> (Weyrauch, 1963)	Serra do Timbó, de Tucuman, Argentina
77	<i>H. peracuta</i> (Paladilhe, 1869)	Próximo a Lyon, França
78	<i>H. peteningensis</i> (Gould, 1852)	Lagoa de Peteninga (=Piratininga), Rio de Janeiro, Brasil
79	<i>H. piscium</i> (d'Orbigny, 1835)	Rio La Plata, Buenos Aires, Argentina
80	<i>H. popoensis</i> (Bavay, 1904)	Lago Poopo, Bolívia
81	<i>H. profunda</i> (Haas, 1955)	Lago Titicaca, Peru
82	<i>H. pueloensis</i> (Biese, 1944)	Los Canelos, Rio Puelo, Llanquihue, Chile
83	<i>H. pusilla</i> (Haas, 1949)	Lago de Tostão Pará, Brasil
84	<i>H. rausiana</i> (Radoman, 1974)	Ambiente salobro, Iugoslavia
85	<i>H. rionegrina</i> (Galiard, 1974)	Aroio Valcheta, Rio Negro, Argentina
86	<i>H. robusta</i> Silva e Ventenheimer-Mendes, 2004	Lagoa Rondinha, Itapeva, Lagoa dos Quadros, RS, Brasil
87	<i>H. santiagensis</i> (Biese, 1944)	Rio Maipo, Yeso, Santiago, Chile
88	<i>H. saracochae</i> (Haas, 1955)	Lagunilla, rio Saracochae, Lago Titicaca, Peru
89	<i>H. scottii</i> (Pilsbry, 1911)	Buenos Aires, Argentina
90	<i>H. scottii delticola</i> (Doello-Jurado, 1916)	Arroyo Tuyuparé, Delta do Paraná, Argentina
91	<i>H. similis</i> (Weyrauch, 1963)	Vilque Chico, leste de Huancané, afluente do Titicaca, Peru
92	<i>H. simplex</i> (Pilsbry, 1911)	Rio Chico de Santa Cruz, Argentina
93	<i>H. stagnorum</i> (Gmelin, 1791)	Norte de Zierikzee, Reino dos Países Baixos
94	<i>H. steindachneri</i> (Westerlund, 1902)	Steindachneri, Grécia
95	<i>H. stiphra</i> (Haas, 1955)	Lago Titicaca, Peru
96	<i>H. streletziensis</i> (Chukhchin, 1975)	Sevastopol, Mar Negro, Ucrânia
97	<i>H. striata</i> (Biese, 1944)	Canal Ojncos, Rio Copiapó, Copiapó, Atacama, Chile
98	<i>H. sublineata</i> (Pilsbry, 1911)	Arroyo no rio Chico, 35 milhas acima da Serra Oveja, Argentina
99	<i>H. sublogiscata</i> (Schütt, 1988)	Rio Orontes, Síria
100	<i>H. transitoria</i> (Biese, 1947)	Quebrada Cachina, Taltal, Antofogasta, Chile
101	<i>H. tucumana</i> (Gaillard, 1974)	Arroyo Hornillo, afluente do rio Sali, Tucumán, Argentina
102	<i>H. umbilicata</i> (Haas, 1955)	Lago Titicaca, Siripata Bay, Bolívia
103	<i>H. uruguayana</i> (Pilsbry, 1925)	Rio Uruguai, Paysandú, Uruguai
104	<i>H. vestita</i> (Haas, 1955)	Lagoa Saracocha, Bacia Titicaca, Peru

Fonte: Modificado de Hershler e Thompson (1992). Ausência: *H. hatcheri*, *H. maltzani*, *H. occidentalis*. Inclusão: *H. carcotensis*, *H. deserticola*, *H. robusta*.

É importante ressaltar que esta listagem é uma compilação da literatura, sendo incorporados trabalhos recentes de estudos moleculares com propostas de novas espécies, sinonímias e mudanças de gênero (HERSHSLER; THOMPSON, 1992; SZAROWSKA et al., 2014; COLLADO, 2015; COLLADO et al., 2016b; KOCH et al., 2015; CAZZANIGA, 2017). Na tabela 2, resumimos os trabalhos que envolveram listas de espécies a fim de destacar a consideração de cada autor.

Tabela 2 - Diversidade do gênero *Heleobia* por diferentes autores.

<b>Abrangência</b>	<b>Hershsler; Thompson, 1992</b>	<b>Silva 2003</b>	<b>Cazzaniga, 2011</b>	<b>Szarowska et al., 2014</b>
América do Sul	86	80	90	NI
Europa	10	NI	NI	16
África	01	NI	NI	NI
Ásia	06	NI	NI	NI

Fonte: A autora (2020).

Legenda: NI – Não Informado.

Observações: Lista de trabalhos anteriores, não refletindo a diversidade atual apresentada na Tabela 1.

Os trabalhos que envolvem a morfologia das partes moles estão concentrados no Chile, Brasil e Argentina. No Brasil, a maior parte desses dados se deve aos trabalhos da Dra. Maria Cristina Pons da Silva, da UFRS que muito contribuiu no campo da taxonomia do grupo (SILVA, 1993; SILVA, 2003; SILVA; DAVIS, 1983; SILVA; THOMÉ, 1985; SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004).

Descritas para o Brasil destacamos seis espécies e uma subespécie:

*H. australis nana* (Marcus & Marcus, 1963);

*H. davisii* Silva e Thomé, 1985;

*H. inconspicua* (Haas, 1938);

*H. miaulis* (Marcus & Marcus, 1965);

*H. peteningensis* (Gould, 1852);

*H. pusilla* (Haas, 1949);

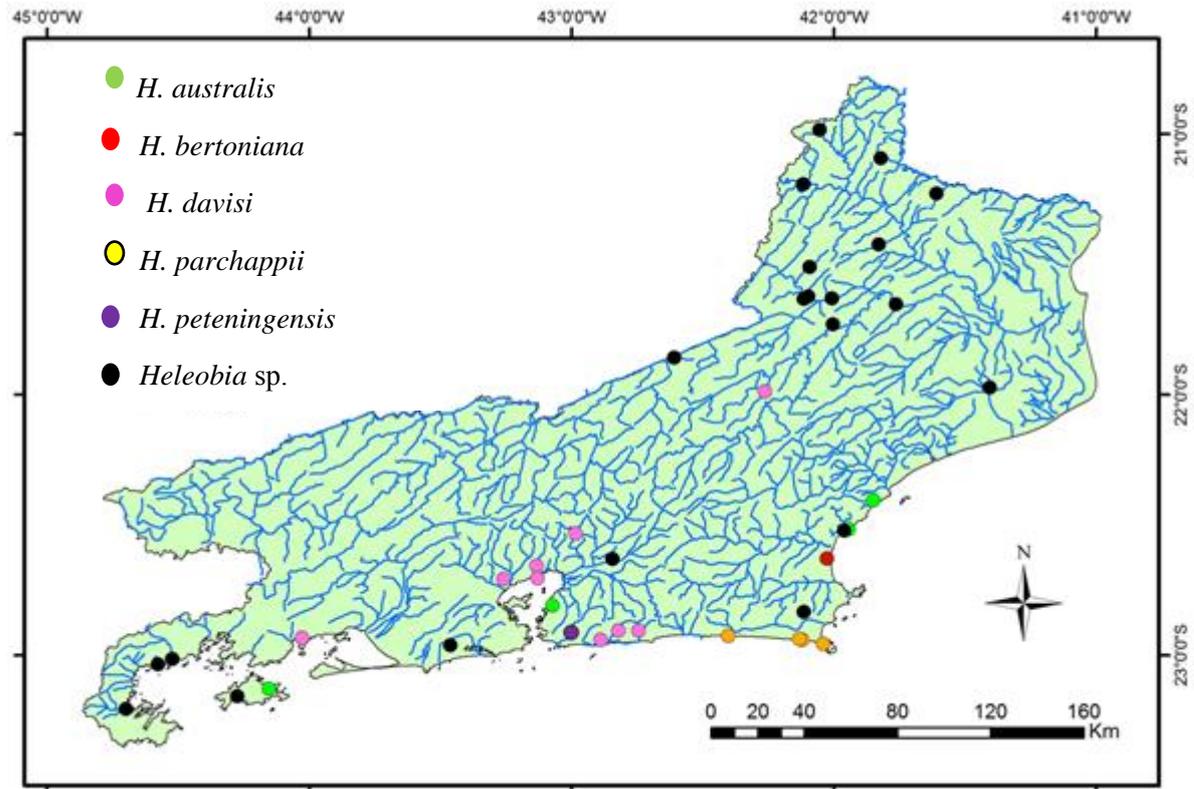
*H. robusta* Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004.

Dessas espécies, apenas três e a subespécie apresentam descrições das partes moles, além da concha: *H. australis nana*; *H. davisii*; *H. miaulis*; *H. robusta*.

Para o estado do Rio de Janeiro, foi confeccionado o mapa (Figura 8) que apresenta a diversidade do gênero baseado na compilação da literatura (FIGUEREDO-BARROS et al.,

2006; NEVES et al., 2010; SANTOS et al., 2003; 2010; SENRA et al., 2006; SIMÕES et al., 2008; THIENGO et al., 1998; 2001; 2002a; 2002b; 2004, 2006; 2009).

Figura 8 - Mapa de ocorrência conhecida de *Heleobia* para o estado do Rio de Janeiro.



Fonte: A autora, 2020.

De acordo com o mapa, podemos encontrar pelo menos seis espécies citadas para o estado do Rio de Janeiro: *H. australis*, *H. bertoniana*, *H. davisii*, *H. parchappii*, *H. peteningensis* e *Heleobia* sp.

## 2 JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, fica notório que há muito por se fazer e resolver na taxonomia do gênero *Heleobia*. Só no Brasil, seis espécies estão descritas, mas apenas três e a subespécie apresentam dados morfológicos, e nenhuma possui dados moleculares. Associado a isso, os estudos acerca do gênero no Brasil são escassos com uma lacuna de pelo menos de uma década. Seu tamanho diminuto dificulta estudos anatômicos, resultando em muitas espécies apenas com a descrição original baseada em dados da concha, e conseqüentemente sem a sua validade comprovada. São necessários mais esforços nessas áreas para elucidação dos questionamentos taxonômicos apresentados ao longo deste trabalho, para que assim possamos conhecer um pouco mais sobre o grupo, e contribuir para outras áreas tão dependentes da taxonomia, como sistemática, ecologia e conservação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Contribuir para o conhecimento do gênero *Heleobia* (Truncatelloidea: Cochliopidae), baseado na taxonomia, morfologia e análise molecular.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Revisar a taxonomia das espécies reportadas para o estado do Rio de Janeiro, investigando sua validade;
- Apresentar dados da anatomia do pênis, rádula, morfologia e morfometria das conchas, além de dados moleculares baseados no marcador mitocondrial Citocromo Oxidase I;
- Elucidar a diversidade e distribuição do gênero para o estado do Rio de Janeiro.

## 4 RESULTADOS

Os resultados da tese serão apresentados em quatro categorias, na forma de um artigo acadêmico, contendo todas as informações esperadas em um trabalho a ser submetido, incluindo a revista de submissão.

As categorias estão discriminadas abaixo:

**4.1 Categoria 1: Nova espécie de *Heleobia* (Truncatelloidea: Cochliopidae) para a Ilha Grande, Angra dos Reis, Sul do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil**

**4.2 Categoria 2: *Heleobia australis* (Truncatelloidea: Cochliopidae) na América do Sul: uma espécie de ampla distribuição ou três espécies locais?**

**4.3 Categoria 3: Revisão taxonômica entre *Heleobia davisii* Silva e Thomé, 1985 e *Heleobia robusta* Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004 (Truncatelloidea: Cochliopidae) com base em dados morfológicos e moleculares**

**4.4 Categoria 4: Diversidade e Distribuição Geográfica de *Heleobia* (Gastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) para o estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil**

#### 4.1 Categoria 1: Nova espécie de *Heleobia* (Truncatelloidea: Cochliopidae) para a Ilha Grande, Angra dos Reis, Sul do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil

##### Resumo

No presente trabalho, é descrita uma nova espécie de *Heleobia* para um riacho na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, sul do estado do Rio de Janeiro, Brasil. É realizada a descrição detalhada da concha e da anatomia peniana, comparações morfológicas e moleculares com as espécies mais próximas. *Heleobia* sp. nov. apresentou diferenças significativas na morfologia quanto aos aspectos da concha, do pênis e da rádula. O sequenciamento de parte do gene Citocromo Oxidase I (COI) apontaram uma distância genética de 4,3% da espécie mais próxima, *H. parchappii* (d'Orbigny, 1835), corroborando as diferenças morfológicas percebidas entre as duas espécies. Trata-se de uma espécie endêmica e insular, havendo este único registro até o momento.

**Palavras-chave:** Ilha Grande, molusco insular, dimorfismo sexual.

##### Introdução

*Heleobia* Stimpson, 1865 é um Caenogastropoda pertencente à família Cochliopidae, sendo encontrada em ambientes de água doce e salobros. O gênero abriga cerca de 104 espécies, com ocorrência predominante na América do Sul, com representantes também na Europa, regiões mediterrâneas da África, e no mar Cáspio, na Ásia. Para o Brasil, são reportadas seis espécies e uma subespécie: *H. davisi* Silva & Thomé, 1985; *H. inconspicua* (Haas, 1938), *H. pusilla* (Haas, 1949); *H. miaulis* (Marcus & Marcus, 1965), *H. peteningensis* (Gould, 1852), *H. robusta* Silva & Veitenheimer-Mendes, 2004 e *H. australis nana* (Marcus & Marcus, 1965).

*Heleobia* é definida por apresentar uma concha que varia de pequena (2 mm) a grande (aproximadamente 9 mm), forma globosa a turriforme, comumente cônica alongada, pouco umbilicada (HERSHLER e THOMPSON, 1992). Voltas planas a bem arredondadas. Abertura subcircular a oval, lábio interno às vezes espesso. Opérculo multispiral a paucispiral. Pé forte, alongado, aderido ao corpo anteriormente, sem dobras ou sulco. Tentáculos finos, longos a curto, e com presença de cílios transversais predominando no tentáculo esquerdo. Rádula tenioglossa, com o dente central portando um par de cúspides basais. Os dentes marginais possuem numerosas cúspides, portando mais que o dobro de cúspides do dente lateral. Fêmeas ovíparas, gônadas com numerosos lóbulos simples, ovário grande, ocupando pelo menos uma

volta. Oviduto palial anterior e posterior largo, dividido em duas partes, sendo respectivamente a glândula da casca e a glândula de albúmen. Bolsa copuladora como uma projeção na porção posterior do oviduto palial. Machos dotados de um pênis com glândulas apócrinas que variam em número e formato (HERSHLER e THOMPSON, 1992).

Do ponto de vista molecular estão disponíveis informações sobre representantes do gênero oriundos da Argentina, Chile, Bolívia, Peru e alguns países da Europa (KROLL et al., 2012; KOCH et al., 2015; SZAROWSKA, 2006; SZAROWSKA et al., 2014; COLLADO et al., 2016) por meio do marcador molecular Citocromo Oxidase I.

No presente trabalho, descrevemos uma nova espécie de *Heleobia* para uma região insular do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil, baseada em dados morfológicos e moleculares.

## **Material e Métodos**

**Coleta e processamento das amostras:** Foram analisados lotes depositados na Coleção de Moluscos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), provenientes de um riacho da Vila do Abraão, principal vilarejo da Ilha Grande, município de Angra dos Reis, Região Sul Fluminense do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (coordenadas: S23°08'26,8'' e O44°10'05,6''). Esse material foi coletado de julho de 2006 a novembro de 2013, fixados em álcool 70° INPM (Instituto Nacional de Pesos e Medidas). Coletas complementares foram realizadas em janeiro de 2018 e em junho de 2019 para análise molecular. O riacho possui aproximadamente 2,5 km de extensão e no presente trabalho foram investigados os últimos 50 metros próximos a foz, devido a registros prévios da espécie (SANTOS et al., 2010). O material foi coletado com auxílio de uma peneira de malha fina, passada rente ao substrato e, após rápida tamisação com água, os exemplares foram coletados com pinças e acondicionados em potes plásticos com água do local para o transporte.

Em laboratório, estes foram anestesiados com cristais de mentol, para posterior fixação em álcool 96°, para as análises moleculares, e em álcool 70° para as análises morfológicas. Os espécimes foram depositados na Coleção de Moluscos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Para identificação sexual, foi adotada a técnica de esmagamento da concha (Silva, 1993) após sua caracterização, fotografia e obtenção de medidas.

Figura 1 - Ocorrência de *Heleobia* sp. A - Localização da área de coleta. B, C- Riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande.



Fonte: A autora (2020).

**Morfologia:** Conchas de 22 machos e 32 fêmeas foram fotografadas e medidas com base em Hershler e Landye (1988), utilizando um microscópio estereoscópio modelo Nikon SMZ800-C-DS, com uma câmera acoplada modelo Nikon Digital Sight DS-U3. Foram obtidas as seguintes medidas (em mm): comprimento total, largura total; comprimento da volta corporal; comprimento da espira; comprimento da abertura e largura da abertura. A estatística descritiva dos dados seguiu Silva (1993). Posteriormente, investigou-se a existência de dimorfismo sexual a partir da comparação morfométrica. Para isso, foi realizado um teste de normalidade seguido de um teste multivariado não paramétrico (PERMANOVA) para testar se havia diferença entre os sexos a partir das medidas da concha. Os dados foram processados no programa estatístico PAST versão 3.25. A contagem do número de voltas da concha e a descrição das cores, seguiram respectivamente, Diver (1931) e Ridgway (2005). O opérculo foram medidos dez de

cada sexo para aferição das medidas. Para a obtenção da rádula, o bulbo bucal foi imerso em solução comercial de hipoclorito de sódio diluído (proporção 1:1). As rádulas foram metalizadas em carbono, e as imagens foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol – JSM- 6510LV). A descrição da rádula seguiu Silva e Thomé (1985). Cinco machos foram avaliados quanto a morfologia peniana, característica diagnóstica para o gênero. Este foi desenhado e fotografado no microscópio estereoscópio já mencionado. Para determinação da razão sexual, foram contabilizados 131 indivíduos, e posteriormente a concha foi quebrada para determinação do sexo.

**Extração e Sequenciamento do DNA:** Para análise molecular, cinco topótipos da nova espécie sem a glândula digestiva, bulbo bucal e pênis foram utilizados. A extração foi realizada com fenol clorofórmio, adaptado de Sambrook et al. (1989). A região Citocromo Oxidase I (COI) foi amplificada pela reação da cadeia da polimerase (PCR), com os iniciadores LCO1490 (forward: 5'- GGTCACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO2198 (reverse: 5'- TTA ACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') (FOLMER et al., 1994).

A PCR foi realizada seguindo a programação: 94°C por 2,5 min (1 ciclo); 40 ciclos de 90°C por 30s (desnaturação do DNA); 48°C por 1 min (anelamento do Primer); 72° por 1 min (extensão) e 72°C por 3 min para uma extensão final. O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1% e purificado com Exosap. A amostra purificada foi sequenciada usando o Kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), seguida da purificação por Sephadex G-50. O produto foi para um sequenciador automático (ABI 3500 capillary system (Applied Biosystems, Inc.) da UERJ. Após obtenção das sequências, estas foram editadas e alinhadas usando o software MEGA 7 (KUMAR et al., 2016). Para a construção do cladograma, utilizamos *Onobops jacksoni* e *Pomatiopsis labidaria* como grupos externos e comparamos com as sequências obtidas no GenBank (Tabela 1). Para análises do DNA *barcoding*, obtivemos uma árvore através do modelo de Neighbor-joining (NJ) pelo MEGA, usando o modelo Kimura 2 parâmetros (K2P) propostos por Kimura (1980), e 1000 réplicas (Bootstrap).

Tabela 1 - Sequências depositadas no GenBank utilizadas no trabalho.

Espécie	Localidade	Referência	Acesso GenBank
<i>Heleobia australis</i> (d'Orbigny, 1835)	Mar Chiquita, Argentina	Kroll et al., 2012	JQ972708
<i>Heleobia occidentalis</i> (Doering, 1884)	Laguna Bededro, San Luis, Argentina	Koch et al., 2015	KM22097
<i>Heleobia parchappii</i> (d'Orbigny, 1835)	Mar Chiquita, Argentina	Kroll et al., 2012	JQ972709
<i>Heleobia andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1835)	Lago Titicaca, Huarina, Bolívia	Kroll et al., 2012	JQ973030
<i>Heleobia andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1835)	Lago Titicaca, Baía Ramis, Peru	Kroll et al., 2012	JQ973029 JQ973031
<i>Heleobia andicola neveui</i> (Bavay 1904)	Lago Titicaca, Vilque Chico, Peru	Kroll et al., 2012	Q973035
<i>Heleobia deserticola</i> Collado, 2015	Comunicação pessoal	Collado (não publicado)	KR870997 KR870998 KR870999
<i>Heleobia transitoria</i> (Biese, 1947)	Quebrada Cachina, Pan Azúcar, Chile	Collado (não publicado)	KR870995 KR870996
<i>Heleobia mirum</i> (Haas, 1957)	Lago Titicaca, Ajilata, Bolívia	Kroll et al., 2012	JQ973046 JQ973047
<i>Heleobia umbiculata</i> (sic) (Haas 1955)	Lago Titicaca, Ilha do Sol, Bolívia	Kroll et al., 2012	JQ973052
<i>Heleobia umbiculata</i> (sic) (Haas 1955)	Lago Titicaca, Chocasuyu, Peru	Kroll et al., 2012	JQ973053
<i>Heleobia</i> sp.	Riacho na Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil	Presente trabalho	Em elaboração
<i>Heleobops carrikeri</i> Davis & McKee, 1989	Oyster Pond, Falmouth, Estados Unidos	Kroll et al., 2012	JQ973018 JQ973019
<i>Heleobops carrikeri</i> Davis & McKee, 1989	Maryland, Dorchester, Estados Unidos	Wilke et al., 2001	AF213347
<i>Onobops jacksoni</i> (Bartsch, 1953)	Maryland, Estados Unidos	Wilke et al., 2001	AF367645
<i>Pomatiopsis lapidaria</i> (Say, 1817)	Ilha Cruger, Rio Hudson, Estados Unidos		

Observação: Sequências do GenBank disponíveis com o código no site <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>  
Fonte: A autora (2020).

## RESULTADOS

### Sistemática

**Caenogastropoda Cox, 1960**

**Truncatelloidea Gray, 1840**

**Cochliopidae Tryon, 1866**

***Heleobia* Stimpson, 1865**

***Heleobia* sp. nov.**

**(Figura 2 A-G, Tabela 2)**

**Sinonímia:** *Heleobia australis*: Rocha et al. (2008; 2009), Miyahira (2009), Santos *et al.* (2010), Gonçalves (2015) “*non*” d’Orbigny, 1835.

**Material-tipo:** Holótipo (macho) UERJ 11.849; Alótipo (fêmea) UERJ 11.850. Os parátipos encontram-se discriminados na lista do material examinado.

**Localidade-tipo:** Riacho cruzando a rua Getúlio Vargas no centro da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, sul do estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil; (S23°08’26.8’’ e W44°10’05.6’’).

**Material examinado:** BRASIL, **Rio de Janeiro**, Angra dos Reis, Ilha Grande, Vila do Abraão, córrego no centro da vila, S.B. Santos e equipe col., UERJ 7.936 (11/xi/2009 - 160 ex); UERJ 7.939 (11/xi/2009 - 118ex); UERJ 7.860 (11/ix/2009 - ex 47ex); UERJ 7.861 (11/ix/2009 01 ex); UERJ 8.102 (19/vi/2019 - 01 ex); UERJ 8.103 (19/vi/2019 - 45 ex); UERJ 8.135 (22/i/2010 - 08 ex); UERJ 8.223 (26/vi/2010 - 01 ex); UERJ 8.242 (20/viii/2010 - 03 ex); UERJ 8.354 (29/x/2010 - 04 ex); UERJ 9.275 (25/vii/2011 - 01 ex); UERJ 9.276 (25/vii/2011 - 01 ex); UERJ 9.301 (03/x/2011 - 10 ex); UERJ 9.302 (03/x/2011 - 26 ex); UERJ 11769 (07/vii/2006 - 10 ex); UERJ 11.770 (08/ix/2006 - 02 ex); UERJ 11.771 (15/xi/2006 - 113 ex); UERJ 11.772 (19/i/2007 - 04 ex); UERJ 11.773 (04/iii/2007 - 10ex); UERJ 11.774 (04/v/2007 - 07 ex); UERJ 11.775 (27/vii/2007 - 02 ex); UERJ 11.776 (06/ix/2007 - 03 ex); UERJ 11.777 (01/xi/2007 - 30 ex); UERJ 11.778 (14/iii/2008 - 02 ex); UERJ 11.779 (08/v/2008 - 03 ex); UERJ 11.780 (03/ix/2008 - 05 ex); UERJ 11.781 (04/ix/2008 - 44 ex); UERJ 11.782 (04/ii/2009 - 22 ex); UERJ 11.783 (03/iv/2011 - 76 ex); UERJ 11.784 (07/xii/2012 - 06 ex); UERJ 11.785 (09/ii/2012 - 01 ex); UERJ 11.786 (25/iv/2012 - 01 ex); UERJ 11.787

(25/iv/2012 – 17ex); UERJ 11.788 (31/viii/2012 – 56 ex); UERJ 11.789 (29/x/2012 – 90 ex); UERJ 11.790 (05/xii/2012 – 40 ex); UERJ 11850 (28/vi/2019 – 02 ex); UERJ 11851 (28/vi/2019 – 16 ex).

**Diagnose:** Concha pequena, oval-cônica, com seis voltas, suturas profundas; abertura oval, perístoma descontínuo de borda cortante; subumbilicada; pênis possuindo de duas a quatro glândulas apócrinas no lado convexo, região mais dilatada na porção distal do pênis, direcionada para o lado côncavo, extremidade do pênis com projeção pontiaguda. Animal com dimorfismo sexual acentuado na morfometria da concha, com fêmeas cerca de duas vezes maiores que os machos.

**Concha:** Concha oval-cônica (Figura 2 A, B), machos com  $2,24 \pm 0,29$  mm e fêmeas com  $3,47 \pm 0,9$  mm de comprimento (Tabela 2), com 5 a 6 voltas, suturas profundas, bem marcadas e lisas, curvatura das voltas proeminente, não carenadas; apresentando linhas suaves axiais de crescimento, sem outras ornamentações; perióstraco castanho claro de coloração *Light Cadmium* (RIDGWAY, 2005); abertura oval, lábio interno e externo finos, sendo o último cortante; umbilicada.

Tabela 2. Dimensões (em mm) da concha para machos e fêmeas de *Heleobia* sp. nov. (N machos = 22; N fêmeas = 32) do riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.

Medida	Fêmeas	Machos
	$\bar{x} \pm DP$ (mín - máx)	$\bar{x} \pm DP$ (mín - máx)
Comprimento	$3,47 \pm 0,90$ (1,95 - 4,69)	$2,24 \pm 0,29$ (1,72 - 2,81)
Largura	$1,90 \pm 0,35$ (1,25 - 2,46)	$1,34 \pm 0,13$ (1,14 - 1,65)
Comprimento da volta do corpo	$2,25 \pm 0,48$ (1,40 - 2,93)	$1,52 \pm 0,18$ (1,24 - 1,89)
Comprimento da espira	$1,28 \pm 0,39$ (0,60 - 1,88)	$0,72 \pm 0,13$ (0,47 - 1,03)
Comprimento da abertura	$1,46 \pm 0,28$ (0,92 - 1,86)	$1,00 \pm 0,12$ (0,78 - 1,25)
Largura da abertura	$1,13 \pm 0,20$ (0,77 - 1,51)	$0,81 \pm 0,08$ (0,66 - 1,01)

Legenda:  $\bar{x}$  = Média e DP = Desvio padrão.

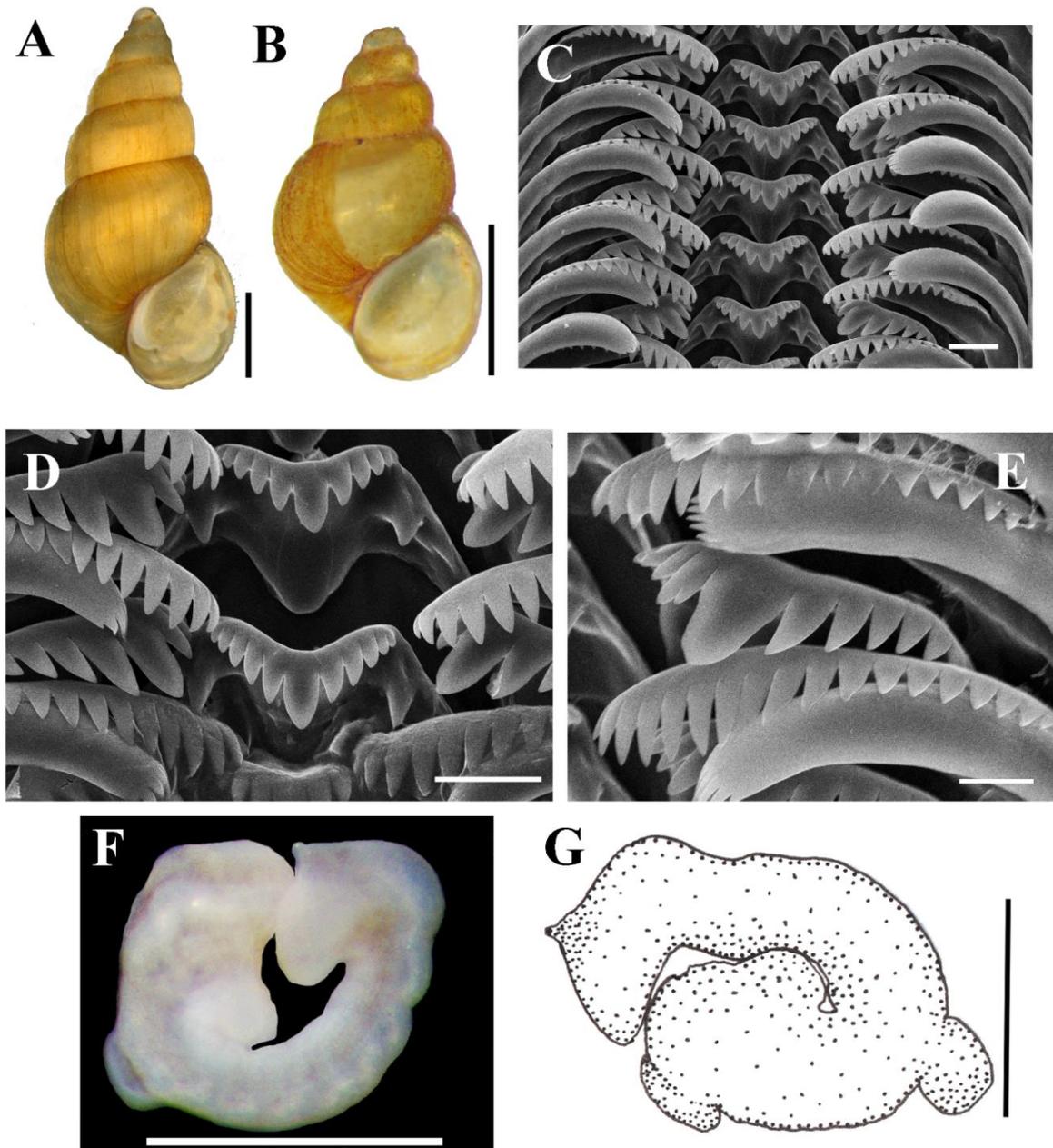
Fonte: A autora (2020).

**Opérculo:** Opérculo córneo, cor castanho claro, coloração *Deep Colonial Buff* (RIDGWAY, 2005), fino, oval, paucispiral, com média nos machos de 1,1 mm de comprimento e 0,8 mm de largura, e nas fêmeas 1,5 mm de comprimento e 1,1mm de largura.

**Rádula:** Rádula tenioglossa, com fórmula radular: 2M+1L+R+1L+2M; 49 a 53 fileiras (Figura 2 C-E). Dente central ou raquidiano possuindo uma cúspide mediana e cinco cúspides acessórias; possui um par de dentículos basais; cúspide mediana com bordas paralelas desde sua base até a metade de seu comprimento, estreitando até sua extremidade com formato proeminente; cúspides acessórias afileando a partir da base, e diminuindo o seu comprimento em direção a margem; dente lateral de 5 a 10 cúspides, sendo a mediana larga até a metade do seu comprimento, com um afinamento à extremidade levemente proeminente; cúspides acessórias com formato triangulares com projeção basal proeminente comparado ao dente central; dente marginal interno com 17 a 18 cúspides triangulares de ponta arredondada; dente marginal externo com muitas cúspides pectiniformes, diminuindo seu comprimento seguindo até a margem.

**Sistema reprodutor e aspectos reprodutivos:** Sistema reprodutor masculino com testículo aderido à glândula digestiva, ocupando as duas primeiras voltas da massa visceral. Vaso deferente posterior enovelado, correspondente à vesícula seminal. Do estômago até a próstata, canal deferente médio se estende de forma retilínea e uniforme; glândula da próstata reniforme; extremidade anterior da próstata, emerge o vaso deferente anterior, seguindo até a base do pênis. Localizado atrás do tentáculo direito, o pênis equivale a 1/3 do comprimento do corpo do animal; possui glândulas apócrinas pigmentadas, variando de duas a quatro, sempre no lado convexo, apresentando base larga e contorno arredondado (Figura 2 F, G); no lado côncavo do pênis nenhuma estrutura foi observada; porção distal do pênis dilatada, projetada para o lado côncavo, sendo mais larga que ao longo do órgão, com uma projeção pontiaguda de aspecto mamiforme; pênis translúcido, permitindo visualização do canal deferente anterior. No sistema reprodutor feminino, o ovário compreende duas voltas da massa visceral, com um conjunto de lóbulos, formando cachos paralelos à glândula digestiva; oviduto palial grande, ocupando pelo menos duas voltas do corpo do animal; animal ovíparo, não sendo observados ovos sobre as próprias conchas. Observa-se um dimorfismo sexual acentuado (com diferença estatística significativa,  $p < 0,05$ ), principalmente no comprimento da concha (Tabela 2), com razão sexual de 11 fêmeas por macho.

Figura 2 - Aspectos morfológicos de *Heleobia* sp. nov do riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ.



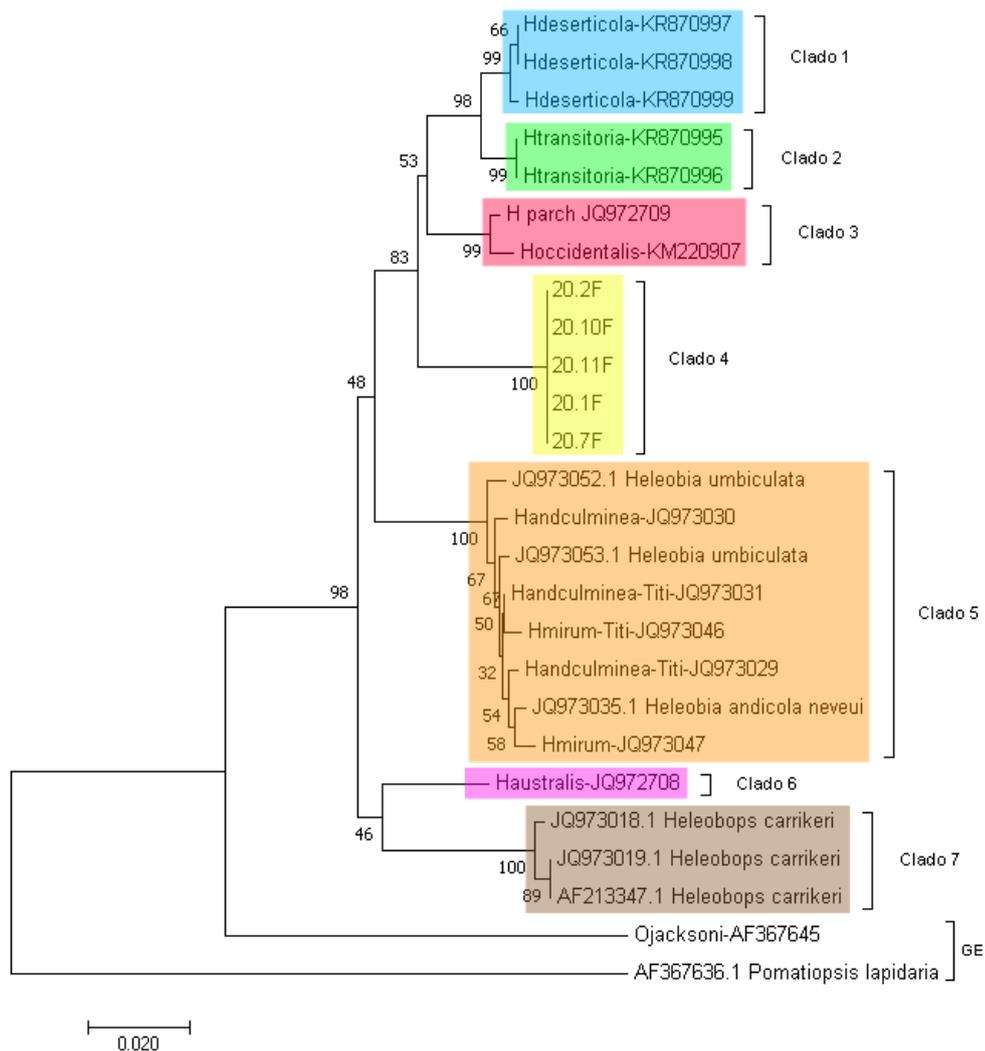
Legenda: Concha: A – Fêmea (Escala = 1 mm). B - Macho (Escala = 1 mm). Rádula: C - Vista geral (Escala = 10  $\mu$ m). D - Dente raquidiano (Escala = 10  $\mu$ m). E - Dente lateral e marginal interno (Escala = 5  $\mu$ m). Pênis: F – Fotografia do exemplar 31 (Escala = 0,5 mm). G - Desenho do exemplar 37 (Escala = 1 mm).

