Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Luiz Eduardo Macedo de Lacerda

Revisão do gênero Neotropical *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 (Mollusca, Pulmonata, Basommatophora, Planorboidea, Ancylidae): morfologia, distribuição geográfica, sistemática e filogenia

Rio de Janeiro

2015

Luiz Eduardo Macedo de Lacerda

Revisão do gênero Neotropical *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 (Mollusca, Pulmonata, Basommatophora, Planorboidea, Ancylidae): morfologia, distribuição geográfica, sistemática e filogenia

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Sonia Barbosa dos Santos

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/A

L247 Lacerda, Luiz Eduardo Macedo.
Revisão do gênero Neotropical *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 (Mollusca, Pulmonata, Basommatophora, Planorboidea, Ancylidae): morfologia, distribuição geográfica, sistemática e filogenia / Luiz Eduardo Macedo de Lacerda. - 2015.

262 f. : il.

Orientadora: Sonia Barbosa dos Santos.
Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.
Bibliografia: f. 237-249.

1. Ancilídeo – Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 2. Ancilídeo – Morfologia - Teses. 3. Molusco – Teses. I. Santos, Sonia Barbosa dos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes. III. Título.

CDU 594.38(815.3)

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Luiz Eduardo Macedo de Lacerda Data

Luiz Eduardo Macedo de Lacerda

Revisão do gênero Neotropical *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 (Mollusca, Pulmonata, Basommatophora, Planorboidea, Ancylidae): morfologia, distribuição geográfica, sistemática e filogenia

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Evolução, do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2015

Orientadora:

Prof.ª Dra. Sonia Barbosa dos Santos
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

_____
Prof. Dra. Lena Geise
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

_____
Prof.ª Dra. Silvana Aparecida Rogel Carvalho Thiengo
Instituto Oswaldo Cruz

_____
Prof.ª Dra. Dayse Aparecida da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

_____
Prof. Dr. Paulo Cesar de Paiva
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2015

DEDICATÓRIA

Dedico a todas as pessoas que tentam contribuir para a ampliação do conhecimento científico.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Sonia Barbosa dos Santos, pelo suporte, incentivo e amizade cultivada ao longo desses anos.

À minha família, Sueli, Luiza e Gleisse Kelly pelo conforto, carinho, apoio e amor ao longo da minha jornada acadêmica. Em especial para a mais nova integrante Ágatha, seja bem-vinda. Aos meus familiares pelo incentivo.

A toda equipe do Laboratório de Malacologia da UERJ: Amilcar Brum Barbosa, Caroline S. Richau, Gleisse Kelly Meneses Nunes, Igor Christo Miyahira, Isabela Cristina B. Gonçalves, Mariana Castro, Jaqueline Lopes de Oliveira, Jessica Beck, Regiana Salgado, Renata Ximenes, Renata Maia, Roberta Roza, Sérgio Vieira, Thainá Felicissimo e Vitor (Kiko). Pessoal, muito obrigado. Sem vocês o trabalho que será apresentado não teria saído. O que seria desse trabalho sem os coletores de ouro, as moleculetes, os cafezinhos e o bom humor de todos os integrantes desse laboratório.

Falando em laboratório não posso deixar de agradecer a todos os integrantes do Laboratório de Diagnóstico por DNA (LDD-UERJ) que me receberam e me abriram a porta para um ramo da biologia até então obscuro para mim, o da biologia molecular. Graças a vocês prof. Dayse, Elizeu, João, Saulo, Anna, Cesar (Chuck), Cleyton, Vanusca, Holly, Januzzi, Silvia, Andreia, Fernanda, Juliana e tantas outras pessoas que tive a oportunidade de conviver, compartilhar da experiência de laboratório e aprender a executar todas as etapas desda extração até o sequenciamento dos meus pequenos ancilídeos. Muito obrigado.

Aos pesquisadores que me recepcionaram e ajudaram nas visitas as coleções das suas respectivas instituições: Dr. Alexandre Dias Pimenta do Museu Nacional do Rio de Janeiro, Drª. Silvana C. Thiengo da Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Dr. Carlo Magenta e Dr. Luis Ricardo Simone do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Dr. Gustavo Darrigran e Mônica Tassara do Museu de La Plata.

Além dos pesquisadores que gentilmente me enviaram material por empréstimo ou doações: Ingrid Heydrich do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, Dra. Claudia Callil da Universidade de Mato Grosso, Dra. Stephane Dávila da Universidade Federal de Juiz de Fora.

À Profª Drª.Valéria Gallo do Departamento de Zoologia da UERJ por me fornecer um suporte crucial para que eu pudesse dar o primeiro mergulho no mundo prático da Análise Cladística. Amilcar obrigado pela ajuda nesse contexto.

À Drª. Ximena Ovando pelas discussões produtivas e definições dos caracteres utilizados na Análise Cladística.

À Profª Lena por ter aceitado o convite para ser revisora desta tese e por suas valiosas contribuições.

À Profª Drª. Lena Geise, à Profª Drª. Dayse Aparecida da Silva, à Profª Drª. Silvana C. Thiengo, à Drª. Ximena Ovando, ao Prof. Dr. Paulo Paiva, e ao Prof. Dr. Henrique Caetano obrigado por aceitarem o convite para participar da banca e compartilhar um pouco do conhecimento e experiência de vocês.

A todos os meus professores que foram sempre grandes educadores e incentivadores.

Aos funcionários do Departamento de Zoologia e da Secretaria do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UERJ, do Museu Nacional e aos técnicos Alan Moraes e a Amanda Garcez da Veiga pelo auxílio técnico na aquisição das imagens por microscopia eletrônica de varredura. Alan obrigado pelas metalizações de sempre.

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

Ao Henrique Garcia, Abraão e