Fonte: A autora (2020).

**Análise molecular:** A árvore filogenética obtida apresenta sete Clados, além do grupo externo (Figura 3). O Clado 1 é composto por *H. deserticola*, cujo grupo irmão é o Clado 2, no qual foram alocadas as sequências de *H. transitoria*. Externamente a estes aparecem na sequência os Clados 3, 4 e 5. O Clado 1 + Clado 2 é grupo irmão do Clado 3, que agrupou as sequências de *H. parchappii* e *H. occidentalis*. Neste mesmo clado, as duas espécies aparecem agrupadas

com um valor de suporte igual a 99, confirmado pela sua similaridade morfológica. No Clado 4 (grupo irmão do clado que reúne Clado 1+ Clado 2 + Clado 3) estão incluídas as sequências de *Heleobia* sp. nov. com suporte de (100% bootstrap) estando bem definido e destacado das demais espécies.

Figura 3 - Árvore *Neighbor Joining* com *Heleobia* sp. nov. a partir do marcador molecular mitocondrial Citocromo Oxidase I.



Fonte: A autora (2020).

Observando a matriz de distância genética dos clados (Tabela 3), *Heleobia* sp. nov. (Clado 4) apresenta a menor distância com o Clado 3, formado por *H. parchappii* e *H. occidentalis*, encontrando um valor igual a 4,3%. A distância do Clado 4 para os outros próximos no cladograma foram de 4,6% (Clado 1), 4,5% (Clado 2) e 6,1% (Clado 5). Com o grupo externo, *Pomatiopsis lapidaria*, observamos uma distância do Clado 4 de 22%. O Clado 6, dotado de *H. australis*, dista de 6,7% da *Heleobia* sp. nov. Comparando com o gênero mais

próximo, representado por *H. carrikeri* (Clado 7), uma distância de 7,2% foi observada. Vale destacar que as espécies descritas para o Lago Titicaca foram alocadas em um único clado (Clado 5) com 100% de suporte, apresentando baixa distância genética interespecífica, representando no máximo 1,5%, visto pelo pequeno comprimento dos ramos do Clado 5.

Tabela 3 - Matriz de distância genética entre os Clados de *Heleobia* spp. analisadas neste trabalho em porcentagem (%).

	GE 2	Clado 1	Clado 2	Clado 3	<b>Clado 4</b>	Clado 5	Clado 6	Clado 7
GE 2								
Clado 1	23							
Clado 2	23,1	1,4						
Clado 3	22,7	3,4	3,3					
<b>Clado 4</b>	<b>22,7</b>	<b>4,6</b>	<b>4,5</b>	<b>4,3</b>				
Clado 5	21,8	5,6	5,6	5,4	<b>6,1</b>			
Clado 6	23,1	5,5	5,7	4,8	<b>6,7</b>	5,6		
Clado 7	22,3	5,8	5,6	6,5	<b>7,2</b>	7	5,4	
GE 1	24,3	14,1	14,7	13,7	<b>14,1</b>	14	12,9	13,4

Fonte: A autora (2020).

**Ecologia:** Animal encontrado em ambientes oligohalinos, sobre substrato consolidado artificial (garrafas pet) e natural (rochas), mas também no sedimento arenoso.

**Distribuição e hábitat:** A espécie só é conhecida para a localidade-tipo. O local conhecido como Riacho do Abraão, está situado no principal vilarejo da Ilha Grande, com aproximadamente 40 cm de profundidade e largura variando entre 1m (montante) e 4m (jusante), sendo o fundo arenoso-lodoso. Durante estudos ecológicos de longo prazo, o riacho manteve a temperatura média em torno de 24°C, condutividade 90mS e pH: 6,5 (GONÇALVES, 2015). A margem do riacho é repleta de casas, com presença de pouca vegetação aquática. O riacho recebe descarte de esgoto doméstico e resíduos sólidos, além de outras ações antrópicas como retificação das margens e assoreamento. Diante disso, possivelmente se trata de uma espécie resistente a certo grau de impacto, mas faltam estudos acerca de sua biologia e desenvolvimento.

O local fica inserido na Área de Proteção Ambiental (APA) dos Tamoios, às margens do Parque Estadual da Ilha Grande (PEIG).

## DISCUSSÃO

A espécie apresenta características anatômicas que a incluem no gênero *Heleobia*, como denticulos basais no dente raquidiano e pênis com glândulas apócrinas. Estas características foram apresentadas como diagnósticas do gênero por Hershler e Thompson (1992). Além disso, dados moleculares revelam uma proximidade com as espécies tradicionalmente incluídas em *Heleobia*, reforçando a sua posição taxonômica dentro deste grupo. A partir dos dados apresentados, *Heleobia* sp. nov. apresentou uma distância genética de 4,3% em relação à espécie mais próxima, *H. parchappii*. Essa distância é compatível com outros estudos de *Heleobia*, como Szarowska et al. (2014) que utilizaram uma divergência de 4,2% para separar espécies de *Heleobia* européias.

*Heleobia* sp. nov. diferiu de outras espécies do gênero apresentadas em trabalhos de cunho morfológico (HAAS, 1955; GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; SILVA; THOMÉ, 1985; HERSHLER; THOMPSON, 1992; SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004; OVANDO; DE FRANCESCO, 2011; COLLADO et al., 2011; 2013). Essas diferenças são notadas principalmente na morfologia do pênis, com um aspecto mamiliforme na porção final, aspecto esse, não observado nas demais espécies do gênero (GAILLARD; CASTELLANOS, 1976). Comparando com espécies próximas e já reportadas para o RJ, como *H. parchappii*, *Heleobia* sp. nov. diferencia-se por sua concha não apresentar voltas proeminentes, além do pênis de *H. parchappii* ser bem distinto, portando 5 a 10 papilas do lado côncavo de forma continua ou espaçada com formato retangular, e uma papila grande do lado esquerdo (GAILLARD; CASTELLANOS, 1976). Além disso, nos adultos de *H. parchappii*, o lado direito do pênis possui uma pigmentação escura, quando comparado a *Heleobia* sp. nov. Comparando com *H. australis*, a concha desta apresenta um contorno reto, o pênis com uma papila bem destacada no lado côncavo, e a rádula apresenta o dente raquidiano com cúspides triangulares bem destacada e afilada, não observadas em *Heleobia* sp. nov. Se compararmos com *H. davisi*, as diferenças se destacam na forma da concha, sendo esta globosa, a rádula possuindo dentes raquidianos e laterais pontiagudos, e pênis com muitas papilas agregadas no lado convexo, além de um espessamento glandular sem pigmentação, diferindo ao apresentado para *Heleobia* sp. nov. nos resultados (SILVA; THOMÉ, 1985).

Como semelhança nos aspectos reprodutivos, a observação de ovos depositados na superfície da concha também foi relatado por Neves et al. (2010) para *H. australis*.

*Heleobia* sp. nov. é conhecida somente da localidade-tipo, que apesar de inserida em uma unidade de conservação (Área de Proteção Ambiental – APA dos Tamoios), está localizada em área urbana, a Vila do Abraão, e sofre forte impacto antrópico, trazendo preocupações em relação a sua conservação. Dados populacionais de um estudo de longo prazo (2006 a 2013) apresentado por Gonçalves (2015), acompanharam a população de *Heleobia* deste mesmo riacho, resultando na metade do estudo, números expressivos, como a coleta de 279 indivíduos. No último ano do estudo, encontraram apenas um exemplar de *Heleobia* nov. sp. nas coletas bimestrais, diferindo consideravelmente dos períodos anteriores. Esses resultados escassos permaneceram até o presente estudo, com uma acentuada queda na população através dos resultados já citados.

Alem do exposto, é uma espécie insular, necessitando de medidas urgentes de conservação. Além disso, pode se tratar de uma espécie endêmica, mas necessitamos de coletas em outras localidades da Ilha Grande para confirmação.

Através de dados morfológicos e moleculares, concluímos que *Heleobia* sp. nov., de ocorrência em um riacho na Vila do Abraão, em Ilha Grande, é uma espécie nova para ciência, sendo necessárias e urgentes estratégias de conservação, como por exemplo, a implementação de saneamento básico, para a sua permanência nesse hábitat.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem: o suporte logístico oferecido pela UERJ através do CEADS (Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável); a licença concedida pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA) (Licença: 18/2007) para coleta na Ilha Grande; ao Sisbio licença 49368-2. Agradecimentos para Ana Maria Furtado e Jéssica Pereira Machado (Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro) pelas imagens de microscopia eletrônica; Prof. Dra. Lena Geise que gentilmente disponibilizou o uso do microscópio estereoscópico para as fotografias das conchas. Pela bolsa de Doutorado concedida pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pesquisa do Ensino Superior) a ICBG; ao financiamento da Faperj para SBS (E-26-110430/2007; E-26-410402/2010).

## **REFERÊNCIAS**

COLLADO, G.A.; MÉNDEZ, M.A.; LETELIER, S.; VELIZ, D.; SABANDO, M.C. Morfología peniana y taxonomía del género *Heleobia* Stimpson, 1865 en Chile junto a una

revisión de los ejemplares tipo del Museo Nacional de Historia Natural de Chile. *Amici Molluscarum, Número Especial*, 49–58, 2011.

COLLADO, G.A.; VALLADARES, M.A.; MÉNDEZ, M.A. Hidden diversity in spring snails from the Andean Altiplano, the second highest plateau on Earth, and the Atacama Desert, the driest place in the world. *Zoological Studies* 52, 1-13, 2013.

COLLADO, G.A.; VALLADARES, M.A.; MENDEZ, M.A. A new species of *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) from the Chilean Altiplano. *Zootaxa*, 4137(2), 277-280, 2016.

DIVER, C. A method to determining the number of whorls of a shell and its application to *Cepaea hortensis* Müll. *Proceedings of the Malacological Society of London* 19: 1930 – 1931, 1931.

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.

GAILLARD, M.C.; DE CASTELLANOS, Z.A. Mollusca, Gasteropoda, Hydrobiidae. In: Ringuelet, R.A. (Eds.), *Fauna de agua dulce de la República Argentina*, 15 (2), pp. 1–39, 1976.

GONÇALVES, I.C.B. Estudo temporal de longo prazo da comunidade de moluscos límnicos em um riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil. 2015. 92 pp. *Dissertação* (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Programa de Pós Graduação em Ecologia e Evolução, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

HAAS, F. On non-marine shells from Northeastern Brazil and Peru. *Fieldiana (Zoology)* 37, 303-337, 1955.

HEBERT, P.D.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (1512), 313-321, 2003.

HERSHLER, R.; LANDYE, J.J. Arizona Hydrobiidae (Prosobranchia: Rissoacea): *Smithsonian contributions to zoology*, 459. 72p, 1988.

HERSHLER, R.; THOMPSON, F.G. A review of the aquatic gastropod subfamily Cochliopinae (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Malacological Review, Supplement* (5): 1-140, Supplement, 1992.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120, 1980.

KOCH, E.; MARTIN, S.M.; CIOCCO, N.F. A molecular contribution to the controversial taxonomical status of some freshwater snails (Caenogastropoda: Rissooidea, Cochliopidae) from the Central Andes desert to Patagonia. *Iheringia, Série Zoologia*, 105 (1), 69–75, 2015.

KROLL, O.; HERSHLER, R.; ALBRECHT, C.; TERRAZAS, E.M.; APAZA, R.; FUENTEALBA, C.; WOLFF, C.; WILKE, T. The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: Correlation between molecular evolution and hydrographic history. *Ecology and Evolution*, 2 (7), 1517–1530, 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33, 1870–1874, 2016.

MIYAHIRA, I.C. Moluscos de água doce da Ilha Grande, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brasil: Diversidade e distribuição. *Monografia de Bacharelado*. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 71p, 2009.

NEVES, R.A.F.; VALENTIN, J.L.; FIGUEIREDO, G.M. Morphological description of the gastropod *Heleobia australis* (Hydrobiidae) from egg to hatching. *Brazilian Journal of Oceanography*. 58 (3): 247–250, 2010.

d'ORBIGNY, A.D. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum in suo per Americam Meridionalem itinere collectorum. *Magasin de zoologie, d'anatomie comparée et de palaeontologie*, 5 (61–62), 1–44. 1835.

OVANDO, X.M.C.; DE FRANCESCO, C.G. El género *Heleobia* en el noroeste argentino. In: Cazzaniga, N.J. (editor): El género *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) en América del Sur. In: *Amici Molluscarum*, Número especial: 22-25pp, 2011.

RIDGWAY, R. *Color standards and color nomenclature*. Published by the author. Washington, D.C. 163 pp. + color plates I–LIII, 2005.

ROCHA, C.F.D.; BERGALLO, H.G.; ALVES, M.A.S.; SLUYS, M.V.; MAZZONI, R.; SANTOS, S.B. Estudos para o Plano de Manejo do Parque Estadual da Ilha Grande- Fauna de Ambientes Interiores. Relatório Técnico. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Sub-reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável, Rio de Janeiro. 82p., 2008.

ROCHA, C.F.D.; BERGALLO, H.G.; ALVES, M.A.S.; SLUYS, M.V.; MAZZONI, R.; SANTOS, S.B. *Fauna de Ambientes Interiores*. In: BASTOS, M. CALLADO, C. (orgs.). O Ambiente da Ilha Grande. Rio de Janeiro, UERJ/CEADS, 2009. p. 141-218.

SAMBROOK J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009.

SANTOS, S.B.; RODRIGUES, C.L.; NUNES, G.K.M.; BARBOSA, A.B.; LACERDA, L.E.M.; MIYAHIRA, I.C.; VIANA, T.A. Estado do conhecimento da fauna de invertebrados não-marinhas da Ilha Grande (Angra dos Reis, RJ). *Oecologia Australis* 14 (2): 504-549, 2010.

SILVA, M.C.P. da. Dados morfológicos de *Heleobia parchappei* (Orbigny, 1835) (Prosobranchia, Hydrobiidae, Littoridininae). *Iheringia, Série Zoologia*, v. 75, p. 81-87, 1993.

SILVA, M.C.P.; THOMÉ, J.W. Uma nova espécie *Heleobia* (Prosobranchia: Hydrobiidae) do “Rio” Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biologia*, 45 (4), 515–534, 1985.

SILVA, M.C.P. da; VEITENHEIMER-MENDES, I.L. Nova espécie de *Heleobia* (Rissooidea, Hydrobiidae) da planície costeira do sul do Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*, 94 (1), 89–94, 2004.

SZAROWSKA, M. Molecular phylogeny, systematics and morphological character evolution in the Balkan Rissooidea (Caenogastropoda). *Folia Malacologica*, 14, 99–168, 2006.

SZAROWSKA, M.; HOFMAN, S.; OSIKOWSKI, A.; FALNIOWSKI, A. *Heleobia maltzani* (Westerlund, 1886) (Caenogastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) from Crete and species-level diversity of *Heleobia* Stimpson, 1865 in Europe. *Journal of Natural History*, 48, 41-42: 2487-2500, 2014.

WILKE, T.; DAVIS, G.M.; FALNIOWSKI, A.; GIUSTI, F.; BODON, M.; SZAROWSKA, M. Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 151 (1): 1-21, 2001.

WILKE, T.; HAASE, M.; HERSHLER, R.; LIU, H. P.; MISOF, B.; PONDE, W. Pushing short DNA fragments to the limit: Phylogenetic relationships of ‘hydrobioid’ gastropods (Caenogastropoda: Rissooidea). *Molecular phylogenetics and evolution*, 66 (3), 715-736, 2013.

## 4.2 Categoria 2: *Heleobia australis* (Truncatelloidea: Cochliopidae) na América do Sul: uma espécie de ampla distribuição ou três espécies locais?

### Resumo

*Heleobia* Stimpson, 1865 é um gênero de gastrópodes dulciaquícolas e estuarinos com ampla distribuição na América do Sul, e em menor riqueza para outros continentes. Durante muito tempo, *H. australis*, *H. australis nana* e *H. isabelleana* foram tratadas como espécies válidas, apesar de alguns autores reportarem sua semelhança e proporem o grupo “australis”. O estudo investigou aspectos morfológicos (concha, anatomia do pênis e rádula) e moleculares (DNAmt – COI) de cinco populações do complexo “australis” a fim de confirmar sua validade. As coletas ocorreram entre outubro de 2010 e novembro de 2018, com duas populações provenientes do Uruguai (Laguna de Rocha e Rio de La Plata), e três do Brasil (Baía de Guanabara, Lagoa de Jacaré e Lagoa de Marapendi). Todo o material foi fixado em álcool 96° e 70° para análises moleculares e estudos anatômicos, respectivamente. Para a morfometria, 121 conchas foram fotografadas e medidas, seguida de uma MANOVA (ou PERMANOVA) e análise discriminante para observar diferenças entre as populações. Para a anatomia, o pênis foi dissecado e desenhado. A rádula foi obtida após a imersão em hipoclorito de sódio, seguido de lavagem em água destilada, para posterior metalização e observação ao microscópio eletrônico de varredura. Para o estudo molecular, duas formas de extrações foram utilizadas (métodos: cetyl trimethyl ammonium bromide/CTAB e Fenolclorofórmio) e os resultados obtidos no sequenciador da UERJ (Rio de Janeiro) e da empresa Macrogen (Coreia do Sul). As análises foram editadas e alinhadas pelo programa MEGA. O estudo morfológico mostrou variações na concha (forma, coloração e espessura), havendo diferenças significativas entre as cinco populações quanto a morfometria. Apenas na população da Lagoa de Marapendi, a morfometria evidenciou um dimorfismo sexual. Quanto à anatomia peniana, observou-se um padrão na forma, mas uma variação na quantidade de glândulas apócrinas. A rádula diferiu muito pouco entre as populações estudadas. A biologia molecular apresentou baixa divergência genética entre os animais, com uma variação máxima interpopulacional igual a 2%. O estudo nos permitiu concluir que *H. australis*, *H. australis nana* e *H. isabelleana* são a mesma espécie, que apresenta variações na forma da concha, mas não na anatomia do pênis, rádula e DNA. Essas variações podem estar associadas a fatores ambientais como salinidade, dureza e teor de cálcio dissolvido na água. Logo, propomos a sinonímia destas com *H. australis*, táxon válido pelo Princípio de Prioridade.

**Palavras-chave:** estudo molecular; fatores ambientais; medidas lineares; morfometria; variação morfológica.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Heleobia* Stimpson, 1865 abriga aproximadamente 104 espécies, sendo *H. culminea* (d'Orbigny, 1840) do Lago Titicaca, Bolívia, a espécie-tipo. Ocorre desde a Ásia, África, Europa e, principalmente, na América do Sul. Os representantes do gênero são em geral dioicos e com desenvolvimento direto, com exceção de *H. australis* (d'Orbigny, 1835) e *H. charruana* (d'Orbigny, 1840), que apresentam desenvolvimento indireto com a presença de uma larva véliger (MARCUS; MARCUS, 1963b; NEVES et al., 2010).

Assim como outras espécies do gênero, *H. australis* é envolta em problemas taxonômicos. Originalmente foi descrita por d'Orbigny (1835) como *Paludina australis* d'Orbigny, 1835 a partir de exemplares provenientes da baía de Montevideu, Uruguai, sendo esta sua localidade-tipo. Posteriormente, d'Orbigny (1840) criou o subgênero *Paludestrina* e alocou os representantes de *Paludina* oriundos da América do Sul, acrescentando informações sobre a pigmentação das partes moles, detalhes do tentáculo, além de apresentar ilustrações que originalmente restringiam-se sobre as conchas. A partir dos trabalhos de Souleyet (1852), a espécie passou a ser chamada *Littoridina australis*, e só a partir de Davis et al., (1982) passou a ser reconhecida como *Heleobia australis*.

O primeiro registro da espécie para o Brasil foi feito por Martens (1868) sob o nome *Hydrobia australis* (Martens, 1868), para o Rio Grande do Sul. Rios (1994; 2009) citou a distribuição de *H. australis* para São Paulo até Baía San Blás, Argentina. Este autor reportou sua ocorrência em ambiente estuarino para o Saco da Mangueira, Rio Grande, Rio Grande do Sul, sobre as plantas aquáticas *Ruppia maritima* (Angiospermae: Ruppiaceae) e *Enteromorpha* sp. (Viridiplantae: Chlorophyta). Simone (2006) em seu catálogo de moluscos apontou uma ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo desde o estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, até a Patagônia.

Pilsbry (1911) relatou a existência de formas menores de *H. australis* provenientes de São Paulo, que posteriormente foram descritas por Marcus e Marcus (1963a) como a subespécie *H. australis nana* (Marcus e Marcus, 1963a), com localidade-tipo Cananéia, São Paulo, Brasil, disponibilizando dados conchiliológicos e dados anatômicos como pênis, rádula e sistema reprodutor feminino e masculino. Os animais possuíam conchas de 5 a 6 voltas (dados de Silva, 1993 por meio de medidas dos parátipos ANSP305214). Possui uma concha cônica-alongada, contorno reto, marcada com linhas de crescimento, voltas planas e peristômio incompleto. O pênis pigmentado, gradualmente afilado até sua extremidade, lobo de coloração marrom no lado côncavo e glândulas apócrinas no lado convexo, em número de uma a quatro, podendo estar

ausente. O autor ressalta na parte posterior ou entre as glândulas apócrinas, há um grande espessamento glandular de base larga. Anos depois, Gaillard (1974) reconheceu outra subespécie, *H. australis crassa* (Gaillard, 1974), com localidade-tipo em San Antonio Oeste, Província de Río Negro, Argentina, trazendo também detalhes da concha, pênis e rádula. A autora destaca uma concha de forma cônica, marcada por linhas de crescimento com seis voltas planas. Na anatomia do pênis, uma pigmentação negra mais dispersa no lado convexo. No lado côncavo, presença de uma papila destacada e pouco pigmentada. Ambas as subespécies descritas foram encontradas em ambientes salobros e estuarinos, com desenvolvimento indireto.

*Heleobia isabelleana* (d'Orbigny, 1840) foi descrita para um arroio nas proximidades de Montevideú, Uruguai, no contato da água doce com a água salgada. A descrição original é baseada em conchas descritas conforme a seguir: concha cônica alongada, contorno reto, cor clara, translúcida, lisa, voltas planas, peristômio completo; lábio externo fino e lábio interno espesso; abertura oval (d'Orbigny, 1840). No mesmo trabalho, o autor afirma que a espécie é “vizinha” das duas espécies precedentes no trabalho, a saber: *H. australis* e *H. charruana* (d'Orbigny, 1840), por suas voltas planas e não convexas.

Gaillard e Castellanos (1976) revisaram algumas espécies de *Heleobia* da Argentina e Uruguai, e propuseram uma chave dicotômica, além de agrupamentos taxonômicos, baseados na concha, anatomia do pênis e rádula. Um desses grupos, as autoras chamaram de “australis”, e incluíram *H. australis australis*, *H. australis nana*, *H. australis crassa* e *H. isabelleana*. Estes grupos não tem status taxonômico, mas indicam uma semelhança entre as espécies neles incluídas.

Silva e Davis (1983) redescreveram os tipos propostos por d'Orbigny, incluindo *H. australis* e *H. isabelleana*, fornecendo medidas da concha do material-tipo. Nesse trabalho, os autores rejeitaram o lote de sítipos com cinco exemplares de *H. isabelleana* disponível no British Museum (12.4.344), pois o material, apenas conchas, não era compatível com a descrição original, nem com a ilustração do trabalho de d'Orbigny (1840).

Aguirre e Farinati (2000) afirmaram que *Heleobia australis* é uma espécie polimórfica, e sua distribuição ocorre em função da salinidade por toda a costa Sul da América do Sul (desde a Lagoa dos Patos, RS – Brasil, até San Antônio, Rio Negro - Argentina). Nesse trabalho e em Aguirre e Urrutia (2002), os autores consideraram *L. isabelleana*, *L. charruana*, *L. conexa*, *L. australis crassa*, *L. australis nana*, *L. miaulis* (Marcus e Marcus, 1965) e *L. 'mediana'* (*sic*) (nome vulgar proposto nesses trabalhos como um morfotipo intermediário) como sinônimos de *H. australis*, com base apenas na concha. Apesar da contribuição taxonômica, o trabalho não

investigou aspectos anatômicos das espécies e por isso não foi considerado por autores subsequentes, e as espécies continuaram sendo reconhecidas como válidas (SILVA, 2003; DE FRANCESCO; ISLA, 2004; SIMONE, 2006; RUMI et al., 2008; CAZZANIGA, 2011; ETCHEGOIN, MERLO, 2011; MERLO; ETCHEGOIN, 2011). Rios (1994; 2009) sugeriu *Littoridina australis nana* como sinônimo de *H. australis* através de uma observação pessoal da Profa. Dra. Maria Cristina Pons da Silva. Simone (2006) elevou a subespécie *H. australis nana* a categoria de espécie *H. nana*, mas não apresentou nenhuma justificativa para essa mudança.

Aspectos moleculares de *Heleobia*, na América do Sul, foram abordados para espécies da Argentina, Bolívia, Peru e Chile (KROLL et al., 2012; COLLADO et al., 2013; KOCH et al., 2015; VALLADARES et al., 2018). Destacamos o trabalho de Kroll et al. (2012) que disponibiliza uma única sequência de *H. australis* proveniente do município de Mar Chiquita, na província de Buenos Aires, Argentina. Até o momento, não existem dados moleculares disponíveis para outras espécies e subespécies do grupo “australis”.

Tendo em vista as controvérsias da literatura em relação à validade das espécies e subespécies do grupo “australis” (*H. a. australis*, *H. a. nana* e *H. isabelleana*) e a escassa informação molecular, o objetivo deste trabalho foi averiguar o real status taxonômico destas espécies e subespécies através de dados morfológicos e moleculares.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Coletas:** O material foi coletado entre outubro 2017 e novembro de 2018 em localidades consideradas de abrangência da distribuição original, visto que a localidade-tipo das espécies analisadas incluídas no Grupo “australis” é ampla, como por exemplo, a Baía de Montevideú. A Tabela 1 apresenta os pontos de coleta e as coordenadas geográficas. Após a coleta, os animais foram anestesiados com cristais de mentol e fixados em álcool 70° ou 90° sendo, respectivamente, para a análise morfológica e para análise molecular. Nesse último caso, foi mantido em freezer -15°C até o processamento. Todo o material encontra-se tombado na Coleção Científica de Moluscos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

**Consulta às coleções científicas:** Para estudo comparativos, foi solicitado empréstimo dos topótipos de *H. australis nana* ao acervo do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZSP 134043 e 24944). Além deste, foi solicitado fotografias do lectótipo de *H. australis*, designado por Silva e Davis (1983), ao Natural History Museum of United Kingdom (NHUK 1854124345).

**Tabela 1** - Dados do material utilizado no trabalho com os pontos de coleta, número de coleção e data de coleta.

<b>Espécies</b>	<b>Pontos de coleta</b>	<b>N</b>	<b>Coleção</b>	<b>Data</b>
<i>Heleobia australis</i> (d'Orbigny, 1835)	Laguna de Rocha - Rocha, Uruguai (-34.664344S; -54.231831W)	28	UERJ 11439	08/10/2017
	Lagamar - Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil (-22.05956S; -41.08363W)	20	UERJ 11461	02/11/2017
<i>Heleobia australis nana</i> (Marcus & Marcus, 1963a)	Baía de Guanabara - Magé, RJ, Brasil (-22.70821S; -43.14277W)	26	UERJ 11837	06/11/2018
	Lagoa de Marapendi - Rio de Janeiro, RJ, Brasil (-23.004591S; -43.250148W)	29	UERJ 11552	01/07/2017
<i>Heleobia isabelleana</i> (d'Orbigny, 1840)	Rio de La Plata - Playa Carrasco, Montevideo, Uruguai (-34.890742S; -56.051900W)	29	UERJ 11440	08/10/2017

Fonte: A autora (2020).

**Morfologia da concha:** Os exemplares tiveram as conchas limpas com solução comercial de hipoclorito de sódio para retirada de algas de sua superfície que poderiam dificultar a fotografia das mesmas. Os caracteres morfológicos utilizados foram propostos por Hershler e Ponder (1998). Para análise morfométrica, foi obtida a fotografia de 132 conchas oriundas de cinco populações (Tabela 1). Para esta etapa, foram considerados apenas exemplares adultos com o sistema reprodutor desenvolvido. Adotou-se esse critério para diminuir as diferenças morfométricas em função da idade dos indivíduos. A contagem do número de voltas seguiu Diver (1931), e a conquiliomorfometria Hershler e Landye (1988). As medidas obtidas foram: comprimento (C), largura (L), comprimento da volta corporal (CVC), comprimento da espira (CE), comprimento da abertura (CA) e largura da abertura (LA). Além das medidas lineares, foram obtidas proporções como C/L, CE/CVC; C/CA, L/LA e CA/LA. Para investigação de dimorfismo sexual na morfometria das conchas de cada população, realizamos a análise multivariada MANOVA (para dados paramétricos) ou PERMANOVA (para dados não paramétricos). Havendo diferença significativa na morfometria, consideramos apenas os machos da população na Análise Discriminante, no qual serve para averiguarmos uma variação conquiliométrica entre as populações. Para isso, montamos uma matriz de correlação e retiramos as variáveis altamente correlacionadas (<0,95). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico PAST versão 3.25.

**Morfologia peniana e rádula:** Para o estudo da anatomia, aplicou-se a técnica de esmagamento da concha, para exposição das partes moles (SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004). O pênis foi exposto a partir da retirada do manto e desenhado em câmara clara Nikon SMZ800- C-DS. A rádula foi extraída do bulbo bucal e colocada em solução comercial de hipoclorito de sódio diluído (1:1) (SOLEM, 1972). Depois de limpa, foi imersa em água destilada para retirada do hipoclorito, e depositada sobre um stub com fita de cobre para visualização em microscópio eletrônico de varredura (Modelo Jeol – JSM- 6510LV). A descrição da rádula e anatomia do pênis seguiram Silva e Veitenheimer-Mendes (2004). Utilizamos cinco pênis e três rádulas de cada população para observamos um determinado padrão.

**Análise Molecular:** A extração do DNA foi a partir do animal inteiro, exceto o o bulbo (utilizado para análise rádula), o pênis (para análise morfológica), e a glândula digestiva (retirada para evitar contaminações). Inicialmente, cinco indivíduos foram submetidos a extração do DNA a partir do método CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) ou através do método de Fenol Cloroformio, adaptados de Winnepennickx et al. (1993) e Sambrook et al. (1989), respectivamente. Sequências parciais do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase com os primers HCO2198 e LCO1490 (FOLMER et al., 1994). O protocolo de PCR foi adaptado a partir de Folmer et al. (1994): desnaturação a 94°C durante 2,5 min, seguida de 40 ciclos de 30s a 90°C, 1 min a 48° C com decréscimo de temperatura de 0,3°C e 1 min a 72°C, e um passo final de extensão durante 3 min a 72°C. A visualização do produto de amplificação foi através da eletroforese em gel de agarose 1%. Após amplificação, parte do material foi sequenciado pela empresa MacroGen Inc. (Seul, Coréia do Sul), e outra parte foi sequenciado no Brasil (LDD – Laboratório de Diagnóstico de DNA – UERJ) utilizando BigDye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc.). Os produtos do sequenciamento foram processados por um sistema capilar automatizado ABI 3500 (Applied Biosystems, Inc.).

As sequências foram visualizadas no programa Chromas 2.6.5, editadas e alinhadas no programa MEGA 7.1.3.0 (KUMAR et al., 2016). Para construção de árvores, matriz de distância genética e a análise de máxima verossimilhança, utilizamos o mesmo programa. O grupo externo utilizado foi *Onobops jacksoni* (Bartsch, 1953). As sequências obtidas durante este estudo serão depositadas no GenBank quando ocorrer a submissão formal do artigo. Todo o material utilizado está listado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Lista do material disponível no GenBank e coletados neste trabalho para análises moleculares.

<b>Espécies</b>	<b>Procedência</b>	<b>Referência</b>	<b>Acesso GenBank</b>
<i>Heleobia australis</i> (d'Orbigny, 1835)	Mar Chiquita, Argentina	Kroll et al., 2012	JQ972708
<i>H. andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1835)	Lago Arapa, Arapa, Peru	Kroll et al., 2012	JQ973033
<i>H. andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1835)	Lago Titicaca, Huarina, Bolívia	Kroll et al., 2012	JQ973030
<i>H. andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1835)	Lago Titicaca, Baía Ramis, Peru	Kroll et al., 2012	JQ973029 JQ973031
<i>H. andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1835)	Lago Umayo, Ilha Umayo, Peru	Kroll et al., 2012	JQ973034
<i>Heleobia parchappii</i> (d'Orbigny, 1835)	Mar Chiquita, Argentina	Kroll et al., 2012	JQ972709
<i>Heleobia piscium</i> (d'Orbigny, 1835)	Isla Martín García, Argentina	Koch et al., 2015	KM220906
<i>Heleobia isabelleana</i> (d'Orbigny, 1840)	Punta Trouville, Montivideo, Uruguai	Presente trabalho	Em elaboração
<i>Heleobia isabelleana</i> (d'Orbigny, 1840)	Playa Penino, San José, Uruguai	Presente trabalho	Em elaboração
<i>Heleobia australis</i> (d'Orbigny, 1835)	Laguna de Rocha, Rocha, Uruguai	Presente trabalho	Em elaboração
<i>Heleobia australis</i> (d'Orbigny, 1835)	Lagamar, Campos dos Goytacazes, RJ	Presente trabalho	Em elaboração
<i>H. australis nana</i> (Marcus & Marcus, 1963)	Ilha do Governador, Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, RJ, Brasil	Presente trabalho	Em elaboração
<i>H. australis nana</i> (Marcus & Marcus, 1963)	Lagoa de Marapendi, RJ, Brasil	Presente trabalho	Em elaboração
<i>Heleobops carrikeri</i> Davis & McKee, 1989	Oyster Pond, Falmouth, Estados Unidos	Kroll et al., 2012	JQ973018 JQ973019
<i>Heleobops carrikeri</i> Davis & McKee, 1989	Maryland, Dorchester, Estados Unidos	Wilke et al., 2001	AF213347
<i>Heleobops docimus</i> Thompson 1968	Cayman Islands, Pond em Chisholm Point	Hershler et al. 1999	AF129322
<i>Onobops jacksoni</i> (Bartsch, 1953) – <b>Grupo Externo</b>	Maryland, Town, Estados Unidos	Wilke et al., 2001	AF367645

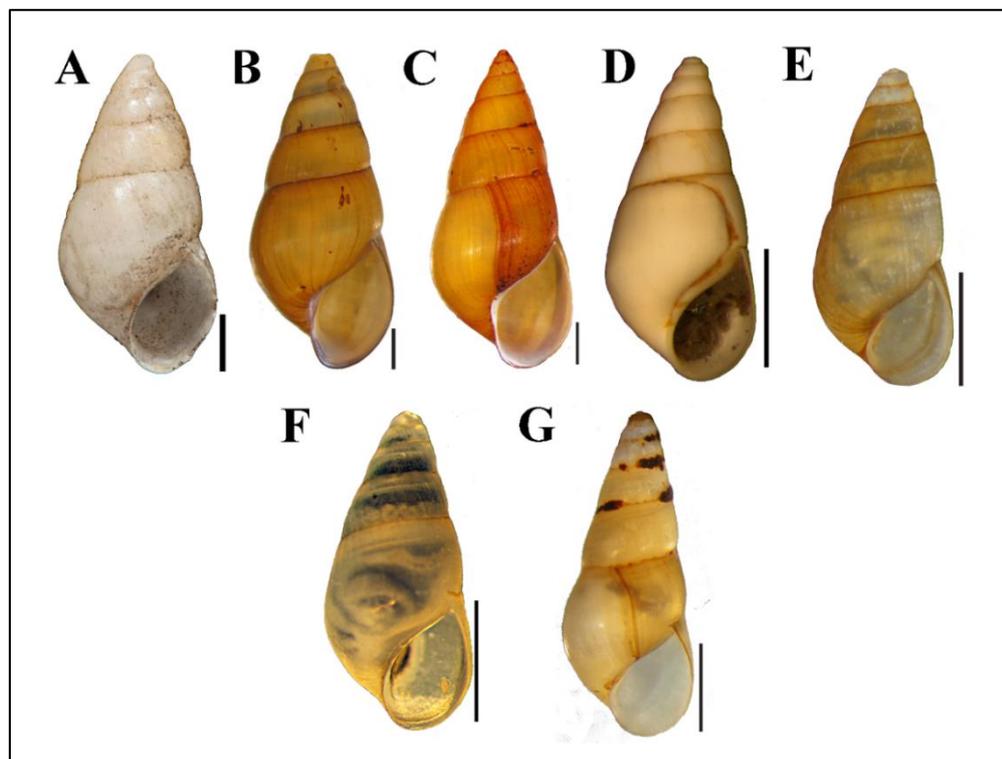
Fonte: A autora (2020).

## RESULTADOS

### Morfologia

**Concha** (Figura 1 A-G): A morfologia da concha evidencia diferenças entre as populações analisadas. Na Figura 1A referente ao lectótipo de *H. australis* por Silva e Davis (1983), percebemos uma concha como descrita por d’Orbigny (1835) com o contorno reto e voltas planas. A população de Laguna de Rocha, Uruguai (Figura 1C) apresenta uma concha muito espessa e rígida, com coloração castanho clara. Estas possuem as conchas mais resistentes se comparada às demais populações. A população da Baía de Guanabara (Figura 1E) também apresenta o oposto da população anterior, com coloração castanho clara, conchas mais finas, de tamanho diminuto e desgastadas. As outras populações, representadas pelas Figuras 1 B, F, G são dotadas de formas intermediárias quanto à espessura da concha e coloração do perióstraco. Na Figura 1D, observamos o topótipo de *H. australis nana* (MZSP 134043), sendo este bem semelhante às conchas da população da Baía de Guanabara (Figura 1E), o que caracteriza o morfotipo *H. australis nana* para esta localidade.

Figura 1 - Conchas do grupo “australis”.



Legenda: A – Lectótipo *H. australis*. (NHUK 1854124345). B – Lagamar. C – Laguna de Rocha. D – Topótipo *H. australis nana* (MZSP 134043). E – Baía de Guanabara. F – Marapendi. G – Rio de La Plata.

Fonte: A autora (2020), exceto a Figura A (fornecida pelo curador da coleção científica NHUK (Natural History Museum of United Kingdom). Escala: 1 mm.

Relacionado a conquiliomorfologia, percebemos que todas apresentam a forma típica do grupo “australis”: concha do tipo cônica alongada, contorno reto com voltas planas, textura lisa, coloração variando do castanho claro a escuro, não umbilicada, e espira longa.

A estatística descritiva das variáveis conquiliométricas, assim como o número de voltas das cinco populações estão representadas na Tabela 3. Percebe-se que a população de Laguna de Rocha possui os maiores valores médios em todas as variáveis lineares, além das proporções L/LA e CA/LA, e no número de voltas. No extremo oposto, a população da Baía de Guanabara obteve os menores valores de todas as variáveis, apesar do número de voltas não diferir claramente das outras populações. Já a população de *H. isabelleana* do Rio de La Plata apresentou a maior média das proporções C/CA e CE/CVC, com o desvio padrão baixo, o que indica pouca variação intrapopulacional. A proporção CE/CVC foi igual a 0,78, indicando que a cada 1 mm de CVC, o animal apresenta 0,78 mm de espira, sendo proporcionalmente mais alongada quando comparada com as outras espécies do complexo. Esses resultados podem ser confirmados pela disposição espacial em dois eixos no gráfico da Análise Discriminante (Figura 2).

Tabela 3 - Estatística descritiva da conquiliometria de cinco populações do grupo “australis” com média e desvio padrão.

Variáveis e nº de voltas	Rio de La Plata (N=29)	Laguna de Rocha (N=28)	Lagoa de Marapendi (N=17)	Baía de Guanabara (N=26)	Lagamar (N=20)
C	4,0 ± 0,23	7,62 ± 0,44	3,66 ± 0,41	2,75 ± 0,21	4,62 ± 0,65
L	1,69 ± 0,99	3,52 ± 0,18	1,77 ± 0,15	1,28 ± 0,08	2,05 ± 0,24
CVC	2,25 ± 0,13	4,66 ± 0,21	2,32 ± 0,21	1,74 ± 0,11	2,80 ± 0,33
CE	1,75 ± 0,17	2,96 ± 0,30	1,34 ± 0,21	1,00 ± 0,12	1,81 ± 0,36
CA	1,40 ± 0,08	3,13 ± 0,15	1,52 ± 0,14	1,07 ± 0,07	1,76 ± 0,22
LA	1,04 ± 0,05	2,04 ± 0,13	1,09 ± 0,07	0,77 ± 0,05	1,21 ± 0,13
C/L	2,37 ± 0,10	2,16 ± 0,08	2,06 ± 0,14	2,13 ± 0,10	2,25 ± 0,15
CE/CVC	0,78 ± 0,08	0,63 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,57 ± 0,05	0,64 ± 0,08
C/CA	2,85 ± 0,13	2,43 ± 0,12	2,40 ± 0,11	2,54 ± 0,12	2,61 ± 0,16
L/LA	1,62 ± 0,04	1,72 ± 0,06	1,62 ± 0,05	1,66 ± 0,04	1,68 ± 0,06
CA/LA	1,34 ± 0,04	1,53 ± 0,07	1,39 ± 0,06	1,39 ± 0,05	1,44 ± 0,07
NV	5,8	6,8	5,4	5,9	4,7

Legenda: Comprimento (C), Largura (L), Comprimento da volta corporal (CVC), Comprimento da espira (CE), Comprimento da abertura (CA), Largura da abertura (LA) Número de voltas (NV). Medidas em mm nas variáveis e em graus no número de voltas.

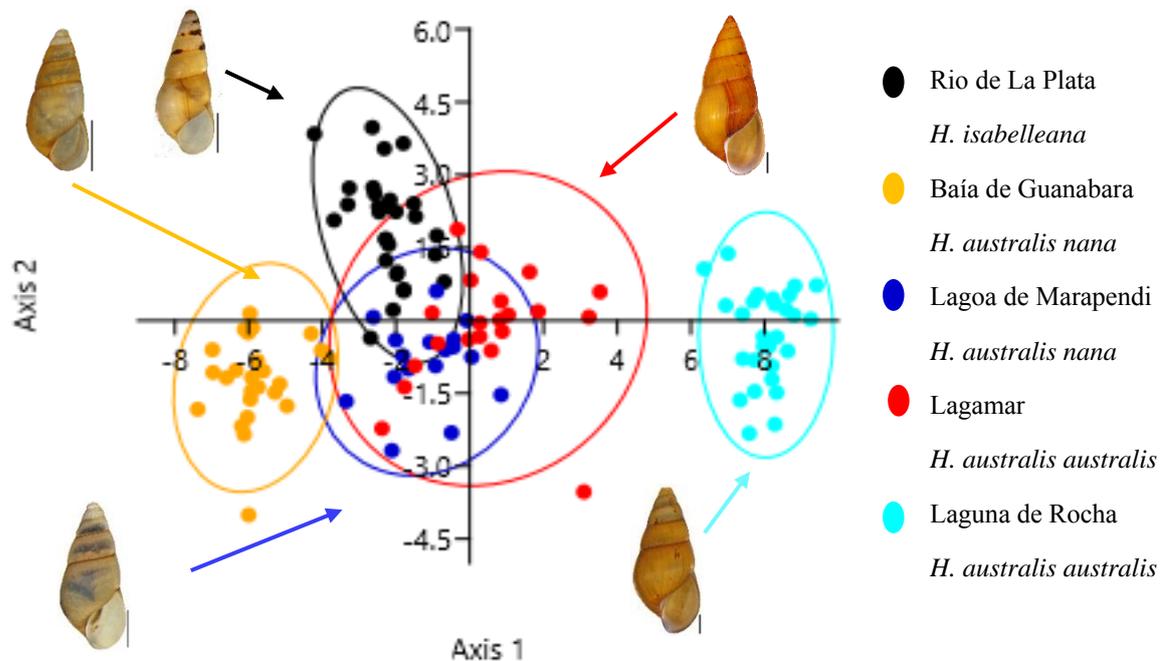
Fonte: A autora (2020).

O dimorfismo sexual investigado por meio da morfometria da concha em todas as populações, só foi observado na população de *H. australis nana* da Lagoa de Marapendi ( $p < 0,05$ ), diferindo significativamente entre machos e fêmeas ( $p > 0,005$ ). Nas demais populações a morfometria mostrou que a concha não diferiu entre os sexos. Por esse motivo, só foi utilizado os valores dos machos da população da Lagoa de Marapendi, diferindo no número de conchas medidas na Tabela 1.

A análise discriminante dos caracteres morfométricos das cinco populações apresentou grupos bem definidos, com algumas sobreposições (Figura 2; Tabela 4). O eixo 1 representou 92,5% da variação dos dados, e o eixo 2 5,2%. No eixo 1, a variável com maior valor CA/LA explica a distribuição dos pontos na linha vertical. Já no eixo 2, a variável E/CVC foi a principal responsável pela discriminação dos grupos horizontalmente.

As populações que se destacaram na separação dos grupos foram *H. australis* (Laguna de Rocha), *H. isabelleana* (Rio de La Plata) e *Heleobia australis nana* (Baía de Guanabara). Nota-se uma sobreposição das populações da Lagoa de Marapendi e Lagamar.

Figura 2 - Gráfico da análise discriminante das cinco populações do grupo “australis” e fotografia representativa (escala= 1 mm).



Fonte: A autora (2020).

A tabela 4 apresenta a matriz de classificação para cada população. O acerto total da tabela foi igual a 94,21%, e as populações que foram classificadas com 100% de acerto foram

as de Laguna de Rocha e Baía de Guanabara, onde os indivíduos estão bem destacados no gráfico da mesma análise (Figura 2). Seguindo o percentual de acerto, temos a população da Lagoa de Marapendi (94%), seguida de Rio de La Plata (93,1%), ambas com uma margem de acerto acima de 90%, evidenciando uma identidade bem definida. A população com menor índice foi a de Lagamar, com 80% de acerto, confirmado pela sobreposição dos pontos com diferentes populações, valor este, que ainda pode ser considerado alto.

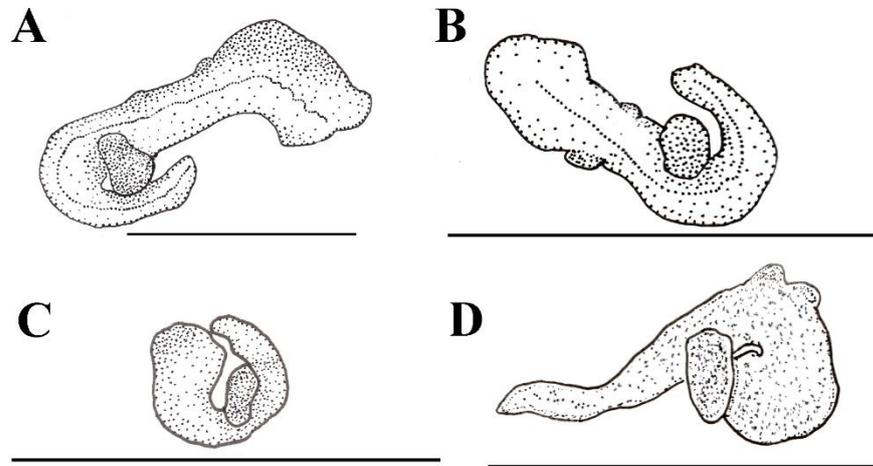
Tabela 4 - Matriz de classificação (Jackknifed) resultante da Análise Discriminante, através de dados morfométricos de cinco populações.

	Rio de La Plata	Laguna de Rocha	Lagoa de Marapendi	Baía de Guanabara	Lagamar	Total Real	Percentual de acerto (%)
Rio de La Plata	27	0	0	0	2	29	93,1
Laguna de Rocha	0	28	0	0	0	28	100
Lagoa de Marapendi	0	0	16	0	1	17	94
Baía de Guanabara	0	0	0	26	0	26	100
Lagamar	1	0	2	1	17	21	80
Total	28	28	18	27	20	121	

Fonte: A autora (2020).

**Anatomia do pênis** (Figura 3 A-D): Todas as populações se caracterizaram pela presença de um lobo proeminente e escurecido do lado côncavo do pênis de formato oval. No lado convexo, apresentam papilas ou glândulas apócrinas de formato cilíndrico que variam em número, de um a três, tanto intra e interpopulacional. Observamos também no mesmo lado, na região mais proximal à base do pênis uma região mais dilatada, como um grande espessamento de base larga, presente em todas as populações. Gaillard (1976) nomeou essa região como uma grande papila de epitélio alto.

Figura 3 - Desenho do pênis de quatro populações do grupo “australis”. A - Laguna de Rocha (*H. australis*). B – Marapendi (*H. australis nana*). C – Cananéia MZSP 24944 (topótipo de *H. australis nana*). D – Rio de La Plata. (*H. isabelleana*). Escala: 1 mm.



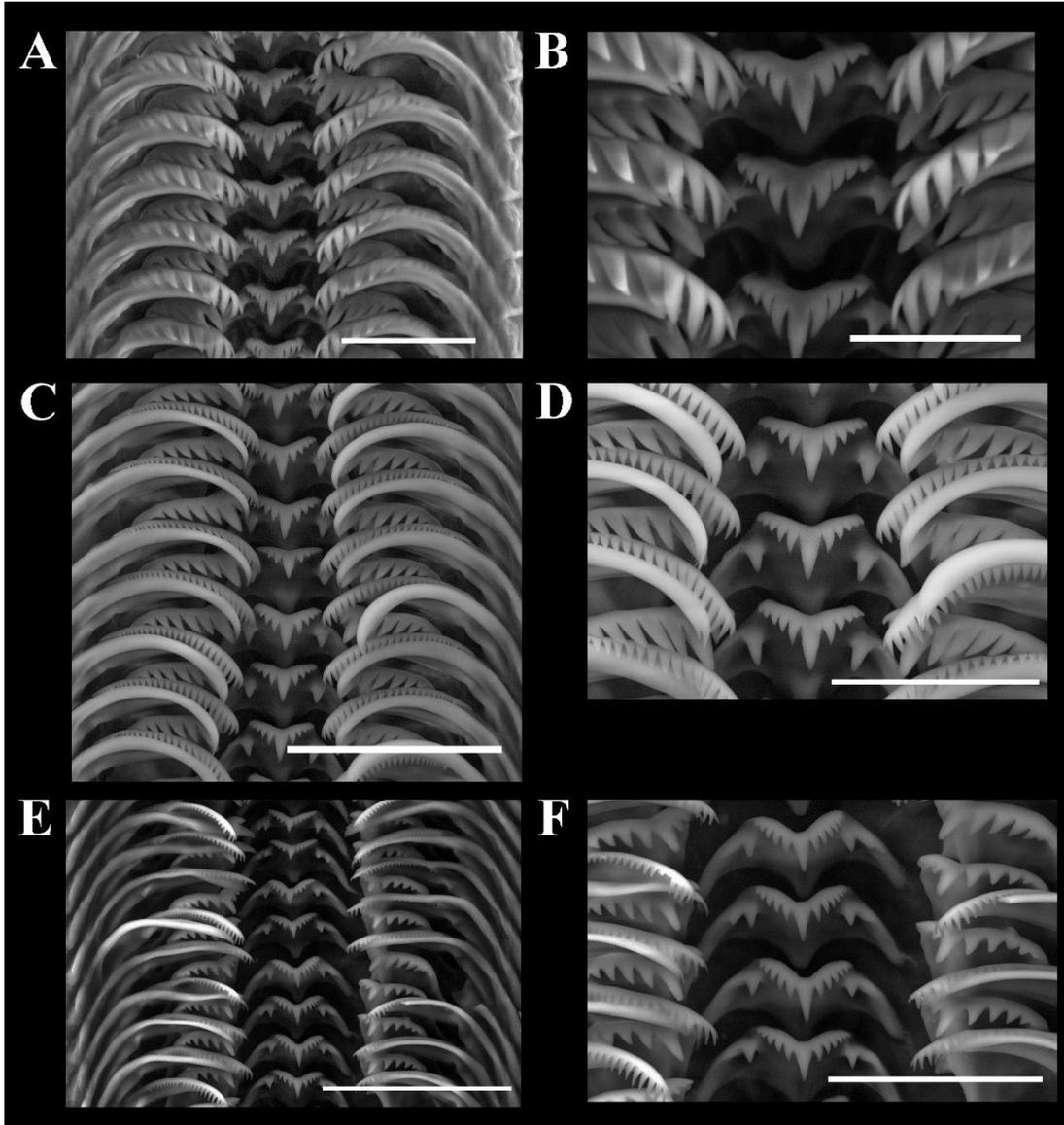
Fonte: A autora (2020).

**Rádula (Figura 4 A-F):** As populações estudadas exibiram o padrão a seguir: rádula tenioglossa, com aproximadamente 50 fileiras de dentes na fita. Fórmula radular 2-1-1-1-2, a saber: uma fileira de dente raquidiano, um par de cada lado de dente marginal, dois pares de cada lado de dente marginal (interno e externo). As três rádulas analisadas (*H. australis* da Laguna de Rocha, *H. australis nana* da Lagoa de Marapendi e *H. isabelleana* no Rio de La Plata) possuíam o dente raquidiano trapezoidal, sendo a cúspide mediana destacada com projeção pontiaguda em formato triangular. Cúspides acessórias menores, de forma semelhante, variando em número de 4 a 6. O número de cúspides basais apresentou variação nas populações. Dente lateral com fórmula (2-3) - 1 - (4-5). A cúspide mediana mais pontiaguda é maior que as demais cúspides deste dente. Dente marginal interno com um número variável de cúspides, de 25 a 30, havendo uma diminuição no tamanho conforme vai se aproximando da borda externa. Dente marginal externo com aproximadamente 30 cúspides finas e curtas de aspecto pectiniformes.

A população da Laguna de Rocha possui o dente central raquidiano com a cúspide central triangular, e as acessórias de base mais larga, e justapostas, com a mesma forma da cúspide mediana. Já as populações de Marapendi e Rio de La Plata possuem dente raquidiano de forma semelhante, com a cúspide mediana triangular e pontiaguda. Percebemos uma variação nas cúspides acessórias, com a população Rio de La Plata apresentando cúspides mais separadas umas das outras, além de ser mais pontiaguda.

Um par de denticulos basais do dente raquidiano foi visualizado nas populações da Laguna Rocha e Lagoa de Marapendi. Na população do Rio de La Plata, notamos em uma das fileiras a presença de dois pares de denticulo basal.

Figura 4 - Rádula de três espécies de grupo “australis”.



Legenda: A,B- Laguna de Rocha (*H. australis*). C,D –Marapendi (*H. australis nana*). E,F- Rio de La Plata (*H. isabelleana*) escala: A, C, E (50 μm); B, D, F (30 μm).

Fonte: A autora (2020).

Quanto à morfologia do dente lateral, percebemos que as populações de Laguna de Rocha e Marapendi são mais próximas, do que a população de Rio de La Plata. Apresentam uma projeção arqueada, assim como os dentes marginais interno e externo. Quanto às cúspides, percebemos nas duas primeiras populações, a cúspide mediana se destacando entre as demais. Na população de Rio de La Plata, o dente lateral apresentou a cúspide mediana maior que as

demais, porém em menor proporção que nas populações anteriores. Somado isso, observamos cúspides acessórias bem separadas umas das outras, sendo uma diferença das outras populações. Nas três populações o dente lateral apresenta mais cúspides acessórias na borda externa.

Nos dentes marginais, nota-se uma dificuldade na visualização dos mesmos na varredura, pois os dentes estão muito próximos um dos outros, principalmente na população da Laguna de Rocha. Nas outras populações, o dente marginal interno possui inúmeras cúspides (observamos mais de 30) de tamanho decrescente em direção a borda externa. O dente marginal externo, de aspecto pectiniforme, tem cúspides de mesmo tamanho.

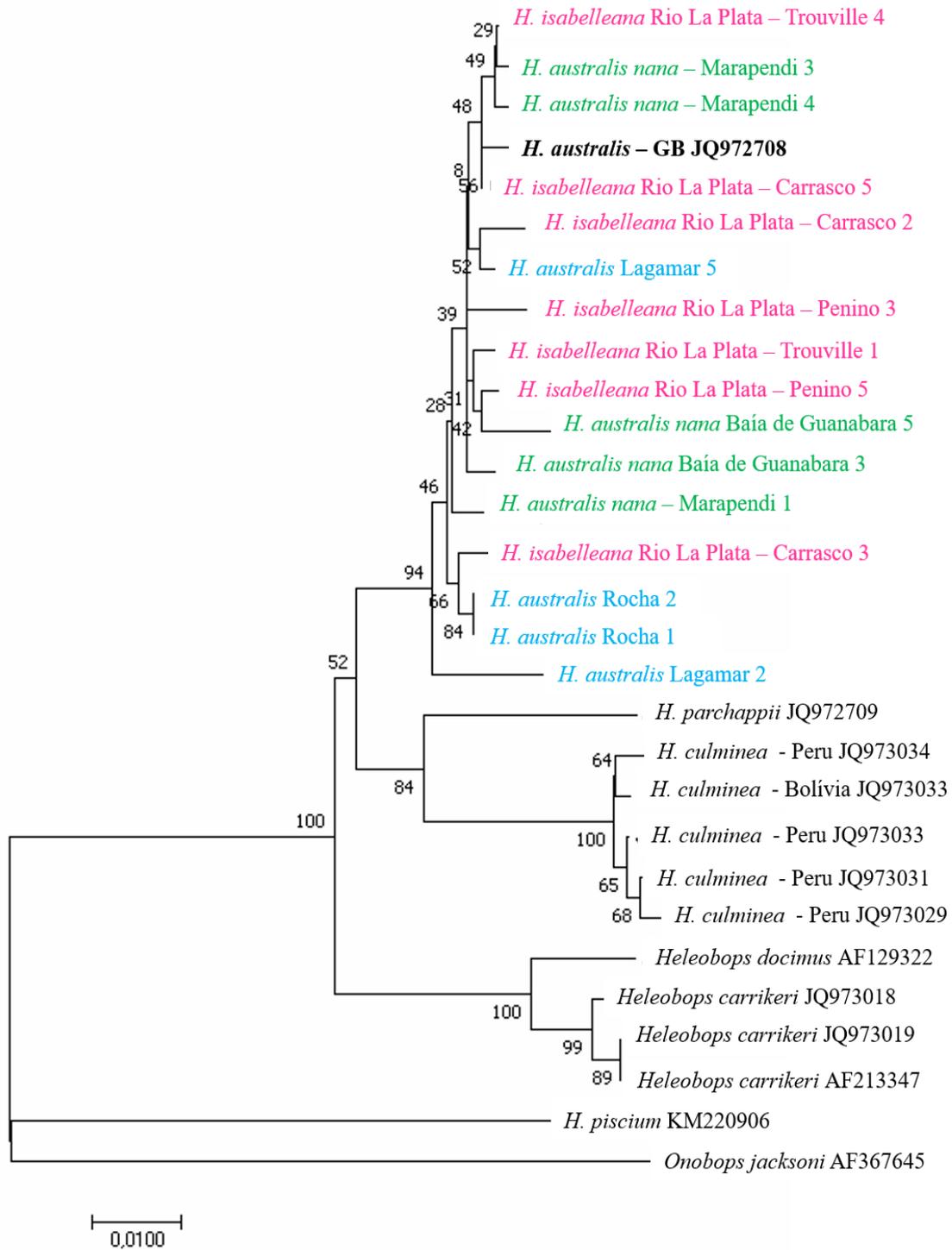
**Análise Molecular:** Retratou uma similaridade entre as populações estudadas, visto que não observamos uma separação em clados entre as populações, mas sim, clados menores com indivíduos de várias populações (Figura 5). Comparando *H. australis* disponível no GenBank (JQ972708), com a espécie-tipo do gênero *H. culminea*, observamos uma distância entre 5% e 5,6%. Se compararmos *H. australis* proveniente da Laguna de Rocha, observamos uma distância entre 4,5 e 5%. Podemos observar também que *H. parchappii* possui uma distância genética semelhante quando comparada a *H. culminea*, variando de 4,5% a 5% (Tabela 5).

Mais distante, está o clado de *Heleobops*, outro cocliopídeo, grupo-irmão de *Heleobia*. Comparativamente, este gênero dista de 6,3 a 7,0% em relação à *H. parchappii*, de 6,6 a 7,3% em relação à *H. culminea* e apresenta uma menor distância, de 4,5 a 5,6% em relação à *H. australis* (população de Lagamar).

*Heleobia piscium* apresentou a maior distância entre as espécies de *Heleobia* presentes no estudo (11,4%) quando comparada com *H. australis* do GenBank, e 13,5% quando comparada à *H. culminea*. Esse grande distanciamento fez com que *H. piscium* ficasse alocada em um clado fora do gênero *Heleobia*. Comparando com o grupo externo, a sequência de *O. jacksoni* possui uma distância acima de 12,8% para todas as sequências utilizadas.

A matriz de distância genética apresentou uma divergência de até 2% entre os indivíduos estudados do grupo “*australis*”. Essa mesma distância foi a maior variação intrapopulacional em Lagamar (Tabela5).

Figura 5 - Árvore gerada pela máxima verossimilhança (K2P) com 10.000 réplicas através de sequências obtidas de DNAmT (COI).



Fonte: A autora (2020).

**Tabela 5** - Matriz de distância genética (K2P) entre pares de sequências de DNAmT (COI) de populações de *Heleobia*. Destaque em preto para *H. australis* disponível no GenBank, e em vermelho para o grupo externo *O. jacksoni*.

	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	27	28		
1- AF367645																														
2- JQ973034	0,142																													
3- JQ973033	0,140	0,005																												
4- JQ973031	0,142	0,007	0,002																											
5- JQ973030	0,140	0,005	0,003	0,005																										
6- JQ973029	0,140	0,010	0,005	0,003	0,008																									
7- JQ973019	0,138	0,066	0,068	0,070	0,065	0,070																								
8- JQ973018	0,140	0,065	0,067	0,069	0,063	0,069	0,005																							
9- KM220906	0,134	0,135	0,133	0,135	0,133	0,135	0,134	0,132																						
10- Rocha_2	0,130	0,047	0,045	0,047	0,045	0,050	0,050	0,048	0,110																					
11- Rocha_1	0,130	0,047	0,045	0,047	0,045	0,050	0,050	0,048	0,110	0,000																				
12- JQ972708	0,132	0,052	0,050	0,052	0,050	0,056	0,055	0,054	0,114	0,010	0,010																			
13- Trouville_4	0,134	0,047	0,045	0,047	0,045	0,050	0,054	0,052	0,112	0,008	0,008	0,005																		
14- Trouville_1	0,130	0,047	0,045	0,047	0,045	0,050	0,050	0,048	0,116	0,008	0,008	0,008	0,007																	
15- Penino_5	0,130	0,050	0,048	0,050	0,048	0,054	0,054	0,052	0,116	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007																
16- Penino_3	0,136	0,050	0,048	0,050	0,048	0,054	0,054	0,052	0,114	0,012	0,012	0,012	0,010	0,010	0,010															
17- JQ972709	0,140	0,050	0,045	0,047	0,048	0,050	0,065	0,063	0,126	0,045	0,045	0,050	0,048	0,045	0,048	0,048														
18- AF213347	0,138	0,066	0,068	0,070	0,065	0,070	0,000	0,005	0,134	0,050	0,050	0,055	0,054	0,050	0,054	0,054	0,065													
19- AF129322	0,134	0,074	0,076	0,074	0,076	0,074	0,022	0,020	0,138	0,050	0,050	0,055	0,054	0,050	0,054	0,054	0,070	0,022												
20- Bandeira_5	0,132	0,047	0,045	0,047	0,045	0,050	0,054	0,052	0,120	0,015	0,015	0,015	0,013	0,010	0,010	0,017	0,045	0,054	0,054											
21- Bandeira_3	0,134	0,050	0,048	0,047	0,048	0,050	0,054	0,052	0,116	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007	0,007	0,010	0,048	0,054	0,050	0,013										
22- Carrasco_5	0,132	0,048	0,047	0,048	0,047	0,052	0,052	0,050	0,110	0,007	0,007	0,003	0,002	0,005	0,005	0,008	0,047	0,052	0,052	0,012	0,005									
23- Carrasco_3	0,128	0,045	0,043	0,045	0,043	0,048	0,048	0,046	0,114	0,005	0,005	0,012	0,010	0,010	0,010	0,013	0,043	0,048	0,052	0,017	0,010	0,008								
24- Carrasco_2	0,130	0,054	0,052	0,054	0,052	0,058	0,052	0,050	0,114	0,012	0,012	0,012	0,010	0,010	0,010	0,013	0,052	0,052	0,052	0,017	0,010	0,008	0,013							
25- Marapendi_4	0,134	0,048	0,047	0,048	0,047	0,052	0,054	0,052	0,114	0,010	0,010	0,007	0,002	0,008	0,008	0,012	0,050	0,054	0,054	0,015	0,008	0,003	0,012	0,008						
26- Marapendi_3	0,134	0,047	0,045	0,047	0,045	0,050	0,054	0,052	0,112	0,007	0,007	0,007	0,002	0,008	0,008	0,012	0,048	0,054	0,054	0,015	0,008	0,003	0,008	0,012	0,003					
27- Marapendi_1	0,128	0,048	0,047	0,048	0,047	0,048	0,048	0,046	0,109	0,007	0,007	0,010	0,008	0,008	0,008	0,012	0,047	0,048	0,048	0,015	0,008	0,007	0,008	0,012	0,010	0,010				
28- Lagamar_5	0,128	0,050	0,048	0,050	0,048	0,054	0,046	0,045	0,110	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007	0,007	0,010	0,048	0,046	0,046	0,013	0,007	0,005	0,010	0,007	0,008	0,008	0,008			
29- Lagamar_2	0,134	0,050	0,048	0,047	0,048	0,050	0,055	0,054	0,124	0,017	0,017	0,022	0,020	0,020	0,020	0,024	0,056	0,055	0,052	0,027	0,017	0,018	0,018	0,020	0,018	0,020	0,018	0,020		

Fonte: A autora (2020).

## DISCUSSÃO

Percebemos que várias espécies de *Heleobia* foram descritas somente por conchas e permaneceram válidas por um longo período de tempo (d'ORBIGNY, 1835; 1840; IHERING, 1895, GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; HERSHLER; THOMPSON, 1992). Estas identificações prévias foram utilizadas em diversos trabalhos, como levantamentos, catálogos, revisões e trabalhos com abordagens ecológicas (VEITENHEIMER-MENDES; LOPES-PITONI, 1995; SIMONE, 2006; RUMI et al., 2008; RIOS, 1975, 1994, 2009). Porém, estudos como os de McGraw (1957) e Aguirre e Farinati (2000) mostraram que devido às condições ambientais, como salinidade, dureza e teores de cálcio, podem ocorrer variações na concha, como na espessura e coloração. Goodfriend (1986) e Chiu et al. (2002) apresentaram uma revisão sobre os fatores ambientais que atuam na morfologia da concha; os quais podem induzir a erros de identificação. Desta forma, apesar do seu valor, estas informações devem ser usadas com parcimônia, e principalmente em conjunto com outras ferramentas, especialmente a anatomia interna, e de forma mais abrangente fazendo uso de uma taxonomia integrativa (GOULDING; DAYRAT, 2016).

Através do estudo da morfologia da concha, observamos as diversas populações de *Heleobia* do grupo “australis” apresentando conchas de espessas a frágeis, com coloração castanho, variando de claro a escuro. A análise conchiliométrica efetuada pela análise discriminante (Figura 1) evidencia duas populações extremas no gradiente de variação observado, correspondendo à *H. australis australis* de Laguna de Rocha, Uruguai, e à *H. australis nana* da Baía de Guanabara. Essas mesmas populações possuíram a maior identidade populacional (observada pela matriz de classificação), prevalecendo características marcantes de suas descrições originais, ou seja, conchas robustas e maiores para *H. a. australis*, e conchas mais delicadas e pequenas para *H. a. nana*. Contudo, observa-se também populações que são intermediárias a esses extremos mencionados, percebendo-se um gradiente nas características da concha, que podem estar relacionadas com fatores ambientais (UETA, 1979; AGUIRRE; FARINATI, 2000; CHIU et al., 2002). Observamos ainda uma sobreposição das populações da Lagoa de Marapendi e de Lagamar na Análise Discriminante, o que pode estar associada à similaridade dos ambientes em que estão inseridas. Ambas ocorrem em sistemas lagunares com comunicação com o mar, conseqüentemente com uma larga amplitude de salinidade devido às marés.

Aguirre e Farinati (2000) relatam que as proporções dos diferentes “morfotipos” variam geográfica e cronologicamente, relacionando-as a salinidade dos ambientes. Os autores

sugerem um agrupamento no qual *H. isabelleana* e *H. a. nana* seriam um morfotipo correspondente à uma maior salinidade dentro dos ambientes estuarinos. Por sua vez, *H. a. australis* representa outro morfotipo, de ambientes com menor salinidade, justificando sua forma mais robusta e espessa por existir menos estresse comparada a outras populações.

Resultados similares foram observados por Ueta (1979) que associaram fatores ambientais, como dureza e teor de cálcio dissolvido, com variação da forma, tamanho e espessura da concha de *Lymnaea columella* Say, 1817. As conchas mais espessas e resistentes estavam relacionadas com um valor superior de cálcio dissolvido na água. A partir do estudo, Ueta concluiu que a variação morfológica da concha estaria relacionada principalmente aos fatores abióticos, como por exemplo dureza total da água. McCRAW (1957) já havia reportado o mesmo para *Lymnaea humilis* (Say, 1822). Através da literatura, percebemos que muitas variações conquiliomorfológicas tal como forma, espessura e coloração, se devem mais por fatores externos do ambiente do que por fatores genéticos, sendo comum em gastrópodes límnicos, estuarinos e terrestres. Sumarizando essas informações, Goodfriend (1986) apresentou uma revisão da literatura sobre variação conquiliomorfológica, e verificou que a forma da concha sofre influência de fatores ambientais e que isto pode variar entre as diferentes espécies de gastrópodes terrestres. Quando há variação morfológica, isto pode ocorrer devido a fatores ambientais como a temperatura, a luminosidade e a umidade, fatores estes que são influenciados pela estrutura do habitat. Teshima et al. (2003) descreveram a variação morfológica da concha do gastrópode terrestre *Ainohelix editha* (Adams, 1868), entre os caracóis procedentes de diferentes localidades. Duas populações geograficamente isoladas, Shimamaki e Samani (Japão), possuem a forma extremamente achatada e quilhada, e nas populações localizadas entre estas populações isoladas, os caracóis são globulares ou globulares com espira baixa. Esse resultado corrobora com o nosso estudo, visto que observamos formas extremas e intermediárias do grupo “australis” de acordo com a sua localidade. Para gastrópodes límnicos, Chiu et al (2002) estudaram quatro populações de *Cipangopaludina chinensis* (Gray, 1834) em dois diferentes habitats, na represa e em uma plantação aquática. A análise multivariada dos dados morfométricos da concha e opérculo dos grupos estudados resultaram na separação de dois grupos coincidindo com o tipo de habitat que se diferenciaram nos valores de pH e íons de Cálcio.

Na descrição original de *H. australis*, d’Orbigny (1835) relatou o contorno da concha reto, com suturas suaves, e algumas linhas de crescimento suaves. Já d’Orbigny (1840), ao descrever *H. isabelleana*, afirmou que esta se assemelha a *H. australis*, assim como a *H. charruana*, apresentando diferenças no tamanho da concha. Essas diferenças relatadas por

d'Orbigny (1840) se confirmaram no nosso estudo da morfometria, pois ao compararmos *H. isabelleana* e *H. australis* são estatisticamente diferentes. Acreditamos que essas diferenças na análise conchiliométrica possam estar associadas principalmente a fatores ambientais, onde características como salinidade e disponibilidade de cálcio na água podem afetar a forma e o tamanho da concha dessas populações (AGUIRRE; URRUTIA, 2000; CAZZANIGA, 1982). Neves et al. (2011) observaram a tolerância à salinidade de *H. australis*, em condições laboratoriais, com material proveniente da Baía de Guanabara, e perceberam a tolerância da espécie na faixa de 0 até 80 ppm. Essa população apresenta um tamanho de concha pequeno, possivelmente se enquadrando em *H. a. nana*, considerando o resultado aqui apresentado. Aguirre e Farinati (2000) afirmaram que populações de *H. a. nana* são polihalinas, ou seja, toleram salinidade de 18 a 30 ppm.

Marcus e Marcus (1963b) afirmaram que o tamanho da concha associado à morfologia do pênis, distinguem *H. a. nana* de *H. a. australis*. A primeira apresenta uma concha menor e pênis com até quatro “verrugas”, enquanto a segunda possui comprimento bem maior “muito alta” e pode possuir até sete “verrugas penianas”. Porém, não observamos essas diferenças nos aspectos morfológicos do pênis nas populações avaliadas de *H. a. australis* e *H. a. nana*. Nosso estudo corrobora a semelhança relatada por Gaillard e Castellano (1976) na anatomia peniana, rádula e forma da concha, onde foi observado uma variação na quantidade de glândulas apócrinas do lado convexo do pênis, entre uma e três, sendo esta uma variação intrapopulacional, como também observado pelas autoras, além de Marcus e Marcus (1963a). Ressalta-se que a papila maior e pigmentada do lado côncavo do pênis, foi observada em todos os indivíduos analisados, e também pode ser considerada uma característica diagnóstica do grupo “*australis*”. Isso já havia sido evidenciado em *H. a. nana* por Marcus e Marcus (1963a), para *H. australis* por Gaillard (1976) e Silva (2003) e para *H. a. crassa* por Gaillard (1976). Não há relatos na literatura para *H. isabelleana*.

Comparativamente, a rádula das populações estudadas apresentou poucas diferenças a respeito da forma e quantidade de cúspides do dente central, lateral e marginal interno e externo. Marcus e Marcus (1963a) apresentaram a rádula de *H. a. nana* e Silva (2003) a rádula de *H. australis*. Os nossos resultados corroboraram os desses autores prévios. No entanto, Gaillard e Castellanos (1976) apresentou esquemas da rádula de *H. australis*, apresentando a cúspide mediana do dente raquidiano com forma de pentágono, divergindo do observado aqui, sendo a forma triangular mais representativa e observada neste estudo, corroborando com Marcus e Marcus (1963a) e Silva (2003).

A rádula da população de Laguna de Rocha apresentou diferenças sutis no dente raquidiano, quando comparada às demais populações, como as cúspides mais próximas entre si, de base mais larga, e cúspides acessórias maiores comparadas a cúspide mediana, em relação às demais populações. A população de Marapendi e Rio de La Plata se mostraram semelhantes entre si na forma do dente raquidiano, com a cúspide mediana bem mais afiada e de maior comprimento que as demais. Contudo, a população Rio de La Plata se destacou pela presença de dois pares de denticulos basais em uma das fileiras do dente raquidiano. Esse resultado corrobora com Silva (2003), cujo 90% das rádulas examinadas possuíam apenas um par de denticulo basal, enquanto ocasionalmente foram observados dois pares, com comprimento maior para a cúspide mais interna, como na Figura 4 (E, F). Quanto ao dente lateral, as populações da Laguna Rocha e Lagoa de Marapendi se mostraram semelhantes, enquanto que Rio de La Plata apresentou diferenças, pois os exemplares de Marapendi apresentam dentes mais curtos, com a cúspide mediana 1/3 maior que as demais, enquanto que o dente lateral dos indivíduos do Rio de La Plata, apresenta cúspides longas e pontiagudas. Essas descrições se enquadram no que foi descrito por outros autores para *H. australis*.

Através da matriz de distância genética, a população de Lagamar, morfotipo *H. a. nana*, apresentou a maior variação intrapopulacional (2%) comparada às demais populações. Essa alta variação também foi observada comparando a população de Lagamar com as outras populações do grupo “australis”. Por exemplo, *H. australis* do Genbank dista de 0,8 a 2,2% de Lagamar. Enquanto que a maior variação foi observada na população da Praia da Bandeira, Rio de Janeiro, morfotipo *H. a. nana*, chegando até 2,7%. Szarowska et al. (2014) realizaram um trabalho com o mesmo marcador molecular, com oito amostras de *Heleobia* spp. oriundas da Europa. Encontraram uma divergência genética de 0,8% entre as espécies *H. dalmatica* Radoman, 1973, *H. scamandri* (Boeters, Monod e Vala, 1977), *H. foxianensis* (De Stefani, 1883) e *H. maltzani* (Westerlund, 1886), propondo a sinonímia destas espécies com *H. stagnorum* (Gmelin, 1791). A análise morfológica da concha revelou variações não suportadas pelos dados genéticos, como no presente trabalho.

A população de Laguna de Rocha (*H. australis*) comparada com a população da Baía de Guanabara (*H. a. nana*) apresentou uma variação de 0,8 a 1,5% na distância genética, evidenciando uma grande semelhança entre as populações. Devido à similaridade nas características morfológicas (pênis, rádula e forma da concha) e moleculares propomos que ambas as formas, *H. australis* e *H. a. nana*, representem uma única entidade biológica, ou seja, a mesma espécie.

A população de *H. australis*, disponibilizada no GenBank, procedente de Mar Chiquita, Argentina, quando comparada com as populações do morfotipo de *H. isabelleana* (Praia Penino, Trouville e Carrasco) e *H. a. nana* (Baía de Guanabara, Marapendi), apresentam uma distância que variou de 0,3% a 1,5%. Novamente, os dados moleculares corroboram com os dados morfológicos, que já apontaram semelhanças entre estas populações. Essa distância diminui quando visualizamos a variação intrapopulacional de *H. isabelleana* com um máximo de 1%, corroborado pela morfometria, que demonstrou o menor desvio padrão (Tabela 3). Comparando as populações de *H. australis* de Laguna de Rocha e Lagamar com a espécie-tipo do gênero, *H. culminea*, encontramos distância mínima de 4,5% e máxima de 5,4%. Quando a espécie tipo é comparada com indivíduos da população de Carrasco (*H. isabelleana*), encontramos uma variação entre 4,3% e 5,4%. Essa distância é semelhante a distância genética de *H. australis* (disponível no GenBank) comparada com as populações de *Heleobops* spp., que dista aproximadamente 5,4%. Outros autores já haviam notado essa proximidade de *H. australis* com *Heleobops* spp. (KOCH et al., 2015, KROLL et al., 2012).

Koch et al. (2015) utilizaram o mesmo marcador molecular, e observaram *H. australis* mais próxima do clado de *Heleobops*, do que o clado de *Heleobia*, porém, o trabalho não apresentou os dados de distância genética. Os autores discutiram esse posicionamento, e mantiveram *H. australis* como uma espécie pertencente a *Heleobia* devido às características da concha e da anatomia do pênis, que diferem das demais espécies incluídas no referido clado. Se compararmos as populações de *H. culminea* com as populações de *Heleobops* spp. percebemos uma distância maior ainda, variando entre 6,5% e 7,6%, reforçando a separação do clado de *Heleobia* com seu grupo irmão *Heleobops*. Estudos com outros marcadores moleculares são necessários para melhor esclarecimento das relações de parentesco entre estes táxons.

Collado et al. (2013) investigaram a morfologia peniana e a distância genética através do marcador mitocondrial 16S de 12 populações de *Heleobia*. As espécies chilenas apresentaram divergência interespecífica de no mínimo de 1,3%. Essa pequena distância entre as espécies pode ser justificada pela escolha de um marcador molecular de evolução mais lenta, não retratando as mudanças mais sutis. Além disso, na região conhecida como Altiplano Chileno, encontra-se um grande número de espécies muito semelhantes entre si em diferentes processos de especiação (COLLADO et al., 2019).

A população de Marapendi, *H. a. nana*, apresentou a maior variação genética quando comparada com as demais, isso corrobora com o resultado da morfometria, em que esta apresentou a menor taxa de acerto na análise discriminante, evidenciando indivíduos não

totalmente agrupados, mas com distribuição ampla e sobreposta a outras populações, conforme apresentado no gráfico (Figura 2). Resultado que pode representar uma maior variabilidade genética intrapopulacional, refletindo uma plasticidade fenotípica.

*Heleobia australis*, juntamente com *H. charruana*, são as únicas do gênero a reterem uma larva planctônica livre-natante, o que poderia também indicar uma diferenciação destas espécies em relação às demais do gênero. Neves et al. (2010) afirmaram que a ampla distribuição da espécie seja decorrente do modo reprodutivo, com uma larva véliger planctônica que facilmente se dispersa à longas distâncias.

A partir do exposto, os táxons aqui estudados trata-se de sinônimos de *H. australis*. Propomos a seguinte lista sinonímica:

### ***Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835)**

Binômio original: *Paludina australis* d'Orbigny, 1835: 30. Localidade tipo: Montevideo, Uruguai. Lectótipo: BMNH 1854.12.4.342/1. Paralectótipos: BMNH 1854.12.4342/2-11.

Lista sinonímica:

*Paludina australis* d'Orbigny, 1835: 30

*Palustrina australis*: d'Orbigny, 1840 [in 1834-1846]: 384.

*Hydrobia australis*: Martens, 1868: 202-203.

*Littoridina australis*: Pilsbry, 1896: 79. Pilsbry, 1911: 557; Kleerekoper, 1944: 158, 160; 1949: 23; Kleerekoper, 1955: 562-56; Buckup e Buckup, 1957:22; Forti, 1969:103-105; Closs e Forti, 1971:36; Gaillard e Castellanos, 1976: 9-10; Capitoli, et al. 1978: 10,11,14; Bemvenuti et al., 1978: 23, 27, 30; Rios, 1975: 37; Rios, 1985: 39; Aguirre e Farinati, 2000: 569-594.

*Littorinida australis*: Corsi, 1901:39.

*Littoridina australis nana* Marcus e Marcus, 1963: 33-54. Localidade-tipo: Litoral sul do Estado de São Paulo, Brasil. Holótipo: MZUSP (Ao solicitar aos curadores a fotografia do holótipo, informaram que o holótipo e parátipos ainda não tinham sido localizados). Parátipos: ANSP 305214; Gaillard, 1974: 143; Chomenko e Schäfer, 1984: 161-173; Lana, 1986: 84; Aguirre e Farinati, 2000: 569; Aguirre e Urrutia, 2002: 1-20.

*Palustrina isabelleana* d'Orbigny, 1840 [in 1834-1846]: 385. Localidade-tipo: Arroio nas proximidades da baía de Montividéu, entre água salgada e água doce, Uruguai. Síntipos:

BMNH 1854.12.4.344 [a série tipo, registrada no BMNH, foi rejeitada por Silva e Davis, 1983 por não corresponder à descrição e ilustração do autor original].

*Littorinida isabellei*: Corsi, 1901: 40

*Littoridina isabelleana* Gaillard e Castellanos, 1976:11; Aguirre e Farinati, 2000: 569. Aguirre e Urrutia, 2002: 1.

*Heleobia nana*: Simone, 2006:91

*Heleobia australis nana*: Davis et al., 1982: 169-175; Hershler e Thompson, 1992: 50.

*Heleobia australis australis*: Hershler e Thompson, 1992: 50; Thiengo et al., 2002:44.

*Heleobia isabelleana*: Hershler e Thompson, 1992: 50;

*Heleobia australis*: Davis et al., 1982: 169-175; Silva e Davis, 1983: 132, 137-139; Bemvenuti e Netto, 1992: 11, 13, 14, 16, 17; Bemvenuti et al., 1998: 211- 213; Simone, 2006: 89; Rios, 1994: 50, Fig. 169; Rios, 2009: 81; Figueredo-Barros et al., 2006; Neves et al., 2010: 247-249; 2011: 19-23; 2013: 577-589.

## CONCLUSÕES

A partir do estudo de populações de *H. australis australis*, *H. australis nana* e *H. isabelleana*, utilizando dados morfológicos e moleculares, concluímos que se trata da mesma espécie, ou seja, são sinônimos com *H. australis*, nome que deve ser utilizado de acordo com o Princípio de Prioridade (ICZN, 1999).

As populações estudadas se mostraram semelhantes nos aspectos anatômicos e moleculares, divergindo nos caracteres conchiliomorfológicos, que podem estar associadas a heterogeneidade dos ambientes estudados.

Observando as distâncias genéticas das populações, percebemos que a maior distância intraespecífica é equivalente a distância entre as amostras estudadas.

A espécie pode ser classificada como mixohalina, habitando águas com flutuação de salinidade até 30%.

Trabalhos futuros com *H. australis crassa* são necessários para compreensão dos aspectos morfológicos e moleculares de todo o grupo “australis”.

## Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a CAPES (Coordenação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado de ICBG; à Profª. Dra.

Lena Geise pelo cessão de uso da microscópio estereoscópico com câmera; ao técnico Cristian Suarez pelas imagens de microscopia, obtidas na Universidade de Bío Bio de Chillán, Chile; ao Sisbio pelas licenças de coletas (49368-1) para ICBG e (10812-1) para SBS.

## REFERÊNCIAS

AGUIRRE, M.L.; FARINATI, E.A. Aspectos sistemáticos, de distribución y paleoambientales de *Littoridina australis* (d'Orbigny, 1835) (Mesogastropoda) en el Cuaternario marino de Argentina (Sudamerica). *Geobios*, 33, 5: 569-597, 2000.

AGUIRRE, M.L.; URRUTIA, M.I. Morphological variability of *Littoridina australis* (d'Orbigny, 1835) (Hydrobiidae) in the Bonaerensian marine Holocene (Argentina). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 183 (1): 1-23, 2002.

BEMVENUTI, C.E.; CAPITOLI, R.R.; GIANUCA, N.M. Estudos de ecologia bentônica na região estuarial da Lagoa dos Patos. II-Distribuição quantitativa do macrobentos infralitoral. *Atlântica* (3): 23-32, 1978.

BEMVENUTI, C.E.; CATTANEO; NETTO, S.A. Características estruturais da macrofauna bentônica em dois pontos da região estuarial da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. *Atlântica* (14): 5-28, 1992.

BEMVENUTI, C.E.; NETTO, S.A. Distribution and seasonal patterns of the sublittoral benthic macrofauna of Patos Lagoon (South Brazil). *Revista Brasileira de Biologia* 58(2): 211-221, 1998.

BUCKUP, L.; BUCKUP, E.H. Catálogo dos moluscos do Museu Rio-Grandense de Ciências Naturais. *Iheringia*, série Zoologia, Porto Alegre, 1: 1-40, 1957.

CAPITOLI, R.R.; BEMVENUTI, C.E.; GIANUCA, N.M. Estudos de ecologia bentônica na região estuarial da Lagoa dos Patos. I - As comunidades bentônicas. *Atlântica*, Rio Grande, (3):5-22, 1978.

CAZZANIGA, N. J. Notas sobre hidróbidos argentinos. 5. Conquiliometria de *Littoridina parchappii* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Rissoidea) referida a su ciclo de vida en poblaciones australes. *Iheringia*, Série Zoologia, 61: 97-118, 1982.

\_\_\_\_\_, N.J. *Heleobia* Stimson 1865: Taxonomia. In: CAZZANIGA NJ., editor. El género *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) en América del Sur. *Amici Molluscarum*, Número especial: 12- 18, 2011.

CHIU, Y.W.; CHEN, H.C.; LEE, S.C.; CHEN, C.A. Morphometric analysis of shell and operculum variations in the viviparid snail, *Cipangopaludina chinensis* (Mollusca: Gastropoda), in Taiwan. *Zoological Studies*, 41.3: 321-331, 2002.

CHOMENKO, L.; SCHÄFER, A. Interpretação biogeográfica da distribuição do gênero *Littoridina* (Hydrobiidae) nas lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. *Amazoniana*, 9(1): 127-146, 1984.

CLOSS, D.; FORTI, R. Quaternary mollusks from the Santa Vitória do Palmar county. *Iheringia*, Geologia, Porto Alegre, (4): 19-58, 1971.

COLLADO, G.A.; VALLADARES, M.A.; MÉNDEZ, M.A. Hidden diversity in spring snails from the Andean Altiplano, the second highest plateau on Earth, and the Atacama Desert, the driest place in the world. *Zoological Studies* 52:1-13, 2013.

COLLADO, G.A.; VIDAL, M.A.; AGUAYO, K.P.; MÉNDEZ, M.A.; VALLADARES, M.A.; CABRERA, F.J.; PUILLANDRE, N. Morphological and molecular analysis of cryptic native and invasive freshwater snails in Chile. *Scientific reports*, 9(1), 7846, 2019.

CORSI, A.F. *Moluscos de la Republica Oriental del Uruguay*. Anales del Museo Nacional de Montevideo, Montevideo (2): 237pp., 1901.

DE FRANCESCO, C.G.; ISLA, F.I. Reproductive period and growth rate of the fresh-water snail *Heleobia parchappii* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda: Rissoidae) in a shallow brackish habitat (Buenos Aires Province, Argentina). *Malacologia* 45:443-450, 2004.

DAVIS, G.M.; MAZURKIEWICZ, M.; MANDRACCHIA, M. *Spurwinkia*: Morphology, systematics, and ecology of a new genus of North American marshland Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 134: 143–177, 1982.

DIVER, C. A method to determining the number of whorls of a shell and its application to *Cepaea hortensis* Müll. *Proceedings of the Malacological Society of London* 19: 234-239, 1931.

FIGUEIREDO-BARROS, M.P.; LEAL, J.J.; ESTEVES, F.D.A.; ROCHA, A.D.M.; BOZELLI, R.L. Life cycle, secondary production and nutrient stock in *Heleobia australis* (d'Orbigny 1835)(Gastropoda: Hydrobiidae) in a tropical coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 69(1-2), 87-95, 2006.

FOLMER, O.; BACK, 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.

FORTI, I. R. S. Cenozoic Mollusks from the drill-holes Cassino and Palmares do Sul of the Coastal Plain of Rio Grande do Sul. *Iheringia: série Geologia*, Porto Alegre, (2): 55-155, 1969.

GAILLARD, M.C. Sobre nuevas *Littoridina* de la Republica Argentina (Moll. Hydrobiidae). *Neotropica* 20 (63): 140-143, 1974.

GAILLARD, C, de CASTELLANOS, Z.A. de. Mollusca, Gasteropoda, Hydrobiidae. In: Ringuelet, RA editor. *Fauna de agua dulce de la República Argentina*. Buenos Aires: Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC). 15(2): 1–39, 1976.

- GOODFRIEND, G.A. Variation in land-snail shell form and size and its causes: a review. *Systematic Biology*, v. 35, n. 2, p. 204-223, 1986.
- GOULDING, T.C.; DAYRAT, B. Integrative taxonomy: Ten years of practice and looking into the future. In *Аспекты биоразнообразия* Vol. 54: 116-133, 2016
- HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society. Série B: Biological Sciences* 270:313-321, 2003.
- HERSHLER, R.; THOMPSON, F.G. A review of the aquatic gastropod subfamily Cochliopinae (Prosobranchia:Hydrobiidae). *Malacological Review*, Ann Arbor (5): 1-140, Supplement, 1992.
- HERSHLER, R.; PONDER, W. A review of morphological characters of hydrobioid snails. *Smithsonian Contributions to Zoology*, Washington, 600: 1-55, 1998.
- HERSHLER, R.; LIU, H.P.; MULVEY, M. Phylogenetic relationships within the aquatic snail genus *Tryonia*: implications for biogeography of the North American Southwest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (2):377–391, 1999.
- HERSHLER, R.; LANDYE, J.J. Arizona Hydrobiidae (Prosobranchia: Rissoacea). *Smithsonian Contributions to Zoology*, Washington, 459:1-63, 1988.
- ICZN - International Commission on Zoological Nomenclature, 1999.
- IHERING, H. VON. Die Gattung Paludestrina. *Nachrichtenblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft*, Frankfurt, 27(7-8): 122- 128, 1895.
- KLEEREKOPER, H. *Introdução ao estudo da limnologia* I. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. 329 p. 1944.
- KLEEREKOPER, H. Limnological observations in northeastern Rio Grande do Sul, Brazil I. *Archiv fur Hydrobiologie*, Stuttgart, 50(3/4): 553-567, 1955.
- KOCH, E.; MARTIN, S.M.; CIOCCO, N.F. A molecular contribution to the controversial taxonomical status of some freshwater snails (Caenogastropoda: Rissooidea, Cochliopidae) from the Central Andes desert to Patagonia. *Iheringia*, Série Zoologia, 105 (1): 69–75, 2015.
- KROLL, O.; HERSHLER, R.; ALBRECHT, C.; TERRAZAS, E.; APAZA, R.; FUENTEALBA, C., WOLFF1, C.; WILKE, T. The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: Correlation between molecular evolution and hydrographic history. *Ecology and Evolution*, 2 (7): 1517–1530, 2012.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874, 2016.
- LANA, P. C. Macrofauna bêntica de fundos sublitorais não consolidados da Baía de Paranaguá (Paraná). *Nerítica*, 1(3): 79-89, 1986.

MARCUS, E.; MARCUS, E. Mesogastropoden von der Küst São Paulos. Abhandlungen. Mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse. *Akademie der Wissenschaften und der Literature*, (1), 105 p., 1963a.

MARCUS, E.; MARCUS, E. On Brazilian supralittoral and brackish water snails. *Boletim do Instituto Oceanográfico*, São Paulo. 13: 41-52, 1963b.

MARTENS, E. VON. Ueber südbrasilische Land-und Süsswasser-Mollusken. *Malakozoologische Blätter*, Cassel, **15**: 169-217, 1868.

McCRAW, B.M. Studies on the anatomy of *Lymnaea humilis* Say. *Canadian Journal of Zoology*, 35(6), 751-768, 1957.

MERLO, M.J.; ETCHEGOIN, J.A. Testing temporal stability of the larval digenean community in *Heleobia conexa* (Mollusca: Cochliopidae) and its possible use as an indicator of environmental fluctuations. *Parasitology*, 138: 249–256, 2011.

NEVES, R.A.F.; VALENTIN, J.L.; FIGUEIREDO, G.M. Morphological description of the gastropod *Heleobia australis* (Hydrobiidae) from egg to hatching. *Brazilian Journal of Oceanography*, 58 (3): 247–250, 2010.

NEVES, R. A.F.; ECHEVERRÍA, C.A.; PESSOA, L.A. Resposta da espécie *Heleobia australis* (Gastropoda: Hydrobiidae) a variações de salinidade e exposição a hidrocarbonetos. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 24(2), 2011.

NEVES, R. A.F.; ECHEVERRIA, C.A.; PESSOA, L.A.; PAIVA, P.C.; PARANHOS, R.; VALENTIN, J. L. Factors influencing spatial patterns of molluscs in a eutrophic tropical bay. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 93(3), 577-589, 2013.

d'ORBIGNY, A. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, in suo per Americam Meridionalem itinere. *Magasin de Zoologie Paris*. 5 (61/62): 1-44, 1835.

d'ORBIGNY, A. In: d'Orbigny A. 1834–1847. Voyage dans l'Amérique Méridionale execute pendant les années 1826-1933. 3<sup>a</sup> Partie: *Mollusques*. P. Bertrand, Paris. XLIX+758p., 1840.

PAST - PAleontological STatistics. Version 3.25.

PILSBRY, H. A. Notes on new species of Amnicolidae collected by Dr. Rush in Uruguay. *Nautilus*, Delaware, 10 (8): 86-89, 1896.

PILSBRY, H.A. *Non-marine Mollusca of Patagonia. Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia*, 1896-1899, Stuttgart, 3 (5): 513-633, 1911.

RIOS, E.C. *Brazilian Marine Mollusks Iconography*. Museu Oceanográfico da FURG, Rio Grande, 331 pp., 91pls., 1975.

RIOS E.C. *Seashells of Brazil*. ed, Museu Oceanográfico Prof. E.C. Rios da Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande, 328 pp. 102 pls., 1985.

RIOS E.C. *Seashells of Brazil*. 2nd ed, Museu Oceanográfico Prof. E.C. Rios da Fundação Universidade de Rio Grande, Rio Grande, 368 pp., 113 pls., 1994.

RIOS, E.C. *Compendium of Brazilian Seashells*. Evangraf, Rio Grande, 2009.

RUMI, A.; GREGORIC, G.D.E.; NÚÑEZ, V.; DARRIGRAN, G.A. Malacología latinoamericana. Moluscos de agua dulce de Argentina. *Revista de Biología Tropical* 56:77-111, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SILVA, M.C.P. da. Hydrobiidae (Gastropoda: Neotaenioglossa: Risssooidea) da planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Tese de Doutorado*, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 382 pp, 2003.

SILVA, M.C.P. da; DAVIS, G.M. d'Orbigny's type specimens of *Paludestrina* (Gastropoda: Prosobranchia) from southern South America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 135: 128-146, 1983.

SILVA, M.C.P. da; THOMÉ, J.W. Uma nova espécie *Heleobia* (Prosobranchia: Hydrobiidae) do "Rio" Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biologia* 45 (4): 515-534, 1985.

SILVA, M.C.P. da, VEITENHEIMER-MENDES, I.L. Nova espécie de *Heleobia* (Risssooidea, Hydrobiidae) da planície costeira do sul do Brasil. *Iheringia- Série Zoologia* 94 (1): 89-94, 2004.

SIMONE, L.R.L. D. *Land e freshwater molluscs of Brazil*. An illustrated inventory on the Brazilian Malacofauna, including neighbor regions of the South America, respect to the terrestrial and freshwater ecosystem. EGB, Fapesp, São Paulo. 390pp. 2006.

SOLEM, A. Malacological applications of scanning electron microscopy. II. Radular structure and functioning. *Veliger*, 14(4), 327-336, 1972.

SOULEYET, M. Genre *Littoridina*. In: Souleyet M., Eydoux. Voyage autour du Monde executé pendant les anes 1836 et 1837 sur la corvette La Bonite commandée par M. Vaillant. *Zoologie* 2:563-565, estampa 31 e 32, 1852. [Nota: as estampas foram publicadas em 1841]

SZAROWSKA, M.; HOFMAN, S.; OSIKOWSKI, A.; FALNIOWSKI, A. *Heleobia maltzani* (Westerlund, 1886) (Caenogastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) from Crete and species-level diversity of *Heleobia* Stimpson, 1865 in Europe. *Journal of Natural History* 48.41-42: 2487-2500, 2014.

TESHIMA, H.; DA VISON, A.; KUWAHARA, Y.; YOKOHAMA, J.; CHIBA, S.; FUKUDA, T.; OGIMURA, H. & KAWATA, M. The evolution of extreme shell shape variation in the land snail *Ainohelix editha*: a phylogeny and hybrid zone analysis. *Molecular Ecology* 12: 1869-1878, 2003.

THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; MAGALHÃES, M. G.; SANTOS, S.B. Freshwater snails and schistosomiasis mansonii in the state of Rio de Janeiro, Brazil: III-Baixas Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 43-46, 2002.

UETA, MT. Estudo morfométrico da concha de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Vol. XIII – nº1 a 6: 119-141, 1979.

VALLADARES, M.A., MÉNDEZ, M.A., & COLLADO, G.A. Influenced but not determined by historical events: genetic, demographic and morphological differentiation in *Heleobia ascotanensis* from the Chilean Altiplano. *PeerJ*, 6, e5802, 2018.

VEITENHEIMER-MENDES, I.L.; LOPES-PITONI, V.L. Moluscos aquáticos atuais de ecossistemas costeiros em Imbituba, Imaruí e Laguna, Santa Catarina, Brasil: parâmetro de caracterização para paleoambientes. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, v. 12, n. 2, p. 429-434, 1995.

WILKE, T.; DAVIS, G.M.; FALNIOWSKI, A.; GIUSTI, F.; BODON, M.; SZAROWSKA, M. Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 151(1), 1-21, 2001.

WINNEPENNINCKX, B.; BACKELJAU, T.; De WACHTER, R. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9(12):407, 1993.

### 4.3 Categoria 3: Revisão taxonômica entre *Heleobia davisii* Silva e Thomé, 1985 e *Heleobia robusta* Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004 (Truncatelloidea: Cochliopidae) com base em dados morfológicos e moleculares

#### Resumo:

*Heleobia* é um gênero de gastrópodes límnicos e estuarinos com distribuição predominante na América do Sul. No Brasil, seis espécies estão descritas, incluindo *H. davisii* e *H. robusta*. Ambas as espécies são próximas em aspectos morfológicos da rádula, concha e anatomia do pênis. O presente estudo buscou investigar, usando dados morfológicos e moleculares, o status taxonômico destas duas espécies, tendo em vista a similaridade entre as mesmas. Quatro populações foram estudadas, sendo duas topótipos: *H. davisii* (Lago Guaíba, RS) e *H. robusta* (Lagoa de Itapeva, RS), além de duas localidades onde há seus registros (*H. davisii* da Lagoa de Iriry, RJ e *H. robusta* de Arroyo San Miguel, Rocha, Uruguai). Foram utilizados parátipos de *H. davisii* e *H. robusta* para fins comparativos. O DNA genômico foi extraído e a região Citocromo Oxidase I (COI) foi amplificada e sequenciada. As sequências obtidas foram editadas, alinhadas, e a distância genética foi calculada com o teste Neighbor-Joining, usando o programa MEGA 7. Para construção da árvore filogenética, comparamos as sequências obtidas com outras do gênero disponíveis no GenBank, e como grupo externo, utilizamos *Pomatiopsis lapidaria*. A morfologia das espécies confirma o descrito na literatura, demonstrando a semelhança entre ambas: concha cônica alongada, espira baixa, última volta globosa e lábio interno espessado; anatomia peniana portando de 9 a 13 glândulas apócrinas em seu lado convexo, e uma glândula destacada no lado côncavo; a rádula das populações estudadas não evidenciou muitas diferenças, variando na quantidade de cúspides de cada dente. A análise molecular apresentou um clado reunindo todas as sequências estudadas com *H. piscium*, proveniente de uma amostra da Argentina. Observamos uma baixa divergência entre as espécies do estudo, com o valor máximo de 2,4% entre *H. robusta* do Uruguai e *H. davisii* do Rio de Janeiro. A menor diferença (0,02%) foi entre *H. robusta* do Uruguai e *H. piscium* do GenBank, esta última procedente de Rio de La Plata, Ilha Martín Garcia, Argentina, próximo a sua localidade tipo. A maior divergência intraespecífica foi igual a 2%, encontrada entre os topótipos de *H. davisii*. A distância genética entre as três espécies variou entre 0,000 e 2,4%. A divergência com a espécie-tipo do gênero, *H. culminea*, foi igual a 13,5%, valor semelhante ao comparado com *Onobops jacksoni*, outro gênero da mesma família. A partir dos resultados confirmamos a afinidade genética e morfológica entre as duas espécies nominais aqui investigadas. O estudo dessas amostras nos revela que as espécies possam ser sinônimas, necessitando de maior esforço de coleta dos topótipos de *H. piscium* a fim de comparações morfológicas, visto que por meio da análise molecular se mostraram próximas. Estudos com outros marcadores moleculares e detalhamento das partes moles são necessários para aprofundar o conhecimento das relações entre estas espécies, e entre o gênero *Heleobia* visto que ficaram alocadas em outro clado na análise molecular.

**Palavras-chave:** Taxonomia; Morfologia; Molecular; Sinonímia.

## INTRODUÇÃO

*Heleobia* Stimpson, 1865 é um gênero de gastrópodes aquáticos epibentônicos, encontrados em águas doces e salobras. O gênero apresenta 104 espécies distribuídas principalmente na América do Sul, mas com representantes na África, Ásia e Europa. Para o Brasil, são reportadas sete espécies: *Heleobia peteningensis* (Gould, 1852); *H. inconspicua* (Haas, 1938); *H. pusilla* (Haas, 1949); *H. miaulis* (Marcus & Marcus, 1965); *H. davisii* Silva e Thomé, 1985; *H. robusta* Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004 e *Heleobia* sp. nov. (Capítulo 1). Entre estas, *H. davisii* e *H. robusta* apresentam similaridade morfológica, tanto em aspectos conquiliológicos, como anatômicos (SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004).

*Heleobia davisii*, descrita a partir de material do Lago Guaíba, Vila Elsa, RS, ocorre em água doce, e sua descrição original engloba, além da morfologia da concha, dados anatômicos do sistema reprodutor masculino e feminino, sistema nervoso, sistema digestório e rádula (SILVA; THOMÉ, 1985). Atualmente é a descrição morfológica mais completa de um representante de *Heleobia*. Levantamentos faunísticos reportaram sua presença também em Santa Catarina (VEITENHEIMER-MENDES; LOPES-PITONI, 1995; AGUDO-PADRÓN, 2018) e no Rio de Janeiro (THIENGO et al., 1998; 2001; 2002).

*Heleobia robusta* também ocorre em ambiente de água doce e foi descrita a partir do material originário da Lagoa Rondinha, Balneário Pinhal, Rio Grande do Sul, sendo esta a localidade-tipo do holótipo. Entretanto, na descrição original a autora aponta diversos locais em lagoas próximas como parátipos (SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004). A descrição apresentou detalhes do sistema reprodutor masculino e feminino, além da rádula e concha (SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004). Clavijo et al. (2011) registraram pela primeira vez a ocorrência de *H. robusta* no Uruguai, também para ambientes límnicos.

Silva e Veitenheimer-Mendes (2004) na descrição de *H. robusta*, salientaram a sua semelhança com *H. davisii*, mas não mencionaram as características similares entre as espécies. Por outro lado, apontaram características que as diferenciavam na concha e anatomia das partes moles, relatando que em *H. robusta* a concha apresenta lábio externo fino, rádula com um número maior de fileiras de dentes e espermiducto dilatado.

Apesar de similares, essas espécies sempre foram tratadas como espécies válidas distintas em trabalhos subsequentes (VEITENHEIMER-MENDES; LOPES-PITONI, 1995; THIENGO et al., 1998; 2001; 2002, SIMONE 2006; CLAVIJO et al., 2011; AGUDO-PADRÓN, 2018). Nenhum trabalho até o momento buscou investigar essas espécies de forma comparativa, visando analisar aspectos morfológicos e moleculares.

Dessa forma, o presente trabalho tem por objetivo realizar um estudo comparativo das duas espécies, utilizando dados morfológicos e moleculares, com base em quatro populações de *H. davisii* e *H. robusta*, incluindo topótipos, a fim de contribuir para a sistemática e taxonomia do gênero.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os indivíduos foram coletados em quatro localidades que incluíam a localidade-tipo e outros locais de ocorrência para estudos comparativos do ponto de vista morfológico e molecular: 1- Localidade-tipo de *H. davisii*, Lagoa Guaíba, Guaíba, Rio Grande do Sul (-30.148293, -51.320556), 2- localidade-tipo de *H. robusta*, Lagoa de Itapeva, Arroio do Sal, Rio Grande do Sul (-29.515833, -49.914000), 3- *H. robusta*, Arroyo San Miguel, Rocha, Uruguai (-33.689101, -53.530994), já reportado por Clavijo et al. (2011), e 4- *H. davisii* da Lagoa de Iriry, Rio de Janeiro, Brasil (-22.50826, -41.91282) registrado por Thiengo et al. (1998). O material foi coletado com auxílio de uma peneira plástica de malha 1 mm, e transportados ao laboratório, para quantificação e separação por sexo com auxílio de um microscópio estereoscópio Nikon SMZ800-C-DS. Os animais foram anestesiados após imersão em água com cristais de mentol por oito horas, e fixados em álcool 70° (análise morfológica – conchas e parte mole) e álcool 96° (análise molecular). Todo o material encontra-se depositado na Coleção Científica de Moluscos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e são provenientes da: a) Lagoa de Itapeva (UERJ 10.534), localidade-tipo de um dos parátipos de *H. robusta*; b) Lagoa Guaíba (UERJ 11.554); c) Arroyo San Miguel, Rocha (UERJ 11.436) e d) Lagoa do Iriry (UERJ 11.276).

Além dos exemplares coletados, examinamos um dos parátipos de *H. robusta*, procedente da Lagoa Nicola, RS, obtido por empréstimo da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB 9.845). Solicitamos a fotografia do parátipo de *H. davisii* para Academy of Natural Sciences of Drexel University (ANSP A9512).

Para caracterização do ambiente, aferimos a salinidade do ambiente por meio de um refratômetro analógico.

A análise morfológica se concentrou principalmente na concha, rádula e na anatomia do pênis, considerado diagnóstico por muitos autores (GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; HERSHLER E PONDER, 1992; 1998; SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004; COLLADO *et al.*, 2011, 2016). Para representar um padrão na população, utilizamos três espécimes para análise morfológica, e cinco exemplares para extração do DNA.

Para a conchiliomorfolgia, fotografamos e medimos as conchas em um microscópio estereoscópico (Nikon SMZ800- C-DS) com câmara acoplada. Obtivemos as seguintes medidas lineares: Comprimento (C), largura (L), comprimento da volta corporal (CVC), comprimento da espira (CE), largura da abertura (LA) e comprimento da abertura (CA) conforme proposto por Silva e Thomé (1985) e Silva e Veitenheimer-Mendes (2004) para uma análise descritiva das populações estudadas e realizamos um teste não paramétrico (PERMANOVA) a fim de observar a presença de dimorfismo sexual através da morfometria da concha.

O pênis foi fotografado com auxílio de uma câmera acoplada em microscópio estereoscópico (Nikon SMZ800- C-DS). A rádula foi obtida pela microspia de varredura após seu processamento (imersão do bulbo bucal em solução comercial solução de hipoclorito de sódio diluído (1:1), seguida pela lavagem em água destilada e metalizada em carbono).

A extração do DNA ocorreu por meio de duas metodologias: as amostras do Uruguai através do método CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), e as amostras do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul pelo método de Fenol Clorofórmio, adaptados de Winnepennickx et al. (1993) e Sambrook et al. (1989), respectivamente. Utilizando um marcador mitocondrial, citocromo oxidase I (COI), amplificamos o DNA com os primers LCO1490 e HC02198 (FOLMER et al., 1994). O material proveniente do Uruguai foi sequenciado pela empresa Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul), e o do Brasil pelo sequenciador automatizado ABI 3500 (Applied Biosystems, Inc.) no Laboratório de Diagnóstico por DNA da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. A edição e alinhamento das sequências, assim como a construção da árvore e da matriz de distância genética foram realizadas no programa MEGA7 (versão 7.1.3.0) com o modelo Kimura 2 parâmetros (K2P) e *bootstrap* igual a 10000 (KUMAR et al., 2016). A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining para calcular as distâncias genéticas. Para comparação com nosso material foram elencadas na análise outras espécies de *Heleobia* da América do Sul e Europa, além de outros cocliopídeos como *Heleobops docimus*, *Tryonia imitator* e *Onobops jacksoni*. Como grupo extero, utilizamos *P. lapidaria*, um representante da família Pomatiopsidae. Todo o material encontra-se listado na Tabela 1.

Tabela 1 - Espécies, Localidade, código de acesso no GenBank e a referência da literatura dos espécimes utilizados na análise molecular.

Espécies	N	Localidade	Acesso ao GenBank	Referência
<i>H. robusta</i> Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004 - topótipo (RS)	2	Lagoa de Itapeva, Torres, RS, Brasil	Em processo	Presente trabalho
<i>H. davisii</i> – topótipo (RS)*	5	Lago Guaíba, Guaíba, Vila Elsa, RS, Brasil	Em processo	Presente trabalho
<i>H. davisii</i> Silva e Thome, 1985 (RJ)*	2	Lagoa do Iriry, Rio das Ostras, RJ, Brasil	Em processo	Presente trabalho
<i>H. robusta</i> Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004 (URU)*	1	Arroyo San Miguel, Rocha Uruguai	Em processo	Presente trabalho
<i>H. australis</i> (d'Orbigny, 1835)	1	Mar Chiquita, Argentina	JQ972708	Kroll et al., 2012
<i>H. parchappii</i> (d'Orbigny, 1835)	1	Mar Chiquita, Argentina	JQ972709	Kroll et al., 2012
<i>H. piscium</i> (d'Orbigny, 1835)	1	Isla Martín Garcia, Argentina	KM220906	Koch et al., 2015
<i>H. kuesteri</i> (Strobel, 1874)	1	Uspallata, Argentina	KM220904	Koch et al., 2015
<i>H. andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1835)	1	Lago Titicaca, Huarina, Bolívia,	JQ973030	Kroll et al., 2012
<i>H. andicola culminea</i> (d'Orbigny, 1835)	1	Lago Umayo, Ilha Umayo, Peru,	JQ973034	Kroll et al., 2014
<i>Heleobia stagnorum</i> (Gmelin, 1791)	1	Kaaskenswaters, Zierikzee, Holanda	JQ973024	Kroll et al., 2012
<i>Helebops docimus</i> Thompson, 1968	1	Pond at Chisholm Point, Ilhas Cayman	AF129322	Kroll et al., 2012
<i>Tryonia imitator</i> Pilsbry, 1899	1	Lagoa Peñasquitos, California, EUA	AF061769	Hershler et al., 1999
<i>Onobops jacksoni</i> (Bartsch, 1953)	1	Town, Maryland, EUA	AF367645	Wilke et al., 2001
<i>Pomatiopsis lapidaria</i> (Say, 1817)	1	Condado de Washtenaw, Bridgewater, próximo ao Rio Raisin, Michigan, EUA ( <b>grupo externo</b> )	AF367636	Wilke et al., 2001

Legenda: Os exemplares destacados com (\*) também foram utilizados para análise morfológica.

Fonte: A autora (2020).

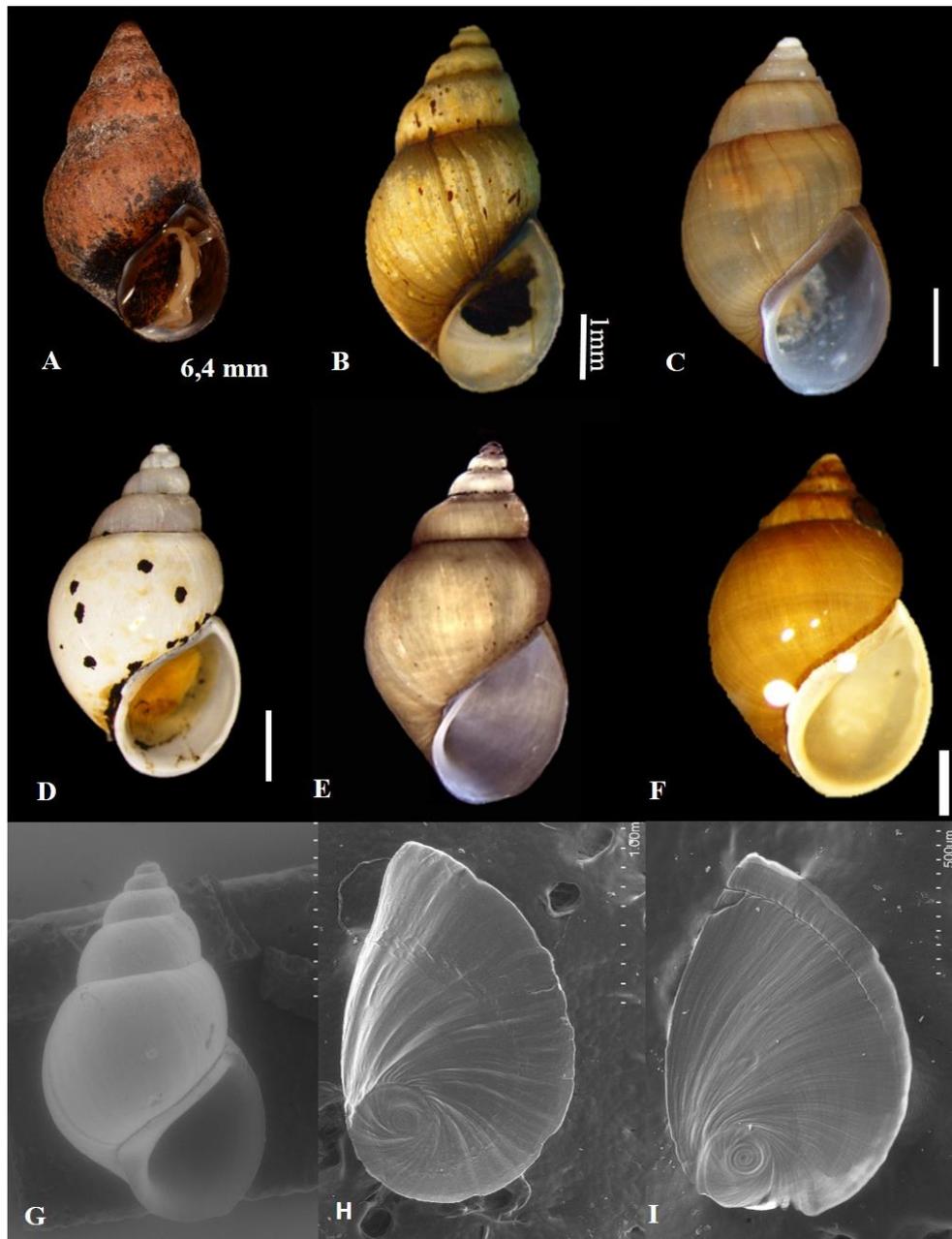
## RESULTADOS

A seguir descreveremos as populações estudadas através da análise morfológica (concha, pênis e rádula), seu hábitat e análise molecular.

**Concha** (Figura 1 A-F): A concha das quatro populações (Lago Guaíba, Lagoa de Itapeva, Lagoa do Iriry e Arroyo San Miguel) se mostrou semelhante, de formato cônico alongada,

espira baixa, volta corporal bem proeminente e globosa, lábio externo fino e simples, lábio interno espesso; depressão umbilical ausente; perístoma contínuo; linhas de crescimento evidentes, principalmente na população da Lagoa do Iriry (Figura 1C). A varredura revelou protoconcha e teleoconcha lisas. As populações apresentaram variações na coloração do perióstraco, de castanho claro a castanho escuro (Figura 1 D, E), e quando o perióstraco é quase todo ausente a coloração é branca (Figura 1D).

Figura 1 - Morfologia da concha das duas espécies nominais.



Legenda: A- C: *Heleobia davisi* A- Parátipo ANSP – A9512. B – Topótipo (Lago Guaiba, Vila Elsa, RS). C- Lagoa de Iriry, Rio das Ostras, RJ; D-G: *Heleobia robusta*: D- Parátipo - MCN 9845 (Lagoa Nicola, RS). E- Arroyo San Miguel, Rocha, Uruguai. Escala: 1 mm, F, G –Topótipo de um dos parátipos (Lagoa de Itapeva, RS). (Escala: 1 mm) H-I Opérculo de *H. davisi*: H- Lado interno. I- Lado externo. Fonte: B-F: A autora (2009); G-I- Suarez, 2018.

**Opérculo** (Figura 1 H, I): composição córnea, alongado, paucispiral, núcleo submarginal, fino, translúcido com coloração castanho claro. Na superfície externa e mais proeminente a interna, podem ser observadas sutis linhas de crescimento. A superfície interna completamente lisa.

**Morfometria:** Apresentada na Tabela 2, as populações de *H. robusta* (Parátipos FZB 9845, Lagoa de Itapeva e Arroyo San Miguel) obtiveram as maiores dimensões para todas as medidas avaliadas, sendo a população de Arroyo San Miguel, Uruguai, a maior entre elas no comprimento (C) e comprimento da espira (CE). Por sua vez, a população da mesma espécie oriunda da Lagoa de Itapeva apresentou as maiores medidas de largura (L), comprimento da volta corporal (CVC), comprimento da abertura (CA) e largura (LA).

Tabela. 2. Estatística descritiva da morfometria das conchas de cinco populações de *Heleobia*.

<b>Variáveis</b>	<i>H. robusta</i> PARÁTIPOS (FZB 9845) N= 10 x̄ DP	<i>H. robusta</i> Lagoa de Itapeva N= 20 x̄ DP	<i>H. robusta</i> Uruguai N= 05 x̄ DP	<i>H. davisii</i> Lagoa de Iriry N= 10 x̄ DP	<i>H. davisii</i> Topótipos, Lago Guaiba, N= 14 x̄ DP
C	5,60 ± 0,25	5,94 ± 0,42	6,43 ± 0,45	4,50 ± 0,16	4,98 ± 1,07
L	3,27 ± 0,15	3,87 ± 0,38	3,69 ± 0,29	2,50 ± 0,09	2,80 ± 0,71
CVC	4,00 ± 0,13	4,65 ± 0,32	4,58 ± 0,35	3,32 ± 0,10	3,70 ± 0,94
CE	1,60 ± 1,92	1,29 ± 0,17	1,84 ± 0,13	1,20 ± 0,09	1,27 ± 0,34
CA	2,63 ± 0,12	3,13 ± 0,23	2,94 ± 0,17	2,25 ± 0,1	2,27 ± 0,67
LA	2,05 ± 0,05	2,36 ± 0,26	2,27 ± 0,17	1,64 ± 0,07	1,51 ± 0,59

Legenda: C= Comprimento; L= largura; CVC= comprimento da volta corporal; CE= comprimento da espira; LA= largura da abertura; CA= comprimento da abertura.

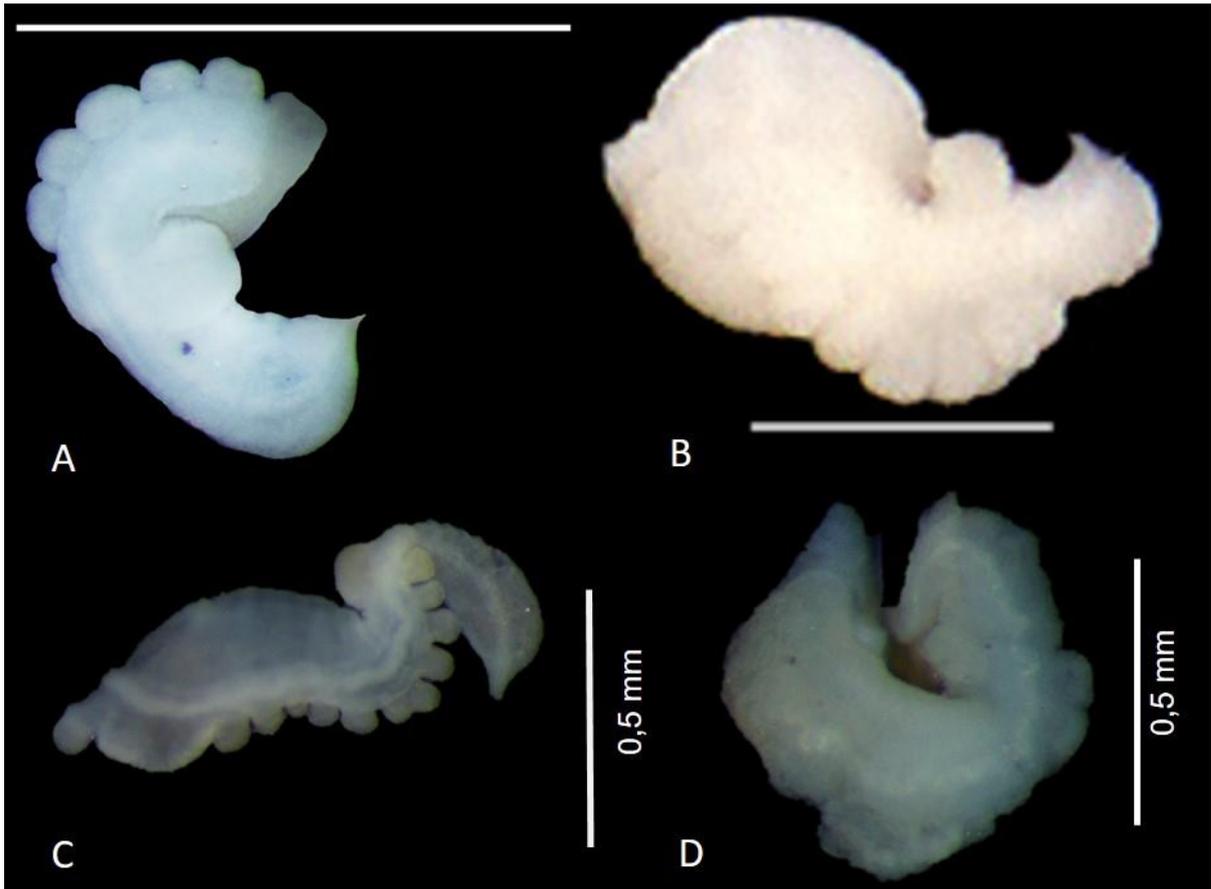
*Heleobia davisii* provenientes da Lagoa de Iriry e Lago Guaiba, tiveram as menores dimensões dos valores médios em todas as variáveis. Entre as duas populações estudadas, as amostras da Lagoa de Iriry apresentaram o menor tamanho para a maioria das medidas, sendo classificada como os menores indivíduos do trabalho.

Ressaltamos que as populações estudadas não apresentaram dimorfismo sexual através das medidas da concha, sendo o valor de p da Permanova não significativo ( $p > 0,005$ ).

**Anatomia peniana** (Figura 2 A-D): Pênis localizado atrás do tentáculo direito, normalmente em forma de foice. É alongado e afunila-se em sua extremidade apical. Possui coloração branca ou cinza, com grande número de papilas ou glândulas apócrinas despigmentadas no lado convexo, com formato arredondado, dispostas de forma aglomerada ou linear, variando de 9 a

12 nas populações estudadas. Além da quantidade, variações no tamanho das papilas entre as populações foram observadas. Na porção basal, é frequente a presença de uma região mais larga, como uma papila dilatada. No lado côncavo uma papila única destacada, sem coloração foi observada em todos os exemplares.

Figura 2 - Morfologia do pênis de diferentes populações de *Heleobia davisi* e *Heleobia robusta*.



Legenda: A – *Heleobia davisi*, Rio Suruí, Magé, RJ Escala: 1mm. B-D *Heleobia robusta* B- Arroyo San Miguel, Rocha, Uruguai. Escala: 0,5mm. C- Parátipo de *H. robusta* (FZB 9845) D- Topótipo, Lagoa de Itapeva, RS. Fonte: A autora (2020).

**Rádula** (Figura 3 A-D): Para descrição e comparação da rádula analisamos os exemplares de *H. davisi* (Figura 3 A e B) do Lago Guaíba, e de *H. robusta* (Figura 3 C e D) da Lagoa de Itapeva, ambos topótipos das respectivas espécies.

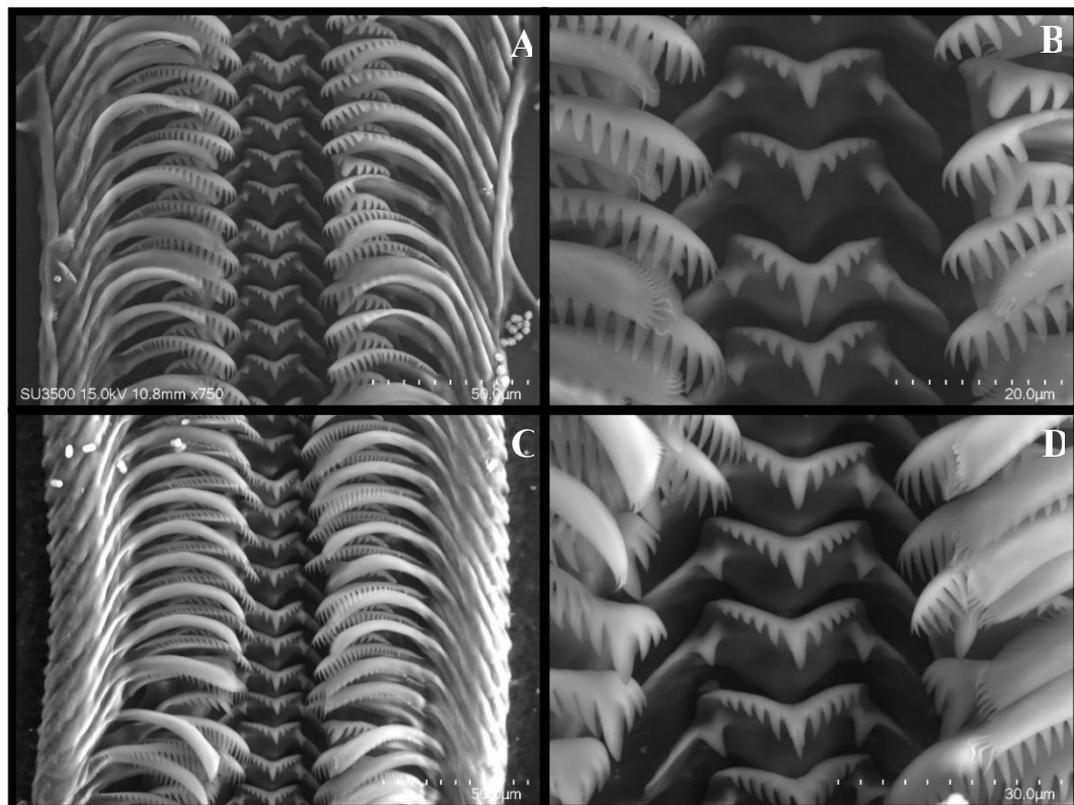
Rádula em forma de “S”, tipo tenioglossa, com 7 dentes por fileira, fórmula radular 2-1-1-1-2 (uma fileira de dente central, um par de dentes lateral e de dois pares de dentes marginais, um interno e um externo). Os exemplares analisados apresentaram um número de fileiras que variaram entre 51 e 59.

*Heleobia davisi* (Figura 3 A, B) apresenta dente raquidiano com cúspides triangulares, variando em quantidade (4-7 | 4-7), sendo a mediana mais proeminente e afilada. Na base do

dente raquidiano um par de denticulo basal foi observado. Dente lateral com cúspides triangulares, variando em quantidade de cúspides (5-1-3); mediana com a extremidade arredondada; cúspides acessórias diminuem de tamanho e em quantidade conforme se aproximam do dente raquidiano. Dente marginal interno com borda cortante, cúspides na margem interna maiores que os da margem externa (Figura 3B). Dente marginal externo em posição arqueada, com muitas cúspides finas e alongadas de aspecto filiforme.

*Heleobia robusta* (Figura 3 C e D) possui forma similar do dente raquidiano de *H. davisi* com cúspides triangulares, onde a mediana destaca-se em tamanho em relação às demais com sua extremidade mais proeminente e afilada. A base do dente raquidiano é dotada de um par de denticulos basais. Dente lateral com cúspides triangulares de pontas afiladas, com a 4ª ou 5ª mais proeminente; cúspides acessórias de tamanho reduzido à medida que se aproxima da borda interna (Figura 3D). Dente marginal interno dotado de muitas cúspides de aspecto filiforme. Dente marginal externo de base arqueada, sobreposto ao marginal interno, com bordo cortante proximal liso e bordo cortante distal com muitas cúspides finas, pontiagudas, e baixa definição de formato devido a um desgaste do dente.

Figura 3 - Rádula de *H. davisi* oriunda do Rio Grande do Sul e *H. robusta* do Uruguai.



Legenda: A-B. *H. davisi* do Lago Guaíba, RS: A- Visão geral da rádula. B- Detalhe do dente raquidiano. C-D: *H. robusta* da Lagoa de Itapeva, RS: C-Vista geral; D- Detalhe do dente raquidiano. Fonte: A autora (2020).

**Habitat:** O hábitat de *H. davisi* e *H. robusta* foi descrito como água doce. Entretanto, a Lagoa de Iriry (Rio de Janeiro), local onde encontramos *H. davisi*, é um ambiente de água salobra (2‰ obtido através de salinômetro), resultado que pode ampliar a sua faixa de ocorrência, principalmente na região costeira do país. As demais populações estudadas foram observadas em ambientes de água doce, como previamente reportado para a espécie.

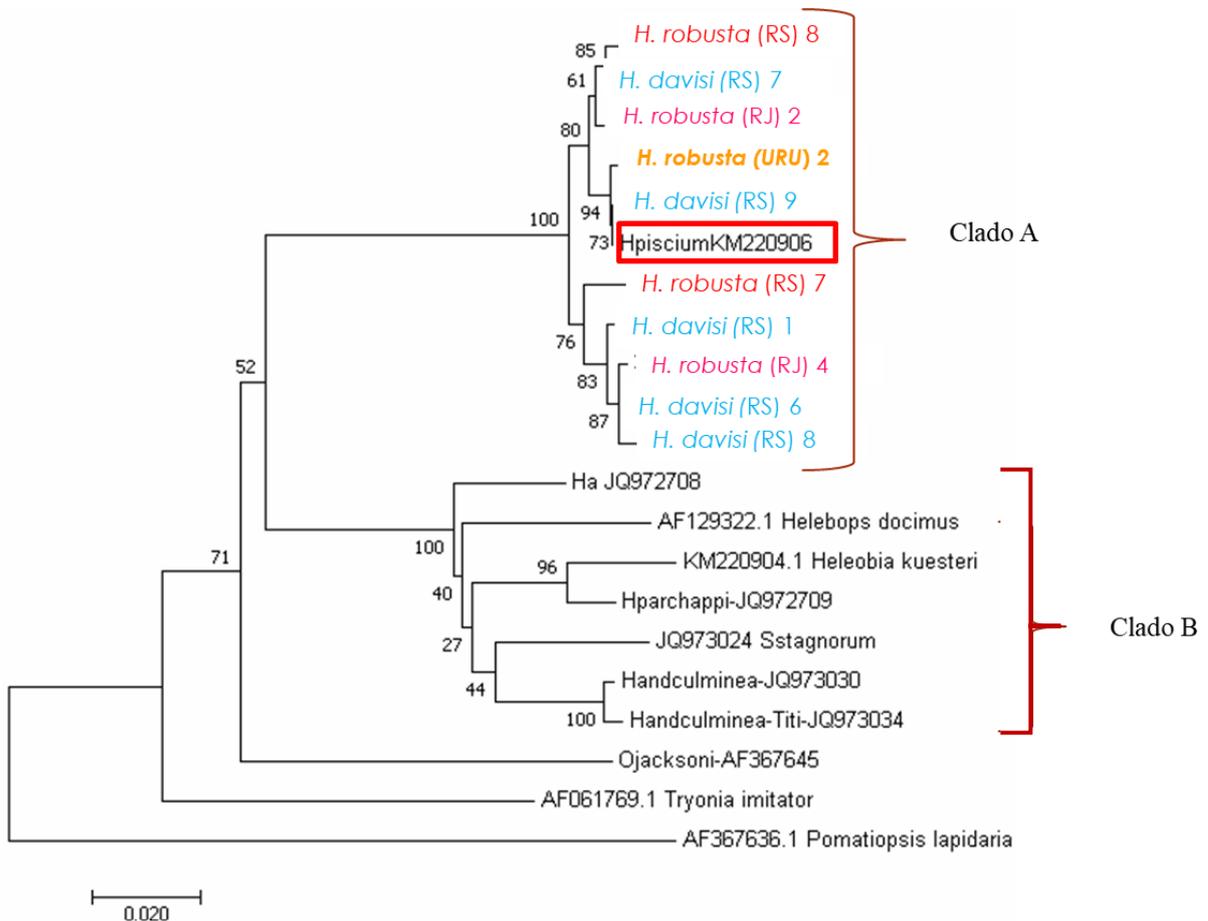
**Análise Molecular:** A análise molecular nos revelou a formação de dois clados principais (Figura 4): Clado A, com um suporte de 100%, onde estão incluídas as sequências de *H. davisi* e *H. robusta* obtidas e utilizadas no presente estudo, além da sequência de *H. piscium*, disponibilizada no GenBank, com procedência da Argentina; Clado B, com o mesmo valor de suporte do clado anterior, reúne as demais espécies de *Heleobia* utilizadas no trabalho, como *H. culminea* (espécie-tipo), *H. parchappii*, *H. kusteri* e *H. stagnorum*, *H. australis*, e uma espécie do gênero *Helebops* (outro Cochliopidae). No mesmo clado, há um clado menor, com valor de suporte baixo (27), agrupando algumas espécies de *Heleobia*, com exceção de *H. piscium* e *H. australis*.

O Clado A não evidencia nenhum agrupamento por espécies nominais, mas sim, um agrupamento das amostras estudadas, inicialmente consideradas como pertencentes a espécies distintas, evidenciando uma forte similaridade genética entre elas. Interessante observar que no mesmo clado foram agrupadas amostras procedentes de regiões distintas, oriundas da Argentina (*H. piscium*), Uruguai (*H. robusta* – URU) e Brasil (*H. davisi* RS, *H. davisi*, RJ e *H. robusta* RS).

Observamos na análise molecular uma grande similaridade de *H. piscium* com as espécies de *H. davisi* e *H. robusta*. Neste clado percebemos que as espécies estão próximas, mesmo em diferentes populações, como por exemplo na figura 4 os exemplares de *H. robusta* (RS) 8, *H. davisi* (RS) 7 e a *H. davisi* (RJ) 2. No Clado A, assim como no Clado B, observamos dois agrupamentos menores, com valores consideráveis de suporte (80 e 76). Nesses grupos não evidenciamos uma separação por área geográfica, visto que populações da Argentina, Uruguai e Brasil estão alocadas em um mesmo grupo.

Outro ponto importante é o distanciamento genético, e conseqüentemente a separação das espécies incluídas no Clado A, de todas as demais espécies de *Heleobia* utilizadas neste estudo. Além disso, todas as espécies, com exceção do grupo externo, se mantiveram agrupadas em um clado maior, justificando seu arranjo dentro da família Cochliopidae. O grupo externo *P. lapidaria* se mostrou bem destacado, confirmado pela sua posição sistemática em outra família (Pomatiopsidae).

Figura 4 - Árvore filogenética de espécies de *Heleobia* obtida pelo método Neighbor-Joining através das sequências de DNA mitocondrial.



Legenda: Em destaque, *Heleobia piscium*, cuja sequência encontra-se disponibilizada no GenBank e com uma forte relação com as espécies do presente estudo.

Fonte: A autora (2020).

No Quadro 1, observa-se a matriz de distância genética indicando a diferença entre as sequências analisadas. Comparando todo o clado A, encontramos uma distância máxima de 2,4% entre *H. robusta* (Uru) 2 e o topótipo de *H. davisii* (RS) 8. Quando investigamos cada população, a maior distância intraespecífica encontrada foi igual a 2,2% na população de *H. davisii* do Lago Guaíba, Vila Elsa, RS 8 e 9 (indivíduos 11 e 12 do Quadro 1, respectivamente). Comparando a *H. piscium*, oriunda da Argentina, e disponível no GenBank, encontramos até 0,002 (0,2%) com o topótipo de *H. davisii* (RS) 9 e *H. robusta* (Uru) 2.

Se compararmos as espécies entre os clados, *H. piscium*, por exemplo, apresenta uma distância de *H. culminea*, espécie tipo do gênero, igual a 13%. Valor semelhante é observado quando comparamos a mesma espécie com *O. jacksoni*, outro Cochliopidae. Com o grupo externo, *P. lapidaria*, a divergência genética chega a 24%.

Quadro 1 - Matriz de distância genética em porcentagem obtida através das sequências de DNA mitocondrial das populações analisadas de *Heleobia* spp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
<b>1</b> <i>P. lapidaria</i> GE																					
<b>2</b> <i>H. stagnorum</i>	22,51																				
<b>3</b> <i>H. kuesteri</i>	23,68	6,88																			
<b>4</b> <i>Tryonia imitator</i>	21,94	16,20	15,37																		
<b>5</b> <i>Helebops docimus</i>	22,75	6,10	6,29	14,55																	
<b>6</b> <i>H. robusta</i> (RS 7)	23,76	13,24	13,85	14,94	13,81																
<b>7</b> <i>H. robusta</i> (RS 8)	23,06	13,24	15,10	15,36	14,02	2,02															
<b>8</b> <i>H. davisii</i> (RS 1)	23,06	14,07	13,85	15,36	13,81	1,51	1,85														
<b>9</b> <i>H. davisii</i> (RS 6)	23,06	13,86	14,05	15,56	14,02	1,17	1,85	0,33													
<b>10</b> <i>H. davisii</i> (RS 7)	23,30	13,24	14,68	15,36	14,02	1,68	0,33	1,51	1,51												
<b>11</b> <i>H. davisii</i> (RS 8)	23,30	14,07	14,26	15,77	14,23	1,51	2,19	0,66	0,33	1,85											
<b>12</b> <i>H. davisii</i> (RS 9)	24,00	13,86	14,47	14,94	13,81	2,02	1,00	1,51	1,85	0,66	2,19										
<b>13</b> <i>Heleobia</i> (RJ 2)	23,30	13,04	14,47	15,36	13,81	1,34	0,66	1,51	1,51	0,33	1,85	0,66									
<b>14</b> <i>Heleobia</i> (RJ 4)	23,06	14,07	14,26	15,56	14,23	1,34	2,02	0,50	0,17	1,68	0,50	2,02	1,68								
<b>15</b> <i>H. culminea</i>	21,60	5,20	5,75	15,36	7,59	12,64	13,05	13,05	12,84	12,64	13,05	13,25	12,44	13,05							
<b>16</b> <i>H. culminea</i> Titicaca	21,60	5,02	5,93	15,77	7,40	12,84	13,25	13,25	13,05	12,84	13,25	13,46	12,64	13,25	0,50						
<b>17</b> <i>H. parchappi</i>	22,28	7,08	2,88	14,95	7,03	12,83	13,24	12,83	13,04	12,83	13,24	12,63	12,63	13,24	4,84	5,02					
<b>18</b> <i>H. piscium</i>	24,00	13,86	14,47	14,94	13,81	2,02	1,00	1,51	1,85	0,66	2,19	0,20	0,66	2,02	13,25	13,46	12,63				
<b>19</b> <i>H. robusta</i> (Uru 2)	24,01	13,66	14,48	15,14	13,62	2,19	1,17	1,68	2,02	0,83	2,36	0,17	0,83	2,19	13,06	13,26	12,64	0,17			
<b>20</b> <i>H. australis</i>	22,97	5,94	6,30	15,77	5,54	11,62	12,02	12,02	12,22	11,62	12,42	11,43	11,43	12,42	5,01	5,20	5,02	11,43	11,24		
<b>21</b> <i>Onobops jacksoni</i>	24,49	14,61	15,04	13,97	13,38	14,23	14,02	13,81	14,02	13,61	14,43	13,40	13,81	14,02	13,98	14,19	13,99	13,40	13,21	13,17	

Fonte: A autora (2020).

A partir dos resultados, sugerimos a sinonímia de *H. robusta* com *H. davisi*, apresentamos abaixo a lista sinonímica:

***Heleobia davisi* Silva e Thomé, 1985**

*Hydrobia australis*: Martens 1865; “nec” d’Orbigny, 1835

*Littoridina charruana*: Kleerekoper, 1944:107; 1949:22; 1955:562; Marcus e Marcus, 1963: 46; 1965: 72; Chomenko e Schäfer, 1984a:162; 1984b:139 “non” d’Orbigny, 1840: 384.

*Littoridina piscium*: Silva e Thomé, 1981; “non” d’Orbigny, 1835

*Littoridina davisi*: Simone, 2006; Agudo-Padron, 2018

*Heleobia robusta* Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004: Clavijo et al., 2011

*Littoridina robusta*: Simone, 2006

*Heleobia davisi* Silva e Thomé, 1985: Veitenheimer-Mendes e Lopes-Pitoni, 1995; Thiengo et al., 1998; 2001; 2002

## DISCUSSÃO

A morfologia da concha das espécies analisadas confirma a descrição original de *H. davisi*. A espécie possui uma concha cônica alongada, espira baixa, volta corporal globosa e lábio interno espessado. Percebemos variações morfométricas entre as conchas das populações. Tal fato pode ser justificado pela concha do molusco sofrer pressões ambientais, o que justifica suas variações, sendo este um atributo que origina erros taxonômicos (GOODFRIEND, 1986; CHIU et al., 2002).

O dimorfismo sexual apontado por Silva e Thomé (1985) e Silva e Veitenheimer-Mendes (2004), não foi evidenciado nas populações estudadas no presente trabalho, resultado semelhante a Gonçalves et al. (2020) (Ver categoria 2 desta tese), em que apenas uma população de *H. australis* das cinco estudadas retrataram dimorfismo sexual.

Ao descreverem *H. robusta*, Silva e Veitenheimer-Mendes (2004) relataram a semelhança da espécie com *H. davisi*, diferenciando-se por *H. robusta* apresentar: concha com lábio externo fino; rádula com um número maior de fileiras de dentes e dentes raquidiano e lateral com menor número de cúspides na borda cortante; espermioducto dilatado e glândula da próstata palial. Entretanto, no nosso trabalho, ao compararmos as conchas dos topótipos e parátipos de *H. robusta* com *H. davisi*, ambas apresentam lábio externo fino e possuem forma semelhante (Figura 1). A rádula das espécies avaliadas, topótipos de *H. davisi* e *H. robusta*,

apresentam variações no número de cúspides, sendo este um carácter variável dentro da mesma população (SILVA; THOMÉ, 1985; SILVA; VEITENHEIMER-MENDES, 2004). Os caracteres glândula da próstata e o espermiducto dilatado, não se mostraram claros na descrição de *H. robusta* fornecida por Silva e Veitenheimer-Mendes (2004).

Silva e Thomé (1985) ao descreverem *H. davisii*, afirmaram que a espécie se assemelhava a *H. piscium* pelos fatores conquiliológicos, a ponto de ter sido considerada *Littoridina piscium* por Silva e Thomé (1981). O Quadro 2 apresenta uma comparação dos aspectos conquiliológicos e anatômicos das três espécies (*H. piscium*, *H. davisii* e *H. robusta*).

As descrições originais presentes no Quadro 2, relatam o grau de similaridade entre as três espécies nominais, quanto à morfologia da concha, rádula e anatomia peniana, caracteres estes, diagnósticos para *Heleobia* (GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; HERSHLER; THOMPSON, 1992). Apesar da semelhança no comprimento entre *H. davisii* e *H. robusta* no quadro comparativo, o nosso estudo revelou populações de tamanhos variados, o que significa uma variação conquiliológica entre as populações.

A rádula das três espécies descrita no Quadro 2, apresentou variação na quantidade de denticulos basais no dente raquidiano, chegando até 3 pares em *H. piscium*. Se compararmos aos nossos resultados, a rádula das populações estudadas do Brasil (Lago Guaíba e Lagoa de Itapeva) apresentou apenas um par de denticulos basais. Contudo, Gaillard e Castellanos (1976); Silva e Thomé (1985) e Silva e Veitenheimer-Mendes (2004) afirmam que esse número pode variar de um a três pares. Entretanto, esse fato diverge da diagnose de *Heleobia* proposta por Hershler e Thompson (1992) em que afirmam a presença de apenas um par de denticulo basal no dente raquidiano. Essa característica corrobora com os resultados encontrados na análise molecular que serão discutidos adiante.

A anatomia peniana das populações estudadas (Lagoa de Itapeva, Lago Guaíba, Arroyo San Miguel, Lagoa de Iriry e Rio Suruí) revelou grande similaridade, com uma variação no número de glândulas apócrinas em seu lado convexo. Esta variação já havia sido observada individualmente para *H. davisii* (SILVA; THOMÉ 1985) e *H. robusta* (SILVA; VEITENHEIMER-MENDES 2004). Em outras espécies de *Heleobia*, a variação no número de glândulas foi observada em *H. parchappii* (CAZZANIGA, 1980; SILVA, 1993) e *H. carcotensis* Collado, Valladares e Méndez, 2016 (COLLADO et al., 2016). No lado côncavo do pênis, todas as populações estudadas apresentaram um lobo bem definido, confirmando com a descrição original das espécies.

Quadro 2 - Comparação dos dados morfológicos entre *H. piscium*, *H. davisi* e *H. robusta*.

	<i>H. piscium</i>	<i>H. davisi</i>	<i>H. robusta</i>
<b>Morfologia da concha</b>	Subcônica, pouco larga, fina e frágil a ligeiramente espessada. Suturas de moderadas a profundas. Espira curta com ápice obtuso; abertura oval; perístoma contínuo, borda columelar levemente grossa. Perióstraco castanho a negro.	Oval-cônica, levemente alongada, não umbilicada, um pouco espessada e lisa, com algumas linhas de crescimento irregulares. Suturas marcadas. Espira curta, cônica, com ápice subagudo. A abertura é oval com uma leve inclinação e o peristômio é contínuo. Perióstraco negro.	Oval-cônica, contorno convexo, umbílico ausente, protoconcha e teleoconcha lisas, fracas linhas de crescimento, às vezes com linhas espirais. Abertura oval, peristômio completo, lábio externo simples de parede espessa, lábio interno espessado. Perióstraco castanho, com deposição de material enegrecido.
<b>Comprimento da concha</b>	2,72 a 6,0 mm	5,6 mm	4,26 -5,93 mm
<b>Largura da concha</b>	1,88 a 3,5 mm	2,8 - 3,3 mm	2,81 – 3,54 mm
<b>Número de voltas</b>	5 a 6 voltas convexas	6 a 7 ¼	6 a 7 voltas convexas.
<b>Opérculo</b>	Não Informado	Córneo, delgado, ovalado e paucispiral. Núcleo excêntrico, próximo a margem columelar.	Alongado-helicoidal, paucispiral, núcleo submarginal, cor âmbar; superfícies dorsal e ventral lisas, marcadas por linhas de crescimento.
<b>Rádula</b>	50 a 55 fileiras. Dente raquidiano com um a três pares de dentículos basais.	60 a 69 fileiras. Dente raquidiano: 10 a 16 cúspides. Um a dois pares de dentículos basais. Dente lateral: 8 a 10 cúspides. Marginal externo: 29 a 44 cúspides	51 a 59 fileiras. Dente raquidiano: 13 a 15 cúspides Um a dois pares de dentículos basais. Dente lateral: 8-1-5. Dente marginal interno com borda cortante.
<b>Morfologia do pênis</b>	Coloração branca. Possui grande número de papilas aderidas no lado convexo, variando de cinco a onze. No lado côncavo, nota-se uma única papila sempre presente.	Lado convexo: 6 a 14 glândulas apócrinas com frequente espessamento glandular de base larga. Lado côncavo há um lobo. Na porção anterior, o pênis está coberto por cílios.	Lado conexo: 9 a 13 glândulas apócrinas, com frequente espessamento glandular de base larga. Lado côncavo há um lobo.

Fonte: Dados compilados de d'Orbigny (1835); Silva e Thomé (1985); Silva e Veitenheimer-Mendes (2004); Gaillard (1973) e Silva e Davis (1983)

A análise molecular, realizada a partir do marcador mitocondrial COI apresentou distâncias genéticas que variaram de 0,2 a 2,4% entre *H. davisii* e *H. robusta*. O valor máximo de divergência (2,4%), como já apresentado, ocorreu entre as populações de *H. robusta* oriundas do Uruguai e o topótipo de *H. davisii* (8) do Lago Guaíba. A menor diferença (0,2%) foi entre *H. robusta* do Uruguai com *H. davisii* (RS) 9, além populações de *H. davisii* do Rio de Janeiro (RJ 4) com Rio Grande do Sul (RS 6) e *H. davisii* (RS 9) com *H. piscium* (GenBank) proveniente do Rio de La Plata, Ilha Martín Garcia, Argentina, próximo a localidade-tipo. A maior divergência intraespecífica foi igual a 2%, para amostras de topótipos de *H. davisii* (RS). Se compararmos essa mesma população com as populações de *H. robusta* (topótipo) e *H. piscium*, ambas também possuem 2% de distância genética. Isso nos revela que a variação intraespecífica da população do Lago Guaíba foi equivalente quando comparada com as demais populações. A divergência da espécie-tipo do gênero, *H. culminea*, foi igual a 13,5% quando comparada a *H. piscium*, valor semelhante quando comparamos a mesma espécie com o gênero *Onobops* (13,4%), representado pela espécie *O. jacksoni*, um outro cocliopídeo. Koch et al. (2015) ao realizarem análise filogenética com *Heleobia* spp., forneceram essa sequência de *H. piscium* que também se mostrou fora do clado de *Heleobia*, mas sem dados morfológicos. Como também forneceram apenas uma sequência da população de *H. piscium*, não foi possível avaliar a divergência intraespecífica da espécie. Futuros estudos com mais exemplares são necessários para estudos comparativos. Szarowska et al. (2014) estudaram várias *Heleobia* spp. oriundas da Europa e Ásia, e reportaram um valor acima de 4,2% de distância genética entre *H. stagnorum* (Gmelin, 1791) e *Heleobia* sp. procedente de Israel. Gonçalves et al. (Ver capítulo 1 desta tese) encontraram uma distância genética semelhante, 4,3%, entre *Heleobia* sp. da Ilha Grande e outras espécies de *Heleobia*. Szarowska et al. (2014) também propuseram a sinonímia de *H. dalmatica* (Radoman, 1974), *H. scamandri* (Boeters, Monod et Vala, 1977) *H. foxianensis* (De Stefani, 1883), *H. maltzani* (Westerlund, 1886) com *H. stagnorum* com uma distância máxima encontrada de até 0,8%.

Verificamos que os resultados das análises moleculares apresentados neste trabalho (Figuras 4 e 5) evidenciaram que a variação morfológica, isto é, a variação nos números de denticulos basais da rádula, a variação no número de papilas e no tamanho das conchas, não corresponderam à variação genética, evidenciando uma menor variação e conseqüentemente uma semelhança genética entre as populações. Ao analisar o cladograma, também não observamos essas variações morfológicas na distribuição das espécies dentro do agrupamento formado.

Gaillard e Castellanos (1976) em seu trabalho de revisão de *Heleobia* spp. da Argentina, propuseram o grupo “piscium”, incluindo *H. piscium* e *H. guaranítica* (Doering, 1884). Apesar de cada espécie incluída nesse grupo serem muito distintas em relação à concha, nenhum trabalho até o momento foi realizado a fim de resolver esse agrupamento, ou seja, verificar sua validade ou não. Além da distribuição mais restrita (Província de Misiones, Corrientes e Entre Rios, Argentina), *H. guaranítica* possui morfologia com características diferenciais, como estrias espirais por todo o comprimento da concha, pênis alongado com extremidade arredondada e presença de papilas discretas (GAILLARD; CASTELLANOS, 1976). Essa espécie necessita de mais estudos para uma redescrição, e provavelmente, separação do grupo “piscium”. Contudo, são necessários estudos anatômicos mais detalhados, assim como moleculares para melhor compreensão do status taxonômico desta espécie. *Heleobia davis* e *H. robusta* foram descritas após o trabalho de revisão de Gaillard e Castellanos (1976), porém com base nos dados aqui apresentados, estas duas espécies estão relacionadas a *H. piscium*, apresentando similaridade morfológica e molecular.

Darrigran (1995) reportou *H. piscium* para o Rio La Plata, desde a Isla Martin Garcia até Punta Piedras (Argentina), em ambientes salobros (salinidade 0,5 a 25%), registrando ocupação em ambientes antes não retratados para a espécie. Isso corrobora com o presente estudo, visto que a Lagoa de Iriry possui salinidade de 2%. Estes dados ampliam a preferência de hábitat da espécie, tendo em vista que a descrição original só reportava para ambientes de água doce. Chomenko e Shafer (1984) reportaram *H. robusta* (citado no texto como *Littoridina charruana*) em habitats que os autores chamaram de “ambientes de baixa salinidade”.

A partir dos dados apresentados, fica evidente que as duas espécies, *H. davis* e *H. robusta*, são semelhantes não apenas nos aspectos morfológicos, mas também, moleculares, havendo também sobreposição na distribuição das espécies. Isso evidencia que são sinônimas, sendo *H. davis* o nome a ser utilizado pelo Princípio de Prioridade (ICZN).

A partir do exposto, devemos ressaltar a configuração da análise molecular, em que foi incluído no Clado A, *H. davis* e *H. piscium*, distinto do Clado B, onde estão inseridas todas as outras espécies de *Heleobia* utilizadas neste trabalho, incluindo *H. culminea*, a espécie-tipo do gênero. Isso levanta dúvidas quanto à permanência de *H. davis* e *H. piscium* no gênero *Heleobia*, pois a alta divergência genética entre os dois clados (aproximadamente 13%), poderia justificar a alocação em um gênero diferente, somado a características morfológicas, como presença de mais de um denticulo basal no dente raquidiano, no que difere da diagnose de *Heleobia*. Ressaltamos que Koch et al., (2015) disponibilizaram apenas uma sequência de *H. piscium* através do marcador COI, e os dados morfológicos são do trabalho de Gaillard e

Castellanos (1976) onde apresentaram desenhos da rádula e do pênis. Diante disso, estudos moleculares com mais exemplares utilizando marcadores mitocondriais e nucleares, além de outros estudos morfológicos com varreduras se fazem necessários para confirmar a similaridade entre *H. davisii* e *H. piscium*, além de sua distinção do gênero *Heleobia*.

## CONCLUSÕES

Os resultados confirmaram a afinidade morfológica e genética entre as duas espécies nominais aqui investigadas, sendo *H. robusta* sinônima de *H. davisii*, através do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN) pelo Princípio de Prioridade.

As populações analisadas apresentaram grande variação genética chegando até 2% de divergência de forma intra e interpopulacional.

A posição sistemática destas espécies no gênero *Heleobia* é controversa pois ambas se mostraram distantes na análise molecular da espécie-tipo de *Heleobia*, com distâncias semelhantes há entre outros gêneros de Cochliopidae.

Estudos com outros marcadores moleculares e detalhamento das partes moles são necessários para aprofundar o conhecimento das relações entre as espécies aqui referidas, e confirmar o provável gênero novo.

## REFERÊNCIAS

AGUDO-PADRON, A.I. Revised and updated systematic inventory of non-marine molluscs occurring in the State of Santa Catarina/SC, Central Southern Brazil region. *Advances in Environmental Studies*, 2(1), 2018.

CAZZANIGA, N.J. Notas sobre Hidrobidos Argentinos. I (Gastropoda Rissoidea) acerca de *Littoridina occidentalis* (Doering, 1884). *Neotropica*, 26 (76), 187-191, 1980.

CAZZANIGA, N.J. *Heleobia* Stimpson 1865: Taxonomia. In: CAZZANIGA NJ., editor. El género *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) en América del Sur. *Amici Molluscarum*, Número especial: 12- 18, 2011.

CHIU, Y.W.; CHEN, H.C.; LEE, S.C.; CHEN, C.A. Morphometric analysis of shell and operculum variations in the viviparid snail, *Cipangopaludina chinensis* (Mollusca: Gastropoda), in Taiwan. *Zoological Studies*, 41.3: 321-331, 2002.

CHOMENKO, L.; SCHÄFER, A. Untersuchungen zur Salzwassertoleranz bei arten des genus *Littoridina* (Hydrobiidae) der Küstenseen von Rio Grande do Sul. *Biogeographica*, 19: 161-173, 1984a.

CHOMENKO, L.; SCHÄFER, A. Interpretação biogeográfica da distribuição do gênero *Littoridina* (Hydrobiidae) nas lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. *Amazoniana*, 9 (1): 127-146, 1984b.

CLAVIJO, C.; SCARABINO, F.; SILVA, M.C.P. da. Primer registro de *Heleobia robusta* Pons da Silva y Veitenheimer-Mendes, 2004. (Caenogastropoda: Cochliopidae) para Uruguay. *Amici Molluscarum*: (Número especial): 77-79, 2011.

COLLADO, G.A.; MÉNDEZ, M.A.; LETELIER, S.L.; VÉLIZ, D.; SABANDO, M.C. Morfología peniana y taxonomía de especies chilenas del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda: Cochliopidae) junto a una revisión de los ejemplares tipo del Museo Nacional de Historia Natural de Chile. *Amici Molluscarum*, 19, 49-58, 2011.

COLLADO, G.A.; VALLADARES, M.A.; MÉNDEZ, M.A. A new species of *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) from the Chilean Altiplano. *Zootaxa*, v. 4137, n. 2, p. 277-280, 2016.

DARRIGRAN, G.A. Distribución de tres especies del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Gastropoda, Hydrobiidae) en el litoral argentino del Río de la Plata y arroyos afluentes. *Iheringia Série Zoologia*, v. 78, p. 3-8, 1995.

FOLMER, O.; BACK, 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.

GAILLARD, M. C. Las formas ecológicas de *Littoridina piscium*. *Neotropica*, v. 19, p. 147-151, 1973.

GAILLARD, M.C. Sobre nuevas *Littoridina* de la Republica Argentina (Moll. Hydrobiidae). *Neotropica* 20 (63): 140-143, 1974.

GAILLARD, C., de CASTELLANOS, Z.A. de. Mollusca, Gasteropoda, Hydrobiidae. In: Ringuelet, RA editor. *Fauna de agua dulce de la República Argentina*. Buenos Aires: Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC). 15(2): 1-39, 1976.

GOODFRIEND, G.A. Variation in land-snail shell form and size and its causes: a review. *Systematic Biology*, v. 35, n. 2, p. 204-223, 1986.

HERSHLER, R.; W.F. PONDER. A review of morphological characters of hydrobioid snails. *Smithsonian Contributions to Zoology* 600, 1-55, 1998.

HERSHLER, R.; LIU, H.P.; MULVEY, M. Phylogenetic relationships within the aquatic snail genus *Tryonia*: implications for biogeography of the North American Southwest. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13 (2):377-391, 1999.

HERSHLER, R.; THOMPSON, F.G. A review of the aquatic gastropod subfamily Cochliopinae (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Malacological Review*, Ann Arbor (5): 1-140, Supplement, 1992.

HERSHLER, R.; LANDYE, J.J. Arizona Hydrobiidae (Prosobranchia: Rissoacea). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 459:1-63, 1988.

ICZN - International Commission on Zoological Nomenclature, 1999.

IHERING, H. VON. Die Gattung *Paludestrina*. *Nachrichtenblatt der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft*, 27(7-8): 122- 128, 1895.

KLEEREKOPER, H. *Introdução ao estudo da limnologia I*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura. 329 p., 1944.

KOCH, E.; MARTIN, S.M.; CIOCCO, N.F. A molecular contribution to the controversial taxonomical status of some freshwater snails (Caenogastropoda: Rissooidea, Cochliopidae) from the Central Andes desert to Patagonia. *Iheringia*, Série Zoologia, 105 (1): 69–75, 2015.

KROLL, O.; HERSHLER, R.; ALBRECHT, C.; TERRAZAS, E.; APAZA, R.; FUENTEALBA, C., WOLFF1, C.; WILKE, T. The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: Correlation between molecular evolution and hydrographic history. *Ecology and Evolution*, 2 (7): 1517–1530, 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874, 2016.

MARCUS, E.; MARCUS, E. On Brazilian supralittoral and brackish water snails. *Boletim do Instituto Oceanográfico*, São Paulo. 13: 41-52, 1963.

MARCUS, E.; E. MARCUS. On Brazilian supratidal and estuarine snails. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo*, (25): 19-82, 1965.

d'ORBIGNY, A. In: d'Orbigny A. 1834–1847. Voyage dans l'Amérique Méridionale exécuté pendant les années 1826-1833. 3<sup>a</sup> Partie: *Mollusques*. XLIX+758p., 1840.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

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

SILVA, M.C.P. da. Dados morfológicos de *Heleobia parchappei* (Orbigny, 1835) (Prosobranchia, Hydrobiidae, Littoridininae). *Iheringia*, Série Zoologia, v. 75, p. 81-87, 1993.

SILVA, M.C.P. da. Hydrobiidae (Gastropoda: Neotaenioglossa: Rissooidea) da planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Tese de Doutorado*, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 382 pp, 2003

SILVA, M.C.P. da; THOMÉ, J.W. Uma nova espécie *Heleobia* (Prosobranchia: Hydrobiidae) do “Rio” Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biologia* 45 (4): 515–534, 1985.

SILVA, M.C.P. da; DAVIS, G.M. d'Orbigny's type specimens of *Paludestrina* (Gastropoda: Prosobranchia) from southern South America. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 135: 128-146, 1983.

SILVA, M. C. P.; THOMÉ, J. W. Primeiro registro de *Littoridina piscium* (Orbigny, 1835) (HYDROBIIDAE, PROSOBRANCHIA) para o Rio Guaíba e Delta do rio Jacuí, Rio Grande do Sul. *Iheringia. Serie Zoologia, Porto Alegre*, v. 59, p. 77-88, 1981.

SILVA, M.C.P. da, VEITENHEIMER-MENDES, I.L. Nova espécie de *Heleobia* (Rissooidea, Hydrobiidae) da planície costeira do sul do Brasil. *Iheringia- Série Zoologia*. 94 (1): 89-94, 2004.

SZAROWSKA, M.; HOFMAN, S.; OSIKOWSKI, A.; FALNIOWSKI, A. *Heleobia maltzani* (Westerlund, 1886) (Caenogastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) from Crete and species-level diversity of *Heleobia* Stimpson, 1865 in Europe. *Journal of Natural History* 48.41-42: 2487-2500, 2014.

THIENGO, S.B.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; STORTTI, M.A. A survey of gastropods in the Microrregião Serrana of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93(Suppl. I): 233-234, 1998.

THIENGO, S.B.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; GRAULT, C.E.; SILVA, H.F.R.; MATTOS, A.C.; SANTOS, S.B. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: I – Metropolitan mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96 (Suppl.): 177-184, 2001.

THIENGO, S.B.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; SANTOS, S.B.; MATTOS, A.C. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: II-Centro Fluminense Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 621-626, 2002.

VEITENHEIMER-MENDES, I.L.; LOPES-PITONI, V.L. Moluscos aquáticos atuais de ecossistemas costeiros em Imbituba, Imaruí e Laguna, Santa Catarina, Brasil: parâmetro de caracterização para paleoambientes. *Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba*, v. 12, n. 2, p. 429-434, 1995.

WILKE, T.; DAVIS, G.M.; FALNIOWSKI, A.; GIUSTI, F.; BODON, M.; SZAROWSKA, M. Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 151(1), 1-21, 2001.

WINNEPENINCKX, B.; BACKELJAU, T.; De WACHTER, R. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9 (12):407, 1993.

#### 4.4 Categoria 4: Diversidade e distribuição geográfica de *Heleobia* (Gastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) para o estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil

##### Resumo

O gênero *Heleobia*, representado por pequenos gastrópodes límnicos e estuarinos, apresenta ampla distribuição na América do Sul. A identificação das espécies é baseada principalmente nos caracteres da concha, pênis e rádula. No Brasil, apresenta poucos estudos voltados para ecologia, sistemática e diversidade, sendo em grande maioria identificados somente até gênero. Para o Rio de Janeiro, esses estudos são mais escassos, restringindo-se apenas a levantamentos de moluscos límnicos com ênfase para espécies de importância médico veterinária. O presente estudo tem por objetivo apresentar a diversidade e distribuição de *Heleobia* spp. para o estado do Rio de Janeiro. Foram amostrados 104 pontos de coleta, distribuídos em nove regiões hidrográficas. Investigamos rios e lagoas, mensurando a salinidade de cada local. Os animais foram separados de acordo com o sexo, anestesiados com mentol, quantificados e identificados. Além das coletas, duas coleções científicas foram consultadas a fim de complementar os dados. Foram encontradas seis espécies de *Heleobia* em 54 localidades, sendo 29 ambientes salobros e 25 límnicos, distribuídos em 28 municípios. Reportamos seis espécies: *H. australis* (d'Orbigny, 1835), *H. davisii* Silva e Thomé, 1985, *H. parchappii* (d'Orbigny, 1835), *Heleobia* sp. 1, *Heleobia* sp. 2 e *Heleobia* sp. 3. A espécie que se mostrou mais tolerante em relação a salinidade foi *Heleobia parchappii*, com ocorrência em lagoas com salinidade de 43 ppm (partes por mil). As demais espécies ocorreram em salinidades mais baixas, com *H. davisii* sendo a menos tolerante a salinidade. *Heleobia* sp. 2 e *Heleobia* sp. 3 só foram encontradas em ambientes límnicos. A Região Hidrográfica III – Médio Paraíba do Sul não apresentou nenhum registro. Podemos concluir que *Heleobia* apresentou ampla distribuição na região costeira do Rio de Janeiro, com predominância em ambientes salobros. Foi observado a simpatria entre *H. australis* e *H. parchappii*; e entre *H. australis* e com *H. davisii*. Estudos que refletem a diversidade e distribuição das espécies, assim como estudos ecológicos, são de grande relevância para futuras medidas de conservação.

Palavras-chave: simpatria; interação planta-molusco; levantamento.

## INTRODUÇÃO

*Heleobia* é um gênero de pequenos gastrópodes que ocorre em água doce ou salobra, com ampla distribuição na América do Sul, além de representantes na Ásia, Europa e África. Sua diversidade é calculada em 104 espécies nominais, sendo reportadas 84 para a América do Sul, distribuídas entre Brasil (06), Peru (16), Bolívia (10), Paraguai (01), Argentina (20),

Uruguai (05) e Chile (26) (HERSHSLER; THOMPSON, 1992; SZAROWSKA et al., 2014; COLLADO et al., 2015; 2016; KOCH et al., 2015; CAZZANIGA, 2017).

Para o estado do Rio de Janeiro (Sudeste do Brasil), seis espécies já foram reportadas: *H. australis* (d'Orbigny, 1835), *H. bertoniana* (Pilsbry, 1911), *H. davisi* Silva e Thomé, 1985, *H. parchappii* (d'Orbigny, 1835), *H. peteningensis* (Gould, 1852) e *Heleobia* sp., com a ocorrência de 37 registros distribuídas em todo o estado (THIENGO et al., 1998; 2001; 2002 a, b; 2004, 2006; SENRA et al., 2006; SIMÕES et al., 2008; 2009; FIGUEREDO-BARROS et al., 2006; SANTOS et al., 2003, 2010; NEVES et al., 2010).

Desses, 21 registros estão identificados até gênero, reflexo da dificuldade na identificação das espécies, além de representar a escassez de estudos taxonômicos para o grupo. Somado a isso, a maioria desses trabalhos foram realizados há mais de dez anos, sendo necessárias novas coletas a fim de verificar a atual distribuição do gênero.

O estado do Rio de Janeiro faz parte da Região Hidrográfica denominada Atlântico Sudeste. Esta região compreende bacias de rios que desaguam no Oceano Atlântico, na região sudeste do país. A Resolução CERHI-RJ nº 107, de 22 de maio de 2013, do Conselho Estadual de Recursos Hídricos (CERHI-RJ), instituiu uma divisão do estado em nove Regiões Hidrográficas, sendo elas: RH I: Região Hidrográfica Baía da Ilha Grande; RH II: Região Hidrográfica Guandu; RH III: Região Hidrográfica Médio Paraíba do Sul; RH IV: Região Hidrográfica Piabanha; RH V: Região Hidrográfica Baía de Guanabara; RH VI: Região Hidrográfica Lagos São João; RH VII: Região Hidrográfica Rio Dois Rios; RH VIII: Região Hidrográfica Macaé e das Ostras; e RH IX: Região Hidrográfica Baixo Paraíba do Sul e Itabapoana. (COPPETEC, 2014).

O objetivo do trabalho foi apresentar a diversidade, distribuição e preferência de hábitat de espécies de *Heleobia* nas regiões hidrográficas do estado do Rio de Janeiro.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1- Área de estudo e levantamento de dados**

As coletas ocorreram entre setembro/2015 e novembro/2018, com amostragem em 93 pontos distribuídos em 28 municípios das nove Regiões Hidrográficas. Investigamos rios, lagoas e estuários, uma vez que *Heleobia* apresenta espécies que podem ocorrer em distintos tipos de ambiente (fluviais e estuarinos) (Figura 1).

Coletamos desde a região de bentos até as plantas aquáticas, com auxílio de uma concha de captura de moluscos conforme descrito por Fernandez et al. (2008), e uma peneira plástica (malha 1 mm) para investigação no sedimento, adaptado de Veitenheimer-Mendes et al. (1992) (Figura 2). A salinidade de cada ponto foi mensurada a partir de um refratômetro de salinidade e as coordenadas geográficas obtidas através de um GPS GARMIM (map 60CSX). Após o levantamento de dados através das coletas, elaboramos um mapa de ocorrência a partir do software ArcGis (versão 10) de acordo com a proposta do CERHI-RJ -Resolução nº 107 de 2013.

Além das coletas, utilizamos dados disponíveis em coleções científicas, tais como CMIOC (Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz) e UERJ (Coleção de Moluscos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro), solicitando empréstimos para disseções e identificação até o nível específico quando possível. Um levantamento bibliográfico também foi realizado para complementar os registros da diversidade de *Heleobia* para o estado.

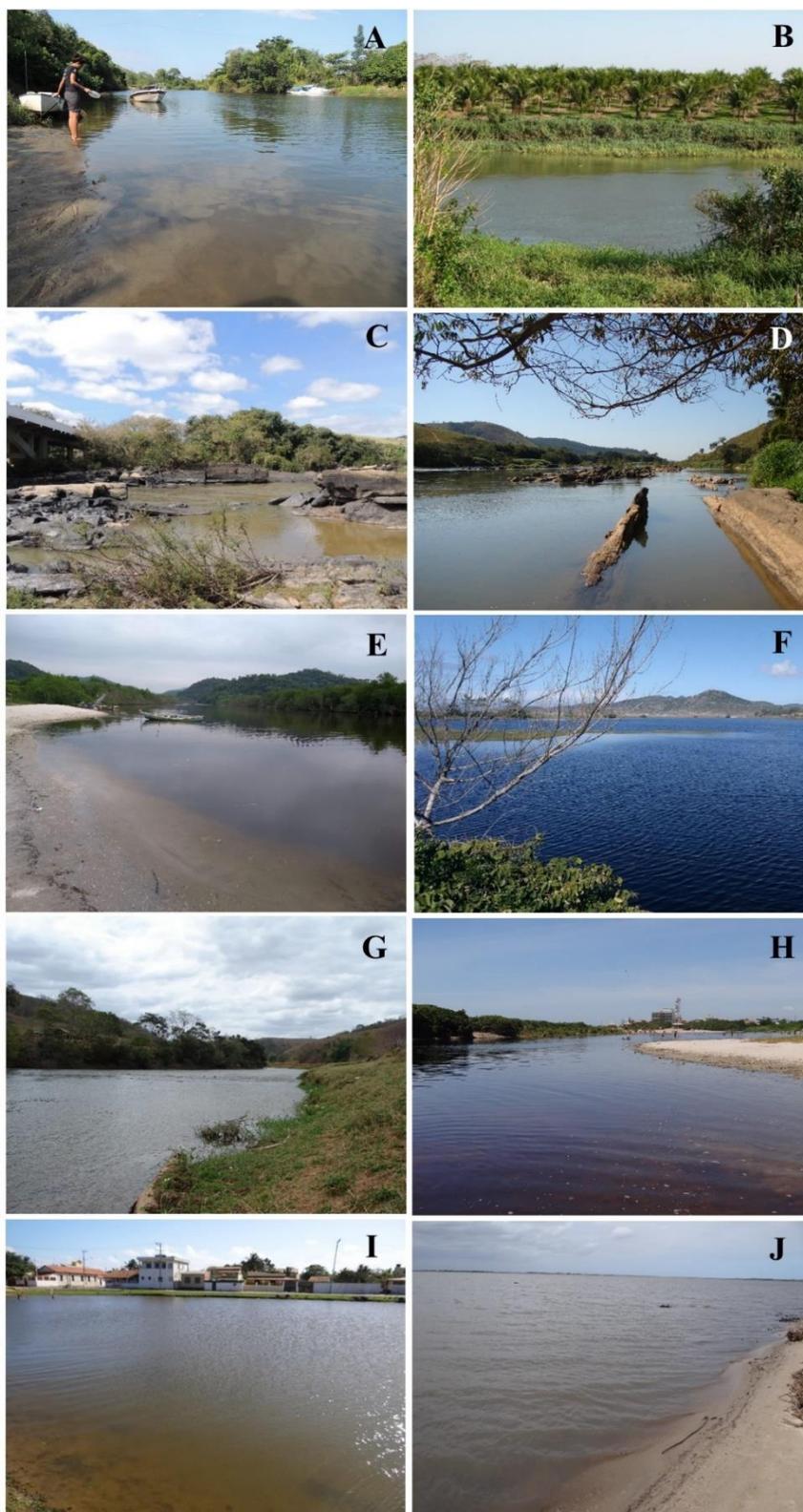
## **2- Curadoria e análises**

Os animais foram transportados vivos para o laboratório com a água do campo, e separados de acordo com o sexo em microscópio estereoscópico. Para anestesia, utilizamos cristais de mentol, seguida de fixação em álcool 70°GL para contagem e identificação. Todo este material encontra-se tombado na Coleção Científica de Moluscos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Para identificação das espécies, utilizamos a literatura disponível para o gênero (GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; SILVA, 2003, SILVA E THOMÉ 1985, SILVA E VEINTENHEMEIER-MENDES, 2004).

Para descrição da concha seguimos a proposta de Gaillard e Castellanos (1976) e para a coloração seguimos Ridgway (2005). A descrição da anatomia peniana seguiu Silva e Veitenheimer-Mendes (2004).

Além das coletas, informações sobre a ocorrência de *Heleobia* no estado do Rio de Janeiro foram reunidas com base nas publicações e, complementarmente, consultando os lotes da CMIOC e da UERJ para obtenção das coordenadas geográficas ou informações que possibilitassem localizar o ponto mais exato do registro. Quando não conseguimos analisar o material, utilizamos a fotografia do animal para auxílio na determinação específica. Todos os pontos amostrados no trabalho, além dos pontos obtidos na literatura, estão disponíveis no Apêndice deste trabalho.

Figura 1 - Imagens de alguns dos pontos de amostragem do estudo.



Legenda: A – Rio Mambucaba, Angra dos Reis (Região Hidrográfica – RH I); B – Canal do São Francisco, Itaguaí (RH II); C – Rio Paraíba do Sul, Vassouras (RH III); D – Rio Paraíba do Sul, Sapucaia (RH IV); E – Foz do rio Suruí, Magé (RH V); F – Lagoa Última, Arraial do Cabo (RH VI); G - Rio Dois Rios, São Fidélis (RH VII); H – Lagoa de Iriry, Rio das Ostras (RH VIII); I - Lagoa de Gargaú, São Francisco de Itabapoana (RH IX), J - Lagoa Feia, Quissamã (RH IX).

Fonte: A autora (2020).

## RESULTADOS

### Espécies de *Heleobia* presentes no estado do Rio de Janeiro

#### Sistemática

**Gastropoda Cuvier, 1795**

**Caenogastropoda Cox, 1960**

**Truncatelloidea Gray, 1840**

**Cochliopidae Tryon, 1866**

***Heleobia* Stimpson, 1865**

***Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835)**

***Heleobia parchappii* (d'Orbigny, 1835)**

***Heleobia davisi* Silva e Thomé, 1985**

***Heleobia* sp. 1**

***Heleobia* sp. 2**

***Heleobia* sp 3.**

A seguir, faremos uma breve descrição das espécies de *Heleobia* encontradas no estado do Rio de Janeiro

*Heleobia australis* (Figura 2 A-E): é uma espécie de água salobra com ampla distribuição em toda a região costeira. Possui concha de contorno reto, voltas planas, suturas bem marcadas, depressão umbilical ausente ou pequena, peristômio incompleto, lábio externo fino e abertura oval. Com comprimento ( $X= 4,19$  mm;  $SD= 1,19$ ) e largura ( $X= 1,92$  mm  $sd= 0,5$ ), o perióstraco variou de coloração *Apricot Yellow a Mignonett Green* (RIDGWAY, 2005). A anatomia peniana de todas as populações de *H. australis* não apresentou grandes variações, portando um padrão com uma única e proeminente glândula apócrina em seu lado côncavo; no lado convexo uma glândula de base larga na região posterior, podendo ser encontrada até três glândulas apócrinas de formato arredondado em sua porção mais anterior. A espécie foi reportada em 17 pontos de coleta com salinidade que variou de 0% a 37%, distribuídas em cinco RHs: RHI (01 ponto), RHII (01 ponto), RHV (8 pontos), RHVI (04 pontos) e RH IX (03 pontos).

*Heleobia parchappii* (Figura 2 F-J): reportada para ambientes límnicos e estuarinos. Possui concha cônica alongada, voltas suaves a bem convexas e suturas bem marcadas. Depressão umbilical presente; peristoma pode ser contínuo ou descontínuo, lábio externo fino.

Abertura circular ou oval. Coloração do perióstraco variando de *Rainette Green* a *Cartidge Buff* (RIDGWAY, 2005). Medidas: comprimento ( $X=3,88$  mm;  $SD= 0,52$ ) e na largura ( $X= 2,08$  mm;  $SD= 0,85$ ). Volta corporal medindo aproximadamente a metade do comprimento. A morfologia peniana apresentou variações quanto à forma das papilas, quanto a sua quantidade no lado convexo. O pênis apresenta em seu lado convexo três a sete glândulas apócrinas, seguida de um afunilamento na porção distal. No lado côncavo, uma pequena papila pode ser observada na mesma região. As populações variaram na forma das glândulas apócrinas, havendo desde glândulas arredondadas até retangulares (Figura 2J). Além disso, observamos uma variação de quatro a sete glândulas apócrinas na face convexa. No presente estudo, encontramos em 42 pontos de coleta, sendo 23 em água doce e 19 em águas salobras cuja salinidade variou de 0% a 43%) Essa totalidade de pontos está distribuída em oito RHs: RHI (01 ponto), RHII (01 ponto); RHIV (01 ponto), RHV (8 pontos), RHVI (17 pontos), RHVII (01 ponto), RHVIII (03 pontos) e RH IX (03 pontos), com a RH VI com maior número de registros.

Dentre o material examinado da CMIOC, analisamos os exemplares identificados como *H. bertoniana* (CMIOC10824) da localidade de Tamoios, Cabo Frio, cujo lote continha apenas conchas, sendo possível observar sua morfologia e comparar com as espécies de *Heleobia*. Percebemos que trata-se de *H. parchappii* e não de *H. bertoniana* como reportado por Thiengo et al. (2002b).

*Heleobia davisii* (Figura 2 K-N): descrita para água doce, mas trabalhos anteriores já reportaram para água salobra (CHOMENKO; SCHÄFER, 1984). Possui concha globosa, espira baixa, suturas bem delimitadas, peristômio incompleto, lábio externo fino e interno bem espesso. A coloração do perióstraco apresenta variações de Sulphine Yellow a Anilline Yellow (RIDGWAY, 2005). As conchas possuem no comprimento ( $X= 5,4$  mm;  $SD= 0,9$ ) e na largura ( $X= 3,37$  mm;  $SD= 0,7$ ). A anatomia peniana revelou uma forma distinta do gênero, pois suas glândulas se dispõem em forma de cachos no lado convexo que variam em quantidade de cinco a nove. O lado côncavo é dotado de uma glândula interna arredondada destacada. Foi encontrada em água doce e salobra, tolerando no máximo 2% de salinidade. No presente estudo, encontramos em quatro RHs: RHI (03 pontos), RHV (01 ponto), RHVIII (02 pontos) e RHIX (03 pontos).

*Heleobia* sp. 1 (Figura 2 P, Q): espécie localizada próxima a foz de um riacho, da Ilha Grande com salinidade igual a zero. Possui concha oval-cônica, voltas convexas, com suaves linhas de crescimento, suturas profundas, abertura oval com lábio interno e externo finos, sendo o último cortante. Perióstraco de coloração *light Cadmium* (RIDGWAY, 2005). Dimorfismo sexual acentuado na morfometria da concha: comprimento das fêmeas ( $X= 3,47$  mm;  $SD= 0,9$ )

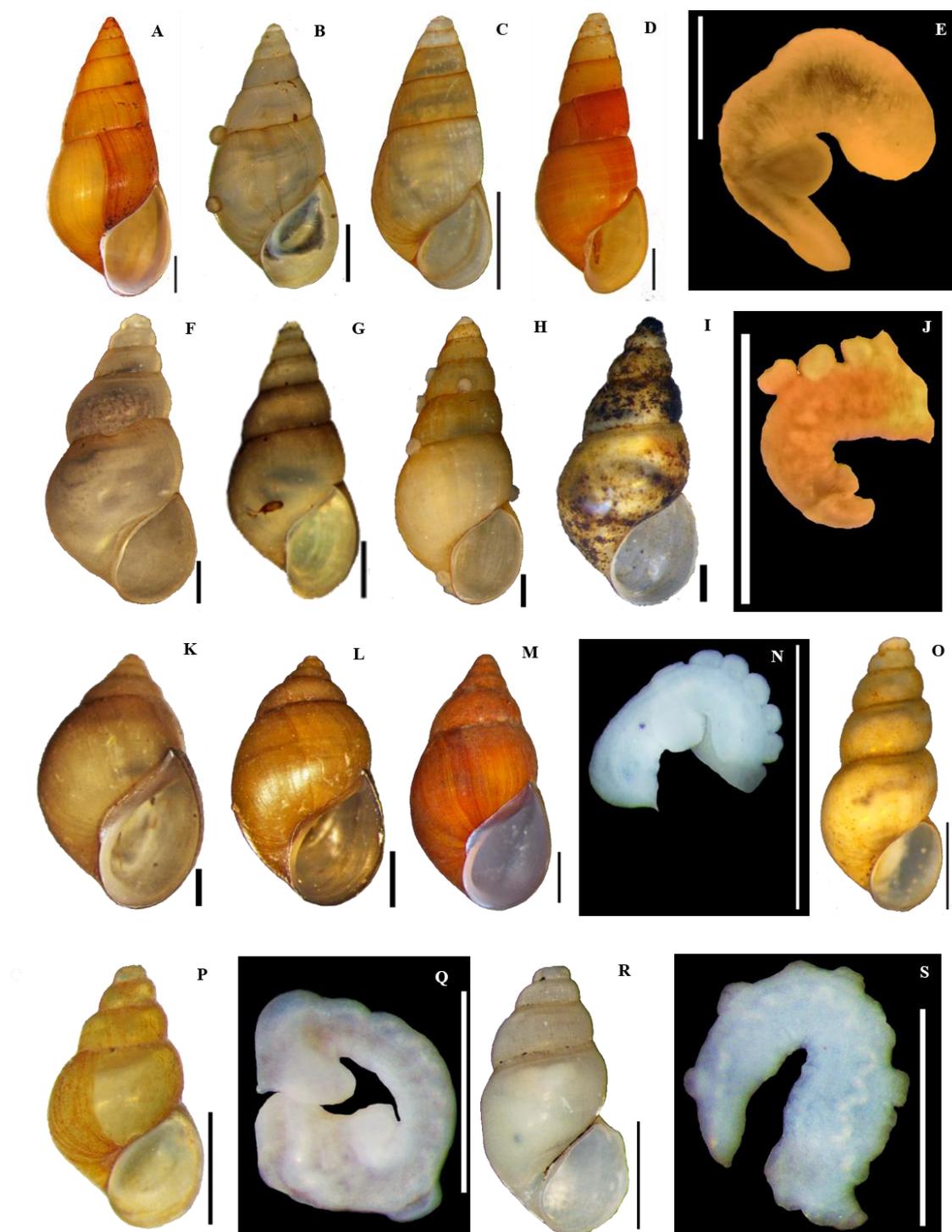
e dos machos ( $X= 2,24$  mm;  $SD= 0,29$ ); largura das fêmeas ( $X= 1,9$ mm;  $SD= 0,35$ ) e dos machos ( $X= 1,34$  mm;  $SD= 0,13$ ). O pênis no lado convexo, possui glândulas apócrinas pigmentadas, variando de duas a quatro, de base larga e contorno arredondado. No lado côncavo nenhuma estrutura foi observada. Na porção distal do pênis percebe-se uma dilatação com uma projeção pontiaguda de aspecto mamiliforme. Reportado somente para o riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, pertencente a RH I: Baía da Ilha Grande. Espécie em fase de descrição para publicação (Ver capítulo 1 desta tese).

*Heleobia* sp. 2 (Figura 2 O): espécie de água doce, com concha cônica e alongada, lisa, sem marcas de crescimento, voltas bem convexas e abertura arredondada. A coloração do perióstraco é *Light Orange Yellow* (RIDGWAY, 2005). Concha com comprimento ( $X= 2,8$  mm  $SD= 0,58$ ) e largura ( $X= 1,7$  mm;  $SD= 0,26$ ). Só apresentamos fotografia da concha porque encontramos apenas cinco espécimes fêmeas. Consideramos esta espécie como nova através das características conquiliológicas e aspectos da rádula observados em microscopia eletrônica de varredura, por não se enquadrar na diagnose de nenhuma outra espécie do gênero *Heleobia*. A descrição da espécie está sendo providenciada com a complementação da análise molecular. Encontrada em apenas um ponto de coleta, no Rio Guapimirim, município Guapimirim, RH V – Baía de Guanabara.

*Heleobia* sp. 3 (Figura 2 R, S): espécie com grande densidade populacional, de ocorrência apenas em água doce. A concha possui formato cônico, com a abertura projetada levemente para a direita. Suturas marcadas, não profundas. Apresenta linhas longitudinais de crescimento suave. Espira alongada com aproximadamente 4,5 voltas; abertura circular, perístoma completo, com lábios interno e externo finos. A cor do perióstraco variou entre a cor Bone Brawn e Fuscous (RIDGWAY, 2005). Possui comprimento ( $X= 2,89$  mm;  $SD= 1,5$ ) e largura ( $X= 1,5$  mm;  $SD= 0,53$ ). O animal apresenta um pênis levemente curvado para a direita, com a base mais larga que a porção final. Percebe-se um afunilamento uniforme com a porção distal pontiaguda. No lado côncavo não foram observadas papilas. E no convexo, os cinco exemplares observados possuíam de três a sete papilas retangulares. O pênis era levemente transparente com observação do vaso deferente em todo o seu comprimento. Estudos moleculares já foram realizados para a futura descrição da espécie. Espécie reportada em um ponto da RH VII Rio Dois Rios, e para três pontos da RH IX - Baixo Paraíba do Sul e Itabapoana.

Na Figura 2 estão disponibilizadas as fotografias das conchas e do pênis das espécies encontradas no estudo. Nela percebemos as distintas características na morfologia da concha e na anatomia peniana.

Figura 2 - Diversidade e variação morfológica intra e interespecífica de *Heleobia* conhecida espécimens coletados no estado do Rio de Janeiro.



Legenda: *Heleobia australis* (A-E): A- Concha de Lagamar. B- Concha da Lagoa de Marapendi com cápsulas de ovos aderidas a ela. C – Concha da Baía de Guanabara. D, E- Concha e pênis da Lagoa de Jaconê; *Heleobia parchappii* (F-J): F – Concha da Lagoa de Jacarepiá. G- Concha da Lagoa Rodrigo de Freitas, H, I – Concha com cápsulas de ovos, e Pênis do Rio Caxito; *Heleobia davisi* (K- N): K- Concha de Lagoa de Carapebus. L- Concha da Lagoa de Iriry. M, N - Concha e pênis do Rio Suruí. O- Concha de *Heleobia* sp.2, Rio Soberbo; P, Q – Concha e pênis de *Heleobia* sp. 1, Vila do Abraão; R, S – Concha e pênis *Heleobia* sp. 3, Rio Muriaé. Fotos: A autora (2020). A escala para todas as fotos= 1 mm, exceto fotos Q e S= 0,5 mm. Fonte: A autora (2020).

## Diversidade e distribuição das espécies de *Heleobia* no estado do Rio de Janeiro

Do total examinado, obtivemos 104 locais, incluindo coletas, coleções científicas e literatura. Destes, 54 pontos ou 47,36%, foram registrados *Heleobia* spp., sendo 29 ambientes salobros e 25 de água doce,. Foram reportadas três espécies conhecidas: *Heleobia australis*, *Heleobia parchappii*, *Heleobia davisi* e mais três consideradas novas para a ciência: *Heleobia* sp.1, *Heleobia* sp.2 e *Heleobia* sp. 3.

Do material presente nas coleções científicas examinadas, identificamos 11 localidades que não amostramos e obtiveram registro de duas espécies: *H. australis* e *H. parchappii* sinalizadas no Apêndice com \* para material depositado na CMIOC e ▲ para depósito na UERJ. Desses pontos, embora não tenhamos efetuado medida direta da salinidade, podemos inferir sete pontos como sendo de água doce e quatro de ambiente salobro.

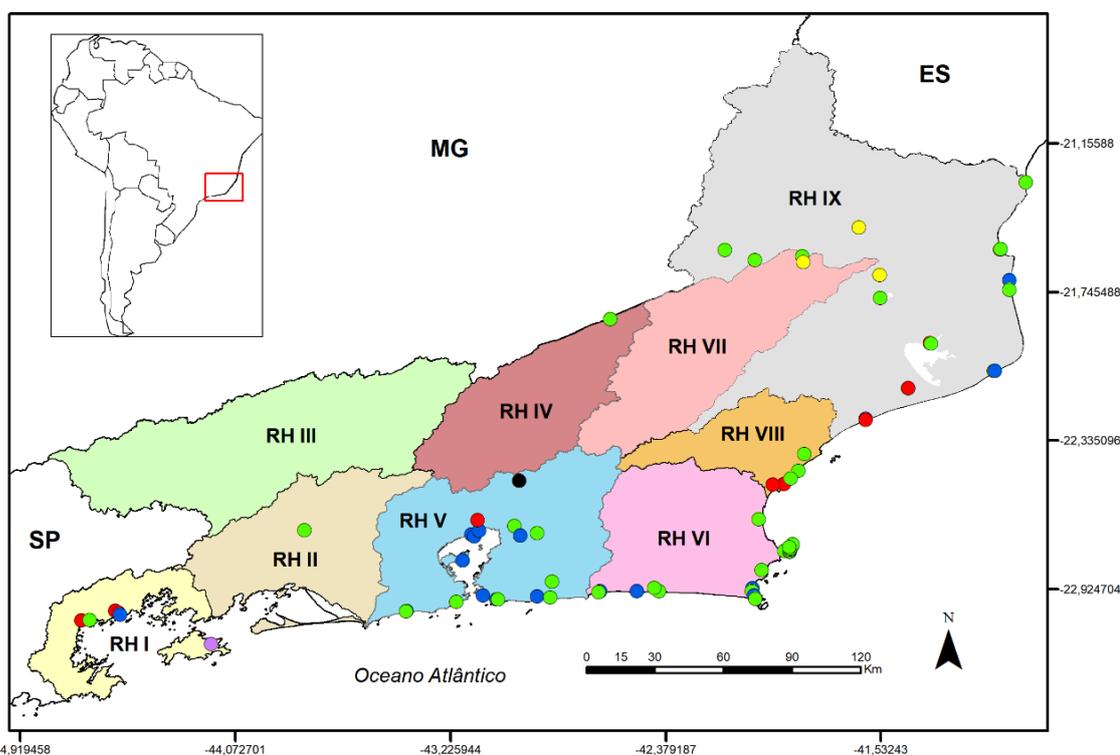
Dos dados disponíveis na literatura, *H. australis* ocorre na Lagoa de Imboassica, Macaé (FIGUEREDO-BARROS, 2006) e Lagoa Salgada, Campos dos Goytacazes (SENRA, 2006). Destas, apenas o registro de Macaé foi incluído neste trabalho porque, conforme imagem disponível no registro de Senra (2006), trata-se de *H. parchappii*. Porém, não contabilizamos por falta de acesso ao material. Além deste, os registros de *H. australis* reportada para a Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro por Simões et al. (2008, 2009) é equivocado, sendo o correto *H. parchappii* para a localidade.

O mapa de distribuição (Figura 3) e o gráfico de riqueza (Figura 4) apresentam a ocorrência das espécies de *Heleobia* nas nove regiões hidrográficas, considerando os dados das coletas, da literatura e das coleções científicas examinadas.

A partir do mapa percebemos que o gênero é muito frequente nas regiões costeiras do Rio de Janeiro, enquanto no interior do estado sua presença é pontual, e às vezes, ausente, como na RH III Médio Paraíba do Sul. O gráfico de riqueza e distribuição da Figura 4 revela que as RH I – Baía da Ilha Grande, RH V – Baía de Guanabara e RH IX – Baixo Paraíba do Sul e Itabapoana, se mostraram com maior riqueza, com quatro espécies cada.

A Região Hidrográfica com mais registros de *Heleobia* foi a RHVI – Lagos São João, representada por 21 ocorrências distribuídas por duas espécies, *H. australis* e *H. parchappii*. Já em relação ao menor número de registros temos a RH IV – Piabanha, com apenas um registro de *H. parchappii*, enquanto que a RH III – Médio Paraíba do Sul, nenhum exemplar foi encontrado ou reportado pela literatura.

Figura 3 - Mapa de distribuição das espécies do gênero *Heleobia* para o estado do Rio de Janeiro.



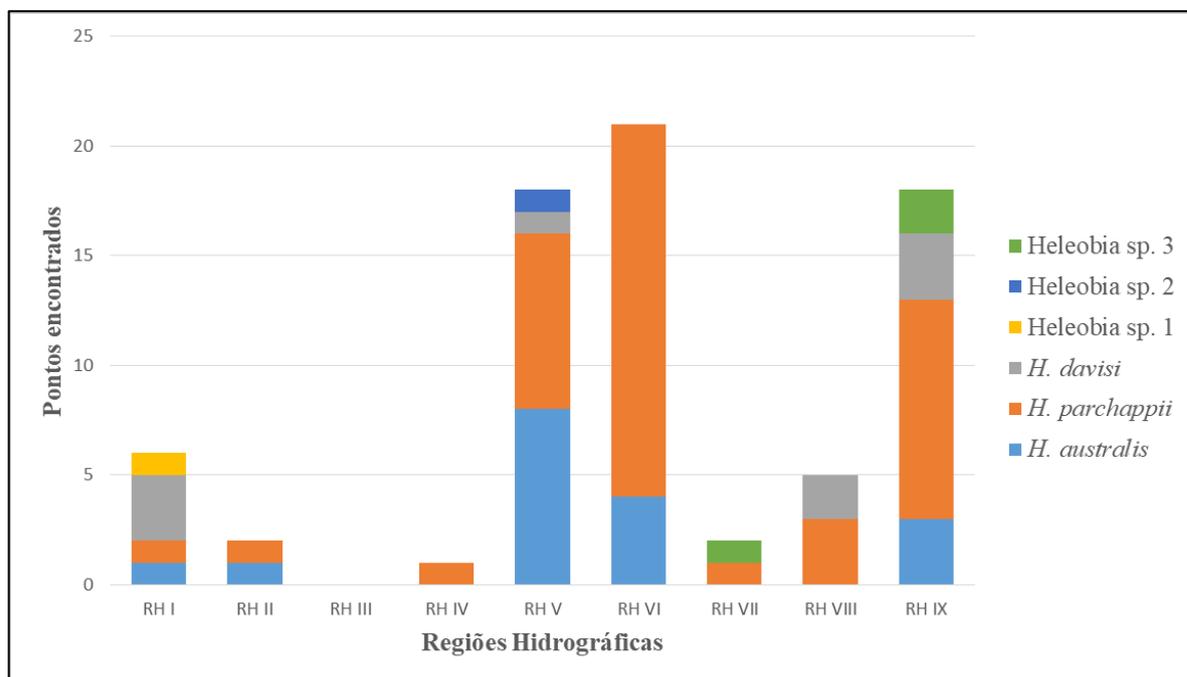
Legenda: ● *Heleobia parchappii*; ● *Heleobia australis*; ● *Heleobia davisii*; ● *Heleobia* sp.1; ● *Heleobia* sp.2; ● *Heleobia* sp.3. RH I: Região Hidrográfica Baía da Ilha Grande; RH II: Região Hidrográfica Guandu; RH III: Região Hidrográfica Médio Paraíba do Sul; RH IV: Região Hidrográfica Piabanha; RH V: Região Hidrográfica Baía de Guanabara; RH VI: Região Hidrográfica Lagos São João; RH VII: Região Hidrográfica Rio Dois Rios; RH VIII: Região Hidrográfica Macaé e das Ostras; e RH IX: Região Hidrográfica Baixo Paraíba do Sul e Itabapoana.

Fonte: A autora (2020).

De acordo com o gráfico de riqueza (Figura 4), as RH I, V e IX foram as mais ricas com registro de quatro espécies cada uma. Na RH I, as espécies reportadas para a região foram: *Heleobia australis*, *H. davisii*, *H. parchappii* e *Heleobia* sp. 1. A RH V, mostrou uma composição semelhante com substituição da *Heleobia* sp. 1 para *Heleobia* sp. 2. E na RH IX, também com a composição semelhante, sendo alterada para *Heleobia* sp. 3.

Quanto as espécies por regiões hidrográficas, *H. parchappii* foi a mais representativa, com ocorrência em oito das nove RHs do estado do Rio de Janeiro, com a distribuição mais ampla no estado, possivelmente abarcando um maior número de bacias com características ambientais distintas (Figura 4). Em seguida *H. australis* apareceu em cinco RHs.

Figura 4 - Riqueza e distribuição das espécies de *Heleobia* por Regiões Hidrográficas do estado do Rio de Janeiro.



Fonte: A autora (2020).

Dos pontos com registro de *Heleobia* spp. sete deles, o equivalente a 13%, apresentaram mais de uma espécie no mesmo ambiente. A simpatria foi reportada em sete ambientes lacustres nos municípios de Maricá (Lagoa de Maricá), Carapebus (Lagoa de Carapebus), Niterói (Lagoa de Piratininga), Arraial do Cabo (Lagoa Última), Campos dos Goytacazes (Lagoa Feia e Lagamar) e Rio de Janeiro (Lagoa de Marapendi). Em cinco destes pontos, observamos simpatria das espécies *H. australis* e *H. parchappii*. Já na Lagoa Feia, observamos a presença de *H. davisii* e *H. parchappii*, enquanto na Lagoa de Carapebus, *H. australis* e *H. davisii* foram registradas.

Se compararmos a tolerância das espécies, notamos *H. australis* e *H. parchappii* como mais resistentes a salinidade. Enquanto *H. davisii*, ocorrendo em salinidade com até 2%.

Salientamos para a presença de *Heleobia* em três pontos de coleta (Rio Iriry, em Parati, Lagoa próxima a barra de Gargaú, São Francisco de Itabapoana, e Lagoa de Carapebus, em Carapebus) de diferentes RHs aderidas na planta *Bacopa monnieri* (L.) (Figura 5) com salinidade até 2%. As espécies *H. australis*, *H. parchappii* e *H. davisii* foram encontradas nesse substrato vegetal.

Figura 5 - Planta aquática *Bacopa monnieri* utilizada como substrato por *Heleobia* spp.



Fonte: A autora (2020).

## DISCUSSÃO

Muitos trabalhos ecológicos apresentam dificuldades na identificação de vários táxons. Dos treze trabalhos (ver acima) que registraram *Heleobia* para o estado do Rio de Janeiro, os autores identificaram somente até gênero (SANTOS et al., 2003; THIENGO et al., 2002; 2004; 2006), reforçando a dificuldade na determinação específica. Entre estes fatores, apontamos as variações intraespecíficas decorrentes de pressões ambientais (MCGRAW, 1957; CAZZANIGA, 1982) e variabilidade genética (SZAROWSKA et al., 2014), trazendo confusões e erros taxonômicos como já relatado nos trabalhos de Senra et al. (2006), Simões et al. (2008, 2009).

A população de *H. australis* da Baía de Guanabara e da Lagoa de Jaconé, medem respectivamente 2,75 mm e 4,62 mm de comprimento. Apesar dessa grande variação no comprimento da concha, não foram observadas variações na morfologia do pênis (Figura 2). Essa variação conchiliológica também foi observada em *H. parchappii* por Silva (1993) e Cazzaniga (1982), novamente sendo constatada uma uniformidade das partes internas. Corroborando com outros estudos (GAILLARD; CASTELLANOS, 1976; HERSHLER; THOMPSON, 1992; COLLADO et al., 2011), a morfologia do pênis se mostrou como um bom critério taxonômico nos estudos com *Heleobia*. Da mesma forma, a análise molecular pode apresentar dados complementares sendo considerada uma boa ferramenta para o estudo do grupo, resultando em uma taxonomia integrativa (PADIAL et al., 2010).

Através dos resultados, vimos que a RHVI- Lagos São João, apresentou 21 registros de *Heleobia* em 24 pontos coletados, sendo esta região a que apresentou maior número de

ocorrências. Essa região hidrográfica é formada pelas bacias do Rio São João, do Rio Una, do Canal de Medeiros, do litoral de Armação dos Búzios, além das bacias contribuintes do complexo lagunar de Saquarema, Jaconé e Araruama (INEA, 2013). Nessa região, temos um grande conjunto (complexo) de lagoas (doces e salobras) próximas geograficamente. Acreditamos que esse grande número de registros possa estar atrelado a processos geológicos, uma vez que o mar há aproximadamente 5.000 anos AP (antes do presente) estava cerca de 5 metros acima do nível atual. Após uma rápida regressão marítima, as lagoas foram sendo formadas, e aos poucos perdendo sua conectividade (CASTRO et al., 2009). Além disso, Lanzer e Schäfer (1988) apontam que a migração de organismos de lagoas costeiras pode ser facilitada pela sua proximidade, e principalmente por muitas estarem interligadas através de canais artificiais. Esse fato foi observado no estudo em alguns pontos, como a conectividade entre as Lagoas de Jaconé e Saquarema. Porém, os mesmos autores alertam que essa forma de dispersão ocorre de forma lenta e gradual. Malone (1965) salienta que as aves são os agentes primários de dispersão passiva de moluscos dulciaquícolos e possuem capacidade de migrar por longas distâncias.

Trabalhos anteriores apontam algumas espécies de *Heleobia* sp. em outras regiões costeiras do país: *H. miaulis* (Marcus & Marcus, 1965) em Cananéia, São Paulo (SIMONE, 2006). *Heleobia australis* é reportada para a Foz do Rio Doce, Espírito Santo (GOMES et al., 2017), para Cananéia, São Paulo (MARTINEZ et al., 2013), na Baía de Santos, litoral de São Paulo (TOMMASI, 1970), Rio D'Una, em Santa Catarina (VEITENHEIMER-MENDES; LOPES-PITONI, 1995), na Baía do Paranaguá, Paraná (LANA, 1986), e no Armazém Tramandaí, no Rio Grande do Sul (KAPUSTA et al., 2005). *Heleobia davisii* para Lagoa do Imaruí, Santa Catarina (VEITENHEIMER-MENDES; LOPES-PITONI, 1995), e no Lago Guaíba (SILVA; THOMÉ, 1985). *Heleobia parchappii* também no Rio Grande do Sul para a Estação Ecológica do Taim (SILVA, 1993) e na Lagoa dos Patos (BEMVENUTI et al., 1978). Nota-se a ausência de estudos que indiquem outros estados brasileiros frente ao vasto litoral brasileiro e a riqueza de hidrográfica do país, sobretudo as regiões norte e nordeste do país.

Acreditamos que a predominância das espécies de *Heleobia* na região costeira, possa ser consequência de dois fatores: o primeiro referente ao maior esforço amostral decorrente da facilidade de acesso, e conseqüentemente um maior número de estudos são realizados nessas áreas. E segundo, em relação aos processos geológicos responsáveis pela formação das regiões costeiras, especialmente as lagoas, como já discutido anteriormente. Lanzer e Schäfer (1988) afirmam que o padrão de distribuição dos moluscos dulciaquícolos das lagunas costeiras do Brasil, não responde a barreiras geográficas, mas sim, a barreiras ecológicas associadas a áreas

de variação de concentração salina. Cherrill e James (1985) apontam a salinidade como o principal fator abiótico que influencia na distribuição dos Hydrobiidae. Já Fenchel (1975) informa que o padrão de distribuição dos Hydrobiidae é o resultado da interação de vários fatores: seleção de hábitat, migração e colonização, competência, e outras interações bióticas.

As coletas realizadas em sete pontos na RH III – Médio Paraíba do Sul não apresentou nenhum registro de *Heleobia*. Esse resultado corroborou os levantamentos de moluscos límnicos realizados pela equipe do laboratório de Referência em Malacologia Médica do Instituto Oswaldo Cruz (THIENGO et al., 2004).

A simpatria registrada no presente estudo já foi reportada por outros autores. Fernandes et al. (no Prelo) assinalaram a presença das espécies *H. australis* e *Heleobia* sp. na Lagoa de Marapendi. Ao examinar este material, identificamos essa espécie como *H. parchappii*. Thiengo et al. (2002a), reportaram *Heleobia* sp. (CMIOC 10.635) e *H. australis* (CMIOC 10.627) para o Rio das Ostras. Essa simpatria pode nos indicar que apesar de conviverem no mesmo hábitat, com sobreposição de nicho completa, ou seja, no mesmo espaço e recurso alimentar, elas não parecem sofrer uma pressão que gere desvantagem de uma sob a outra, visto que ambas foram coletadas sem dificuldades. A simpatria de *H. australis*, uma espécie estuarina, com *H. davisii*, espécie descrita para água doce, para Lagoa de Carapebus, pode ser justificada por uma baixa salinidade, bem próxima a zero. Apesar de *H. australis* ser estuarina, Neves et al., (2011) a partir de testes em laboratório, afirmam a hipótese que a espécie é resistente e tolerante a amplas variações de salinidade, com variação de 0 a 80S.

A presença de *H. australis* associada a planta aquática *Bacopa monnieri* L. não havia sido reportada na literatura, sendo este seu primeiro registro. Outros trabalhos já reportaram *H. bertoniana* em *Eichornia azurea* e *E. crassipes* (PFEIFER; PITONI, 2003). Marcus e Marcus (1963) reportaram *H. charruana* (d'Orbigny, 1840) nas raízes de *Eichornia* e *Salvinia* em Cananéia, SP. Ihering (1895) registrou *H. charruana* também em raízes de *Salvinia* para a região de Iguape, São Paulo. Marcus e Marcus (1965) observaram *H. miaulis* em raízes de *Elodea*. Callisto et al. (1996) reportou *H. australis* associada a *Typha domingensis* (Pers.) na Lagoa de Imboassica, em Macaé, RJ. Para a mesma espécie, Canepuccia et al. (2007) reportaram a interação com *Spartina alterniflora*.

A salinidade não mostrou ser um fator limitante para ocorrência de *H. australis*, *H. parchappii* e *H. davisii*, uma vez que encontramos esses animais em lagoas costeiras, canais e estuários com diferentes salinidades. A espécie que se mostrou mais resistente foi *H. parchappii*, coletada no canal que circunda a Lagoa Vermelha, considerada uma lagoa hipersalina, sem outros moluscos reportados. *H. parchappii* tolerou até 43% de salinidade.

A espécie nova reportada para a Ilha Grande, *Heleobia* sp.1, inicialmente identificada como *H. australis* (SANTOS et al., 2010) foi observada em um riacho no principal vilarejo da região, a Vila do Abraão, município de Angra dos Reis, com 4.883 habitantes, sendo o fluxo de turistas muito grande, podendo triplicar esse quantitativo no verão (CADEI et al. 2009). O riacho está margeado de casas com um constante assoreamento decorrente de obras nas suas margens. Além disso, recebe constantemente dejetos residenciais, diminuindo a qualidade e saúde do riacho. Apesar do local estar inserido em uma Unidade de Conservação (Parque Estadual da Ilha Grande – PEIG), as ameaças antrópicas se tornam a cada dia mais crescentes, colocando em risco a sobrevivência dessa e outras espécies de moluscos reportados para o local (SANTOS et al., 2010). Outra ameaça é a introdução de espécies exóticas, como reportado por Gonçalves et al. (2014). A coleta nessa localidade vem sendo realizada por muitos anos em estudo de longo prazo, onde percebemos um declínio populacional acentuado (GONÇALVES, 2013).

## CONCLUSÕES

A partir do estudo concluímos que o Estado do Rio de Janeiro apresenta seis espécies de *Heleobia*, sendo três destas, novas para a ciência.

A RH III – Médio Paraíba do Sul não apresentou registros de *Heleobia*.

As regiões I, V e IX apresentaram maior diversidade com quatro espécies cada.

A Região Hidrográfica com mais registros foi a RH VI – Lagos São João.

As espécies podem ocorrer de forma simpátrica.

A planta aquática *Bacopa monnieri* foi encontrada em alguns pontos de coleta em associação com mais de uma espécie de *Heleobia*.

A espécie *H. parchappii* se mostrou mais resistente a salinidade que as demais, suportando até 43%.

*Heleobia bertoniana* não ocorre no estado do Rio de Janeiro, sendo este registro atualizado para *H. parchappii*.

Estudos de levantamentos são extremamente importantes para o conhecimento da biodiversidade, além de embasar estratégias de conservação.

## REFERÊNCIAS

- BEMVENUTI, C.E.; CAPITOLI, R.R.; GIANUCA, N.M. Estudos de ecologia bentônica na região estuarial da Lagoa dos Patos. II-Distribuição quantitativa do macrobentos infralitoral. *Atlântica*, v. 3, p. 23-32, 1978.
- CASTRO, J.W.A.; SENRA, M.C.E.; RAMOS, R.R.C. Coquinas da paleolaguna da Reserva Tauá-Pântano da Malhada, Cabo Frio, RJ. In: Winge, M. et al. (editores). *Sítios Geológicos e Paleontológicos 2*. Edição – Brasília. Serviço Geológico do Brasil -CPRM e Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos – SIGEP, 2009, Vol. (2). P. 269-276.
- CADEI, M.S.; PEREIRA, J.B.M.; MOURA, N. C. Educação Ambiental. In: Bastos, M; Callado, C.H. (editores). *O Ambiente da Ilha Grande*. Rio de Janeiro: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Estudos Ambientais e Desenvolvimento Sustentável- p. 471- 537, 2009.
- CAZZANIGA, N. J. Notas sobre hidróbidos argentinos. 5. Conquiliometría de *Littoridina parchappii* (D'Orbigny, 1835) (Gastropoda, Rissoidea) referida a su ciclo de vida en poblaciones australes. *Iheringia, Série Zoologia*, 61: 97-118, 1982.
- \_\_\_\_\_. *Strobelitatea*, a replacement name for *Strobeliella* Cazzaniga, 1981 (Gastropoda: Tateidae), non Nordsieck, 1977 (Gastropoda: Clausiliidae). *Zootaxa*, 4216 (2): 188-189, 2017.
- CHERRILL, A.J.; JAMES, A. The distribution and habitat preferences of four species of Hydrobiidae in East Anglia. *Journal of Conchology*, 32, 123, 1985.
- CHOMENKO, L.; SCHÄFER, A. Interpretação biogeográfica da distribuição do gênero *Littoridina* (Hydrobiidae) nas lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. *Amazoniana*: 9(1), 127-146, 1984.
- COLLADO, G.A.; MÉNDEZ, MA. Estrategias reproductivas y tipos de desarrollo en especies endémicas del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda: Cochliopidae) de Chile. *Amici Molluscarum*, Número especial: 67-72 pp., 2011.
- CONSELHO ESTADUAL DE RECURSOS HÍDRICOS -CERHI-RJ: Resolução nº 107 de 2013. Aprova nova definição das Regiões Hidrográficas do Estado do Rio De Janeiro e revoga a Resolução CERHI nº 18 de 08 de novembro de 2006. Rio de Janeiro, RJ, 2013.
- FENCHEL, T. Factors determining the distribution patterns of mud snails (Hydrobiidae). *Oecologia*, v. 20, n. 1, p. 1-17, 1975.
- FERNANDES, M.R.; MIYAHIRA, I.C.; CAETANO, C.H.S.; SALGUEIRO, F. The spreading of the invasive bivalve *Mytilopsis leucophaeata* (Dreissenidae) into estuaries of Rio de Janeiro, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (NO PRELO).
- FERNANDEZ, M.A.; THIENGO, S.C.; AMARAL, R.S. Técnicas Malacológicas. In: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica* -

Diretrizes e Técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Equistossomose (PCE). Editora do Ministério da Saúde, Brasília. p.54-58, 2008.

FIGUEIREDO-BARROS, M. P., LEAL, J. J., ESTEVES, F. D. A., ROCHA, A. D. M.; BOZELLI, R. L. Life cycle, secondary production and nutrient stock in *Heleobia australis* (d'Orbigny 1835) (Gastropoda: Hydrobiidae) in a tropical coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 69(1-2), 87-95, 2006.

GAILLARD C, CASTELLANOS ZA DE. Mollusca, Gasteropoda, Hydrobiidae. In: Ringuelet, RA editor. Fauna de agua dulce de la República Argentina. Buenos Aires: *Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC)*. 15(2): 1–39, 1976.

GONÇALVES, I.C.B. Estudo temporal de longo prazo da comunidade de moluscos límnicos em um riacho da Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil. 2015. 92f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

GONÇALVES, I.C.B.; MIYAHIRA, I.C.; SANTOS, S.B. Accidental Introductions of Freshwater Snails in an Insular Environment: A Case Study in Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil. *Tentacle*, 22: 13-16, 2014.

HERSHLER, R., THOMPSON, F.G. A review of the aquatic gastropod subfamily Cochliopinae (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Malacological Review*, Ann Arbor (5): 1-140, Supplement, 1992.

KOCH, E.; MARTIN, S.M.; CIOCCO, N.F. A molecular contribution to the controversial taxonomical status of some freshwater snails (Caenogastropoda: Rissosoidea, Cochliopidae) from the Central Andes desert to Patagonia. *Iheringia, Série Zoologia*, 105 (1): 69–75, 2015.

LANZER, R. M.; SCHÄFER, A. Fatores determinantes da distribuição de moluscos dulceaquícolas nas lagoas costeiras do Rio Grande do Sul. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 2, p. 649-675, 1988.

LANZER, R.M. & SCHÄFER, A. Padrões de distribuição de moluscos dulcícolas nas Lagoas Costeiras do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 45(4): 535-545, 1985.

LANA, P. D. C. Macrofauna bêntica de fundos sublitorais não consolidados da Baía de Paranaguá (Paraná). *Nerítica*, 1(3), 79-89, 1986.

MALONE, C.R. Killdeer (*Charadrius vociferus* Linnaeus) as a means of dispersal for aquatic gastropods. *Ecology*, v. 46, n. 4, p. 551-552, 1965.

MARCUS E.; MARCUS E. On Brazilian supratidal and estuarine snails. *Boletim da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Zoologia*, 25, 18–103, 1965.

NEVES, R.A.F; VALENTIN, J.L.; FIGUEIREDO, G.M. Morphological description of the gastropod *Heleobia australis* (Hydrobiidae) from egg to hatching. *Brazilian Journal of Oceanography* 58 (3): 247–250, 2010.

NEVES, R., ECHEVERRÍA, C. A.; PESSOA, L. A. Resposta da espécie *Heleobia australis* (Gastropoda: Hydrobiidae) a variações de salinidade e exposição a hidrocarbonetos. *Boletim do Laboratório de Hidrobiologia*, 24(2): 19-25, 2011.

PADIAL, J.M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 16, 2010.

PFEIFER, N.T.S.; PITONI, V.L.L. Análise qualitativa estacional da fauna de moluscos límnicos no Delta do Jacuí, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* (On-line), v. 11, n. 2, 2003.  
SANTOS, S.B.; MAGALHÃES-FRAGA, S.A.P.; BRAUN, B.S.; MOULTON, T.P. The first list of freshwater molluscs in the “Pedra Branca State Park”, Rio de Janeiro, Brazil. *Biociências*, 11(2): 185-186, 2003.

SANTOS, S.B.; RODRIGUES, C.R.; NUNES, G.K.M.; BARBOSA, A.B.; LACERDA, L.E.M.; MIYAHIRA, I.C.; VIANA, T.A.; OLIVEIRA, J.L.; FONSECA, F.C.; SILVA, P.S.C. Estado do Conhecimento da Fauna de Invertebrados Não-Marinhas da Ilha Grande (Angra dos Reis, RJ). *Oecologia Australis*, 14(2): 504-549, 2010.

SENRA, M.C.E.; DA SILVA, L.H.; CONDE, J.N.; IESPA, A.A.C. Microbioerosão em conchas de *Heleobia australis* (Gastropoda: Risssooidea) da lagoa Salgada, Rio de Janeiro, Brasil. *Anuário do Instituto de Geociências – UFRJ*. 29 (2): 199-209, 2006.

SIMÕES, S.B.E.; NEVES, R.F.C.; SANTOS, C.P. Life history of *Acanthocollaritrema umbilicatum* Travassos, Freitas and Bührnheim, 1965 (Digenea: Cryptogonimidae). *Parasitology Research*, 103: 523–528, 2008.

SIMÕES, S.B.E.; BARBOSA, H.S.; SANTOS, C.P. The life history of *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Digenea: Heterophyidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 106–111, 2009

SIMONE, L.R.L. *Land e Freshwater Molluscs of Brazil*. EGB, Fapesp, São Paulo. 390pp, 2006.

SILVA, M.C.P. DA; THOMÉ, J.W. Uma nova espécie *Heleobia* (Prosobranchia: Hydrobiidae) do “Rio” Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biologia* 45 (4): 515–534, 1985.

SILVA, M.c.p. da. Dados morfológicos de *Heleobia parchappei* (Orbigny, 1835) (Prosobranchia, Hydrobiidae, Littoridininae). *Iheringia*, Série Zoologia, 75, 81-87, 1993.

SILVA, M.C.P. da. Hydrobiidae (Gastropoda: Neotaenioglossa: Risssooidea) da planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Tese de Doutorado*, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 382 pp., 2003.

SILVA M.C.P DA, VEITENHEIMER-MENDES IL. Nova espécie de *Heleobia* (Risssooidea, Hydrobiidae) da planície costeira do sul do Brasil. *Iheringia*. Série Zoologia. 94 (1): 89–94, 2004.

SZAROWSKA, M.; HOFMAN, S.; OSIKOWSKI, A.; FALNIOWSKI, A. *Heleobia maltzani* (Westerlund, 1886) (Caenogastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) from Crete and species-level diversity of *Heleobia* Stimpson, 1865 in Europe. *Journal of Natural History* 48.41-42: 2487-2500, 2014.

THIENGO, S.B.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; STORTTI, M.A. A survey of gastropods in the Microrregião Serrana of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(Suppl. I): 233-234, 1998.

THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; GRAULT, C.E.; SILVA, H.F.R.; MATTOS, A.C.; SANTOS, S.B. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: I – Metropolitan mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (Suppl.): 177-184, 2001.

THIENGO, S.B.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; SANTOS, S.B.; MATTOS, A.C. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: II- Centro Fluminense Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 621-626, 2002a.

THIENGO, S.B.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; MAGALHÃES, M.G.; SANTOS, S.B. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: III- Baixadas Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(Suppl. I): 43-46, 2002b.

THIENGO, S.C.; MATTOS, A.C.; BOAVENTURA, M.F.; FERNANDEZ, M.A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: IV - Sul Fluminense mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 275-280, 2004.

THIENGO, S.C.; MATTOS, A.C.; SANTOS, S.B.; FERNANDEZ, M.A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: VI – Noroeste Fluminense Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(Suppl. I): 239-245, 2006.

TOMMASI, L.R. Observações sobre a fauna bêntica do complexo estuarino-lagunar de Cananéia (SP). *Boletim do Instituto Oceanográfico*, 19, 43-56, 1970.

VEITENHEIMER-MENDES, I.L.; LOPES-PITONI, V.L. Moluscos aquáticos atuais de ecossistemas costeiros em Imbituba, Imaruí e Laguna, Santa Catarina, Brasil: parâmetro de caracterização para paleoambientes. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, 12(2), 429-434, 1995.

VEITENHEIMER-MENDES, I.L.; LOPES-PITONI, V.L.; SILVA, M.D.; ALMEIDA-CAON, J.E.; SCHRÖDER-PFEIFER, N.T. Moluscos (Gastropoda e Bivalvia) ocorrentes nas nascentes do rio Gravataí, rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*, 73, 69-76, 1992.

**APÊNDICE** – Pontos de coleta amostrados neste estudo separado por Regiões Hidrográficas.

<b>P</b>	<b>Data</b>	<b>Longitude</b>	<b>Latitude</b>	<b>Município</b>	<b>Localidade</b>	<b>Sal.</b>
1	21/04/2018	-44.53973	-23.02203	Angra dos Reis	Rio Mambucaba	0%
2	21/04/2018	-44.54420	-23.01011	Angra dos Reis	Rio Mambucaba	0%
3	29/10/2001★	-44.52532	-23.02624	Angra dos Reis	Rio Mambucaba	salobro
4	21/04/2018	-44.53025	-23.01842	Angra dos Reis	Rio Perequê	0%
5	21/04/2018	-44.51366	-23.02428	Angra dos Reis	Rio do Engenho	salobro
6	26/06/2018	-44.16898	-23.14162	Angra dos Reis	Vila do Abraão, Ilha Grande	salobro
7	22/04/2018	-44.67449	-23.0516	Paraty	Rio Taquari	0%
8	22/04/2018	-44.67646	-23.04871	Paraty	Rio Taquari	0%
9	22/04/2018	-44.72425	-23.18496	Paraty	Várzea do Corumbê	0%
10	22/04/2018	-44.67840	-23.26829	Paraty	Rio Paraty-Mirim	0%
11	22/04/2018	-44.75830	-23.24094	Paraty	Rio Matheus Nunes	0%
12	23/04/2018	-44.59396	-23.04485	Paraty	Rio na praia de Tarituba	0%
13	23/04/2018	-44.59705	-23.04447	Paraty	Rio na praia de Tarituba	0%
14	23/04/2018	-44.64550	-23.04652	Paraty	Rio na Praia do Iriy	salobro
15	23/04/2018	-44.61808	-23.04313	Paraty	Rio São Gonçalo	salobro
16	08/11/2018★	-43.80007	-22.69054	Paracambi	Rio Guandu	0%
17	13/08/2010	-43.680257	-22.863754	Seropédica	Rio Guandu, Canal de São Francisco	0%
18	30/04/2018	-43.42415	-22.23761	Vassouras	Rio Paraíba do Sul, Andrade Pinto	0%
19	30/04/2018	-43.42162	-22.23185	Vassouras	Rio Paraíba do Sul	0%
20	30/04/2018	-43.52824	-22.07278	Rio das Flores	Rio Preto	0%
21	30/04/2018	-43.49417	-22.46832	Miguel Pereira	Lago do Javary	0%
22	21/07/2011●	-42.60460	-21.85434	Carmo	Barragem dos Pombos	0%
23	18/02/2018	-43.17752	-22.80999	Rio de Janeiro	Baía de Guanabara, Praia da Bandeira	salobro
24	16/11/2018	-43.14277	-22.70821	Magé	Baía de Guanabara, Praia de Mauá	20%
25	16/11/2018	-43.13197	-22.71474	Magé	Baía de Guanabara, Guia de Pacobaíba	22%
26	16/11/2018	-43.11220	-22.69328	Magé	Foz do Rio Suruí	0%

27	16/11/2018	-42.97815	-22.54190	Guapimirim	Rio Soberbo	0%
28	16/11/2018	-42.97726	-22.51058	Guapimirim	Rio Soberbo	0%
29	16/11/2018	-42.95419	-22.49521	Guapimirim	Rio na Caneca Fina	0%
30	16/11/2018	-43.11765	-22.65019	Magé	Rio Suruí	0%
31	01/06/2018	-43.25014	-23.00459	Rio de Janeiro	Lagoa de Marapendi	salobro
32	03/11/2011●	-42.95161	-22.71230	Itaboraí	Rio Caceribu	0%
33	19/07/2011●	-42.80919	-22.712328	Itaboraí	Afluente Rio Macacú	0%
34	19/07/2011●	-42.97341	-22.67466	Magé	Rio Macacu	0%
35	20/02/2005●	-42.95161	-22.71230	Rio de Janeiro	Praia de Araçatiba, Guaratiba	salobro
36	27/09/2015	-42.88710	-22.95035	Maricá	Lagoa de Maricá	10%
37	27/04/2016	-43.20268	-22.97415	Rio de Janeiro	Lagoa Rodrigo de Freitas	salobro
38	21/12/2016	-43.09727	-22.94971	Niterói	Lagoa de Piratininga	27%
39	21/12/2016	-42.82531	-22.89408	Maricá	Rio Caxito, Caxito	0%
40	21/12/2016	-43.04419	-22.96605	Niterói	Lagoa de Itaipu	30%
41	21/12/2016	-42.71273	-22.8955	Maricá	Córrego do Espreado	0%
42	17/06/2017	-42.71319	-22.95263	Maricá	Lagoa de Maricá, Ponta Negra	31%
43	17/06/2017	-42.71925	-22.91128	Maricá	Córrego Manuel Ribeiro	0%
44	10/01/2017	-41.99254	-22.52918	Casimiro de Abreu	Açude de pesca	0%
45	10/01/2017	-41.99632	-22.57412	Casimiro de Abreu	Rio São João	6%
46	11/01/2017	-41.91203	-22.77261	Búzios	Lagoa de Geribá	0%
47	11/01/2017	-41.89042	-22.77602	Búzios	Lagoa próxima a Praia da Ferradura	0%
48	11/01/2017	-41.89099	-22.77228	Búzios	Lagoas gêmeas	0%
49	11/01/2017	-41.88852	-22.76774	Búzios	Lagoa do dinossauro	0%
50	11/01/2017	-41.88653	-22.76389	Búzios	Lagoa da Ferradura	2%
51	11/01/2017	-41.88132	-22.75399	Búzios	Lagoa da Usina	2%
52	11/01/2017	-41.88001	-22.74636	Búzios	Lagoa dos Ossos	0%
53	11/01/2017	-41.89339	-22.75725	Búzios	Lagoa do Hotel Pérola	0%

54	15/06/2017	-42.40461	-22.93167	Saquarema	Canal que circunda a Lagoa Vermelha	43%
55	15/06/2017	-42.42435	-22.92019	Saquarema	Lagoa de Jacarepiá	5%
56	15/06/2017	-42.33502	-22.87457	Araruama	Lagoa de Araruama	<b>63%</b>
57	16/06/2017	-42.00128	-22.84905	Cabo Frio	Lagoa no Balneário Parque São Francisco	5%
58	16/06/2017	-42.03787	-22.92113	Arraial do Cabo	Lagoa Última	0%
59	16/06/2017	-42.03989	-22.93271	Arraial do Cabo	Lagoa da Restinga	0%
60	16/06/2017	-42.03155	-22.94930	Arraial do Cabo	Lagoa com captação de água	100%
61	16/06/2017	-42.02697	-22.96324	Arraial do Cabo	Parque Municipal Hermes Barcelos	0%
62	16/06/2017	-4203850	-22.93836	Arraial do Cabo	Lagoa do Foguete	0%
63	16/06/2017	-42.11266	-22.94346	Cabo Frio	Enseada dos Tucuns	64%
64	17/06/2017	-4263711	-2293339	Saquarema	Lagoa de Jaconé	33%
65	17/06/2017	-42.58361	-22.92785	Saquarema	Lagoa Marrecas	37%
66	17/06/2017	-4258361	-2238785	Saquarema	Lagoa de Saquarema	33%
67	17/06/2017	-42.52276	-22.92775	Saquarema	Lagoa de Saquarema	37%
68	17/06/2017*	-42.49285	-22.93177	Saquarema	Lagoa de Saquarema	37%
69	14/06/2000*	-42.01225	-22.64795	Cabro Frio	Tamoios	salobro
70	04/11/2017	-41.84090	-21.60345	São Fidélis	Rio Paraíba do Sul	0%
71	04/11/2017	-41.83706	-21.62782	São Fidélis	Rio Dois Rios	0%
72	09/11/2017	-41.78573	-22.33615	Macaé	Rio Macaé	0%
73	09/01/2017	-41.81278	-22.41101	Macaé	Lagoa de Imboassica	10%
74	09/01/2017	-41.83281	-22.38831	Macaé	Lagoa do Vale Encantado	0%
75	10/01/2017▲	-41.86065	-22.41880	Macaé	Rio Imboassica	0%
76	10/01/2017	-41.85543	-22.45397	Rio das Ostras	Rio no Mar do Norte	0%
77	10/01/2017	-41.91282	-22.50826	Rio das Ostras	Lagoa do Iriry	2%
78	10/01/2017	-41.95815	-22.50923	Rio das Ostras	Rio das Ostras	0%
79	10/01/2017	-41.88595	-22.48552	Rio das Ostras	Lagoa de Itapebussus	2%
80	10/01/2017	-41.93397	-22.53385	Rio das Ostras	Rio das Ostras	20%

81	09/01/2017	-41.65091	-22.19120	Carapebus	Canal na Estrada do Caxangá	0%
82	09/01/2017	-41.59176	-22.25014	Carapebus	Lagoa de Carapebus	0%
83	02/11/2017	-41.52583	-22.02739	Quissamã	Rio Macabú	0%
84	02/11/2017	-41.27557	-22.07158	Quissamã	Lagoa da Ribeira	0%
85	02/11/2017	-41.42492	-22.12729	Quissamã	Canal da Lagoa da Ribeira	0%
86	02/11/2017	-41.42492	-22.12729	Quissamã	Lagoa Feia, Farinha Seca	0%
87	02/11/2017	-41.33952	-21.94807	Campos dos Goytacazes	Lagoa Feia, Ponta Grossa dos Fidalgos	0%
88	02/11/2017	-41.13939	-22.09208	Quissamã	Barra do Furado	35%
89	02/11/2017	-41.08363	-22.05956	Campos dos Goytacazes	Lagamar, Farol de São Thomé	35%
90	03/11/2017	-41.18256	-21.72511	São João da Barra	Rio Paraíba do Sul	0%
91	03/11/2017	-41.02691	-21.70012	São João da Barra	Lagoa do Grussaí	7%
92	03/11/2017	-41.02691	-21.73763	São João da Barra	Lagoa de Iquipari	18%
93	03/11/2017	-41.32994	-21.72088	Campos dos Goytacazes	Lagoa do Centro	0%
94	03/11/2017	-41.13924	-21.66565	Campos dos Goytacazes	Lagoa na RJ 194	0%
95	03/11/2017	-41.06327	-21.57700	São Francisco de Itabapoana	Canal do Rio Paraíba do Sul	12%
96	03/11/2017	-41.06036	-21.57479	São Francisco de Itabapoana	Lagoa	3%
97	03/11/2017	-41.05811	-21.57454	São Francisco de Itabapoana	Lagoa do Gargaú	12%
98	03/11/2017	-40.96254	-21.31163	São Francisco de Itabapoana	Manguezal	35%
99	04/11/2017	-41.61839	-21.49022	Cardoso Moreira	Rio Muriaé	0%
100	04/11/2017	-41.38092	-21.66018	Campos dos Goytacazes	Rio Muriaé	0%
101	04/11/2017	-41.53592	-21.67899	Campos dos Goytacazes	Morangaba, Rio Preto	0%
102	04/11/2017	-41.53453	-21.76919	Campos dos Goytacazes	Lagoa de Cima	0%
103	25/07/2006*	-42.02806	-21.61907	Cambuci	Três Irmãos	0%
104	01/12/2003*	-42.145733	-21.578733	Santo Antônio de Pádua	Rio Pomba	0%

Legenda: Cada cor representa uma Região Hidrográfica: RHI: amarelo; RHII: verde escuro; RHIII: verde claro; RHIV: vermelho; RHV: azul; RHVI: rosa; RHVII: salmão; RHVIII: laranja; RHIX: cinza. Cada símbolo ao lado da data representa um local de consulta para complementação dos dados. ▲ Figueredo-Barros et al. (2006); ★ CMIOC; ● ColMolUERJ.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O gênero *Heleobia* está envolto em problemas taxonômicos, dos quais o presente trabalho aborda uma parte, contribuindo para o seu melhor conhecimento. Durante os últimos dez anos, os estudos envolvendo *Heleobia* se concentraram na Argentina e no Chile, e em menor parte na Europa. O estudo atual retoma os estudos sobre as espécies do Brasil, incluindo informações de biologia molecular, até então inéditas.

Na primeira categoria: “Uma nova espécie de *Heleobia* (Truncatelloidea: Cochliopidae) para o estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil”, trouxemos a descrição de uma nova espécie de *Heleobia* da Ilha Grande (RJ) que previamente havia sido reportada como *H. australis*. Destacamos a utilização de ferramenta integrativas, além de análise criteriosa de material de coleções científicas na identificação das espécies deste gênero.

Na segunda categoria: “*Heleobia australis* (Truncatelloidea: Cochliopidae) na América do Sul: uma espécie de ampla distribuição ou três espécies locais?”, discutimos sobre a validade das espécies, *H. australis* e *H. isabelleana*; e a as subespécies, *H. australis australis* e *H. australis nana*, que haviam sido consideradas válidas em estudos prévios. Nossos resultados com base em estudos morfológicos e moleculares, indicaram a similaridade entre essas espécies e subespécies, indicando serem sinônimas.

Na terceira categoria: “Comparação morfológica e molecular entre *Heleobia davisi* Silva e Thomé, 1985 e *Heleobia robusta* Silva e Veitenheimer-Mendes, 2004 (Truncatelloidea: Cochliopidae)”, foram comparadas pela primeira vez os aspectos morfológicos e moleculares, sendo percebida grande similaridade entre elas, possivelmente se tratando da mesma entidade biológica. Além do mais, a posição sistemática dentro do gênero *Heleobia* é duvidosa, devido as grandes distâncias genéticas, contudo ainda carecendo de mais estudos para solução desse problema.

No quarto capítulo: “Diversidade e distribuição geográfica de *Heleobia* Stimpson, 1865 (Gastropoda: Cochliopidae) para o estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil”, apresentamos a diversidade de *Heleobia* no estado do Rio de Janeiro, incluindo a descoberta de mais três novas espécies. No total são apresentadas seis espécies, que ocorrem em oito regiões hidrográficas do estado. A maior diversidade foi anotada para RH I – Baía da Ilha Grande, RH V – Baía de Guanabara e RH IX – Baixo Paraíba do Sul e Itabapoana, reportando quatro espécies cada. Enquanto o maior número de registros foi na Região Hidrográfica VI – Lagos São João, com 21 ocorrências divididas em duas espécies.

Desta forma, percebemos a carência de estudos de *Heleobia* para o Brasil e América do Sul, havendo a necessidade de se aprofundar o conhecimento. Muitas espécies ainda carecem de descrições e comparações detalhadas, tanto do ponto de vista morfológico quanto molecular. A falta de conhecimento da identidade das espécies se reflete em uma carência dos demais tipos de estudos. Portanto, ainda há lacunas a serem preenchidas no conhecimento desse gênero.

A taxonomia integrativa se mostrou eficaz nos estudos em *Heleobia*, afirmando sua importância na junção de diferentes aspectos de uma espécie.

## CONCLUSÕES

Fica registrada uma espécie ainda não descrita de *Heleobia* para um riacho da Ilha Grande, em Angra dos Reis, Rio de Janeiro;

É proposta a sinonímia de *H. australis australis*, *H. australis nana* e *H. isabelleana* com *H. australis*;

Propõe-se que *H. robusta* seja considerada sinônima de *H. davisi*, além de possivelmente estarem alocadas em um gênero distinto;

A diversidade de *Heleobia* no estado do Rio de Janeiro abrange seis espécies, sendo três ainda não conhecidas para a ciência;

O conhecimento acerca de *Heleobia* no estado do Rio de Janeiro e demais regiões do Brasil ainda é insuficiente carecendo de estudos de cunho taxonômico, sistemático e ecológico, que devem ser realizados no futuro visando o conhecimento e conservação deste grupo de moluscos.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, H.; A. ADAMS. The Genera of Recent Mollusca; Arranged according to their Organization. London: John van Voorst, 1853–1858.
- AGUIRRE, M.L.; FARINATI, E.A. Aspectos sistemáticos, de distribución y paleoambientales de *Littoridina australis* (d'Orbigny, 1835) (Mesogastropoda) en el Cuaternario marino de Argentina (Sudamerica). *Geobios*, 33, 5: 569-597, 2000.
- AGUIRRE, M.L.; URRUTIA, M.I. Morphological variability of *Littoridina australis* (d'Orbigny, 1835) (Hydrobiidae) in the Bonaerensian marine Holocene (Argentina). Palaeogeography, Palaeoclimatology, *Palaeoecology*, 183 (1): 1–23, 2002.
- AGUIRRE, M.L.; ZANCHETTA, G.; FALLICK, A.E. Stable isotope composition of *Littoridina australis* from the coast of Buenos Aires province, Argentina, during Holocene climatic fluctuations. *Geobios*, 35 (1): 79–88, 2002.
- BAVAY, A. Mission de Créqui-Montfort et Sénéchal de la Grange em Amérique du Sud Mollusques terrestres et fluviatiles récoltés par le Dr. Neveu-Lemaire. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, Paris, 29: 152-156, 1904.
- BIELER, R. "Gastropod phylogeny and systematics". *Annual Review of Ecology and Systematics*. 23: 311–338, 1992.
- \_\_\_\_\_. "Haszprunar's "clado-evolutionary" classification of the Gastropoda - a critique". *Malacologia*. 31 (2): 371–380, 1990.
- BOUCHET, P. 1996. *Littoridina gaudichaudi*. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/12243/3329108>. Dados de 17 de Novembro de 2019.
- BOUCHET, P.; ROCROI, J.P. *Classification and Nomenclator of Gastropods Families*. v. 47: 1-2, 2005.
- BOURGUIGNAT, J.R. Étude sur les noms génériques des petites Paludiniées à opercule spirescent, suivie de la description du nouveau genre "Horatia". *Vve Tremblay*, 1887.
- CAZZANIGA, N.J. Notas sobre Hidrobidos Argentinos. I (Gastropoda Rissoidea) acerca de *Littoridina occidentalis* (doering, 1884). *Neotropica*, 26 (76), 187-191, 1980.
- \_\_\_\_\_. Notas sobre Hidrobidos Argentinos III (Gastropoda Rissoidea). III. *Strobiliella*, un nuevo género de la Patagonia. *Neotropica* 27(77): 3–10, 1981.
- \_\_\_\_\_. *Heleobia* Stimson 1865: Taxonomia. In: Cazzaniga NJ, editor. El género *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) en América del Sur. *Amici Molluscarum*, Número especial: 12- 18, 2001.
- \_\_\_\_\_. *Strobilitatea*, a replacement name for *Strobiliella* Cazzaniga, 1981 (Gastropoda: Tateidae), non Nordsieck, 1977 (Gastropoda: Clausiliidae). *Zootaxa*, 4216 (2): 188-189, 2017.

COLGAN, D.J., PONDER, W.F., BEACHAM, E.; MACARANAS, J. Molecular phylogenetics of Caenogastropoda (Gastropoda: Mollusca). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(3): 717-737, 2007.

COLLADO, G.A. A new freshwater snail (Caenogastropoda: Cochliopidae) from the Atacama Desert, northern Chile. *Zootaxa*, 3925(3), 445-449, 2015.

\_\_\_\_\_. Out of New Zealand: molecular identification of the highly invasive freshwater mollusk *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) in South America. *Zoological Studies*, 53(1): 70, 2014.

\_\_\_\_\_; MÉNDEZ, M.A.; LETELIER, S.L.; VÉLIZ, D.; SABANDO, M.C. Morfología peniana y taxonomía de especies chilenas del género *Heleobia* Stimpson, 1865 (Caenogastropoda: Cochliopidae) junto a una revisión de los ejemplares tipo del Museo Nacional de Historia Natural de Chile. *Amici Molluscarum*, 19: 49-58, 2011.

\_\_\_\_\_; VALLADARES, M.A.; MÉNDEZ, M.A. Hidden diversity in spring snails from the Andean Altiplano, the second highest plateau on Earth, and the Atacama Desert, the driest place in the world. *Zoological Studies* 52:1-13, 2013

\_\_\_\_\_; VALLADARES, M.A.; MÉNDEZ, M.A. Unravelling cryptic species of freshwater snails (Caenogastropoda, Truncatelloidea) in the Loa River basin, Atacama Desert. *Systematics and Biodiversity*, 14:417-429, 2016a.

\_\_\_\_\_; VALLADARES, M.A.; MÉNDEZ, M.A. A new species of *Heleobia* (Caenogastropoda: Cochliopidae) from the Chilean Altiplano. *Zootaxa*, 4137(2): 277-280, 2016b.

\_\_\_\_\_; VIDAL, M. A.; AGUAYO, K. P.; MÉNDEZ, M. A.; VALLADARES, M. A.; CABRERA, F. J.; PUILLANDRE, N. Morphological and molecular analysis of cryptic native and invasive freshwater snails in Chile. *Scientific Reports*, 9(1): 1-11, 2019.

CORSI, A.F. Moluscos de la Republica Oriental del Uruguay. *Anales del Museo Nacional de Montevideo*, Montevideo (2): 237pp., 1901.

COX, L.R. Thoughts on the classification of the Gastropoda. *Journal of Molluscan Studies*: v. 33, n. 6, p. 239-261, 1960.

CRISCIONE, F.; PONDER, W.F. A phylogenetic analysis of rissooidean and cingulopsoidean families (Gastropoda: Caenogastropoda). *Molecular phylogenetics and evolution*, 66(3): 1075-1082, 2013.

d'ORBIGNY, A. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, in suo per Americam Meridionalem itinere. *Magasin de Zoologie*, Paris. 5 (61/62): 1-44, 1835.

\_\_\_\_\_. 1840. In: d'Orbigny A. 1834–1847. Voyage dans l'Amérique Méridionale exécuté pendant les années 1826-1833. 3<sup>a</sup> Partie: Mollusques. P.Bertrand, Paris. XLIX+758p.

DAVIS, G.M., MAZURKIEWICZ, M., MANDRACCHIA, M. *Spurwinkia*: Morphology, systematics, and ecology of a new genus of North American marshland Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda). *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 134: 143–177, 1982.

DE FRANCESCO, C.G. Las limitaciones a la identificación de especies de *Heleobia* Stimpson, 1865 (Gastropoda: Rissosoidea) en el registro fósil del Cuaternario tardío y sus implicancias paleoambientales. *Ameghiniana*, 44(3), 631-635, 2007.

DE FRANCESCO, C.G.; ISLA, F.I. The life cycle and growth of *Heleobia australis* (D'Orbigny, 1835) and *H. conexa* (Gaillard, 1974) (Gastropoda: Rissosoidea) in Mar Chiquita coastal lagoon (Argentina). *Journal of Molluscan Studies*, 70(2), 173-178, 2004.

DOERING, A. Apuntes sobre la fauna de moluscos de la República Argentina. *Boletín de la Academia nacional de Ciencias en Córdoba*. 7: 457-474, 1884.

DOLLFUS, G. E. Recherches critiques sur quelques genres ou espèces d'*Hydrobia* vivants ou fossiles. - *Journal de Conchyliologie*, 59 (3), 179-270, T. 4-6, 1912.

ETCHEGOIN, J.A.; MERLO, M.J. *Heleobia conexa* y *H. australis* como bioindicadores de fauna y de fluctuaciones ambientales en la laguna Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). *Amici Molluscarum*, Número especial: p. 33-35, 2011.

FAURBY, S.; EISERHARDT, W.L.; SVENNING, J.C. Strong effects of variation in taxonomic opinion on diversification analyses. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(1), 4-13, 2016.

FIGUEIREDO-BARROS, M.P.; LEAL, J.J.F.; ESTEVES, F.A.; ROCHA, A.M.; BOZELLI, R.L. Life cycle, secondary production and nutrient stock in *Heleobia australis* (d'Orbigny, 1835) (Gastropoda: Hydrobiidae) in a tropical coastal lagoon. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 69, 87-95, 2006.

FRANSOZO, A.; NEGREIROS-FRANSOZO, M.L. (Eds.) *Zoología dos Invertebrados*. Rio de Janeiro: Roca, 661 p., 2016.

GAILLARD, C.; CASTELLANOS, Z.A. DE. Mollusca, Gasteropoda, Hydrobiidae. In: Ringuelet, RA editor. *Fauna de agua dulce de la República Argentina*. Buenos Aires: Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura (FECIC). 15(2), 1–39, 1976.

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

HAAS, F. On non-marine shells from Northeastern Brazil and Peru. *Fieldiana (Zoology)* 37:303-337, 1955.

HASZPRUNAR, G. "On the origin and evolution of major gastropod groups, with special reference to the Streptoneura". *Journal of Molluscan Studies* 54 (4): 367–441, 1988.

HERSHLER, R., THOMPSON, F.G. A review of the aquatic gastropod subfamily Cochliopinae (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Malacological Review*, Ann Arbor (5): 1-140, Supplement, 1992.

HICKMAN JR, C.P.; ROBERTS, L.S.; KEEN, L.S., EISENHOUR, D.J.; LARSON, A.; L'ANSON, H. *Princípios integrados de Zoologia*. 15ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2013.

IHERING, H.V. Die Gattung *Paludestrina*. *Nachr. Bl. dtsh. malakol. Ges*, 27(7/8): 122-128, 1895.

KOCH, E.; MARTIN, S.M.; CIOCCO, N.F. A molecular contribution to the controversial taxonomical status of some freshwater snails (Caenogastropoda: Rissosoidea, Cochliopidae) from the Central Andes desert to Patagonia. *Iheringia*, Série Zoologia, 105 (1): 69–75, 2015.

KOHN, A.J.; PALMER, A.R.; SHIMEK, R.L. Phylum Mollusca, Class Gastropoda, Subclass Prosobranchia. In: STRATHMANN, M. F. (Ed.). *Reproduction and development of marine invertebrates of the Northern Pacific Coast: Data and methods for the study of eggs, embryos, and larvae*. Washington: University of Washington Press. p. 220- 267, 1987.

KROLL, O., HERSHLER, R.; ALBRECHT, C.; TERRAZAS, E.M.; APAZA, R.; FUENTEALBA, C., WOLFF, C.; WILKE, T. The endemic gastropod fauna of Lake Titicaca: Correlation between molecular evolution and hydrographic history. *Ecology and Evolution*, 2 (7): 1517–1530, 2012.

LYDEARD, C. et al. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*, v. 54 (4): 321-330, 2004.

MARCUS, E.; MARCUS, E. On Brazilian supratidal and estuarine snails. *Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras*. 25:19-82, 1865.

NEVES, R.A.F.; VALENTIN, J.L.; FIGUEIREDO, G.M. Morphological description of the gastropod *Heleobia australis* (Hydrobiidae) from egg to hatching. *Brazilian Journal of Oceanography*. 58 (3): 247–250, 2010.

\_\_\_\_\_; VALENTIN, J.L.; FIGUEIREDO, G.M. First record of imposex in *Heleobia australis* (Caenogastropoda: Cochliopidae). *Journal of Molluscan Studies*, v. 79, n. 1, p. 82–85, 2013.

d'ORBIGNY, A. Synopsis terrestrium et fluviatilium molluscorum, in suo per Americam Meridionalem itinere. *Magasin de Zoologie Paris*. 5 (61/62): 1-44, 1835.

d'ORBIGNY, A. In: d'Orbigny A. 1834–1847. *Voyage dans l'Amérique Méridionale exécuté pendant les années 1826-1833*. 3ª *Partie: Mollusques*. P. Bertrand, Paris. XLIX+758p., 1840.

OSCA, D.; TEMPLADO, J.; ZARDOYA, R. Caenogastropod mitogenomics. Molecular phylogenetics and evolution 93:118–28, 2015

PADIAL, J.M.; MIRALLES, A.; DE LA RIVA, I.; VENCES, M. The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 16, 2010.

PARODIZ, J.J. La validez del nombre *Paludestrina* d'Orbigny 1839. *Neotropica*, 1(6), 95-96, 1955.

PILSBRY, H.A. South American land and freshwater Mollusks: Notes and descriptions. I. Mollusks of Lake Titicaca. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, Philadelphia, 76: 49-54, 1924.

PILSBRY, H.A. Non-marine Mollusca of Patagonia. *Reports of the Princeton University Expeditions to Patagonia*, 1896-1899, Stuttgart, 3 (5): 513-633, 1911.

PILSBRY, H.A. South American land and freshwater Mollusks: Notes and descriptions. I. Mollusks of Lake Titicaca. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, Philadelphia, 76: 49-54, 1924.

PONDER, W.; LINDBERG, D. Towards a phylogeny of gastropod molluscs; an analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 119: 83-265, 1997.

PONDER, W.; LINDBERG, D. *Phylogeny and evolution of the Mollusca*. Londres. University of Carolina Press. 469p, 2008.

PRIMACK, R.B.; RODRIGUES, E. *Biologia da Conservação*. Editora Vida, 382p, 2001.

ROSENBERG, G. A new critical estimate of named species-level diversity of the recent Mollusca. *American Malacological Bulletin*, 32(2), 308-323, 2014.

RUMI, A.; GREGORIC, D.E.G.; NÚÑEZ, V.; DARRIGRAN, G.A. Malacología Latinoamericana: Moluscos de agua dulce de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 56(1), 77-111, 2008.

SANTOS, S.B.; MAGALHÃES-FRAGA, S.A.P.; BRAUN, B.S.; MOULTON, T.P. The first list of freshwater molluscs in the “Pedra Branca State Park”, Rio de Janeiro, Brazil. *Biociências* 11(2): 185-186, 2003.

\_\_\_\_\_; RODRIGUES, C.R.; NUNES, G.K.M.; BARBOSA, A.B.; LACERDA, L.E.M.; MIYAHIRA, I.C.; VIANA, T.A.; OLIVEIRA, J.L.; FONSECA, F.C.; SILVA, P.S.C. Estado do Conhecimento da Fauna de Invertebrados Não-Marinhas da Ilha Grande (Angra dos Reis, RJ). *Oecologia Australis*, 14(2): 504-549, 2010.

SENRA, M.C.E.; SILVA, E.; SILVA, L.H. DA; CONDE, J.N.; IESPA, A.A.C. Microbioerosão em conchas de *Heleobia australis* (Gastropoda: Rissoidae) da lagoa Salgada, Rio de Janeiro, Brasil. *Anuário do Instituto de Geociências*: 29 (2): 199-209, 2006.

SILVA, M.C.P. da. Hydrobiidae (Gastropoda: Neotaenioglossa: Rissoidae) da planície costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. *Tese de Doutorado*, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 382 pp, 2003.

SILVA, M.C.P. da, VEITENHEIMER-MENDES, I.L. Nova espécie de *Heleobia* (Rissoidae, Hydrobiidae) da planície costeira do sul do Brasil. *Iheringia. Série Zoologia*. 94 (1): 89-94, 2004.

\_\_\_\_\_; THOMÉ, J.W. Uma nova espécie *Heleobia* (Prosobranchia: Hydrobiidae) do “Rio” Guaíba, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biologia* 45 (4): 515–534, 1985.

SIMÕES, S.B.E.; NEVES, R.F.C.; SANTOS, C.P. Life history of *Acanthocollaritrema umbilicatum* Travassos, Freitas and Bührnheim, 1965 (Digenea: Cryptogonimidae). *Parasitology research*: 103: 523–528, 2008.

SIMÕES, S.B.E.; BARBOSA, H.S.; SANTOS, C.P. The life history of *Pygidiopsis macrostomum* Travassos, 1928 (Digenea: Heterophyidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 106–111, 2009.

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

SIMONE, L.R.L. Phylogeny of the Caenogastropoda (Mollusca), based on comparative morphology. *Arquivos de Zoologia*, v. 42, n. 4, p. 161–323, 2011.

SOULEYET, M. Genre *Littoridina*. In: Souleyet M., Eydoux. Voyage autour du Monde executé pendant les anes 1836 et 1837 sur la corvette La Bonite commandée par M. Vaillant. *Zoologie* 2:563-565, estampa 31 e 32, 1852. [Nota: as estampas foram publicadas em 1841]

STIMPSON, W. Researches upon the Hydrobiinae and allied forms; chiefly made upon materials in the Museum of the Smithsonian Institution. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 201: 1–59, 1865.

STROBEL, P. Materiali per una Malacostatica di terra e di acqua dolce dell’Argentina Meridionale. *Biblioteca Malacologica*, Pisa, 4: V-LXXX + 3-105, estampa 1-2, 1874.

STRONG, E.E.; GARGOMINY, O.; PONDER, W.F.; BOUCHET, P. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* 595 (1): 149–166, 2008.

SZAROWSKA, M.; HOFMAN, S.; OSIKOWSKI, A.; FALNIOWSKI, A. *Heleobia maltzani* (Westerlund, 1886) (Caenogastropoda: Truncatelloidea: Cochliopidae) from Crete and species-level diversity of *Heleobia* Stimpson, 1865 in Europe. *Journal of Natural History* 48.41-42: 2487-2500, 2014.

THIELE, J. 1929-1935. Handbuch der systematischen Weichtierkunde. Jena: Fischer, 1154p.

THIENGO, S.C.; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F. STORTTI, M.A. A survey of gastropods in the Microrregião Serrana of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(Suppl. I): 233-234, 1998.

\_\_\_\_\_; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; GRAULT, C.E.; SILVA, H.F.R.; MATTOS, A.C.; SANTOS, S.B. Freshwater snails and schistosomiasis *mansoni* in the state of Rio de Janeiro, Brazil: I – Metropolitan mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (Suppl.): 177-184, 2001.

\_\_\_\_\_; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; SANTOS, S.B.; MATTOS, A.C. 2002a. Freshwater snails and schistosomiasis *mansoni* in the state of Rio de Janeiro, Brazil: II- Centro Fluminense Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97: 621-626.

\_\_\_\_\_; FERNANDEZ, M.A.; BOAVENTURA, M.F.; MAGALHÃES, M.G.; SANTOS, S.B.; Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: III-Baixas Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97(Suppl. I): 43-46, 2002b.

\_\_\_\_\_; MATTOS, A.C.; BOAVENTURA, M.F.; FERNANDEZ, M.A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: IV - Sul Fluminense mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99: 275-280, 2004.

\_\_\_\_\_; MATTOS, A.C.; SANTOS, S.B.; FERNANDEZ, M.A. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: VI – Noroeste Fluminense Mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(Suppl. I): 239-245, 2006.

TROSCHER, F.H. Das Gebiss der schnecken zur Begründung einer natürlichen classification (Vol. 1). *Nicolaische Verlagsbuchhandlung*, 252p, 1856-1863.

WILKE, T.; DAVIS, G.M.; FALNIOWSKI, A.; GIUSTI, F.; BODON, M.; SZAROWSKA, M. Molecular systematics of Hydrobiidae (Mollusca: Gastropoda: Rissooidea): testing monophyly and phylogenetic relationships. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 151(1), 1-21, 2001.

WORMS, 2019. Caenogastropoda: Classification of Littorinimorpha. Disponível em: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=382213> Acesso em 17 de novembro de 2019.

ZARGES, C.V. "Estado de conocimiento de los gastrópodos dulceacuícolas de Chile." *Gayana (Concepción)* 70(1): 88-95, 2006.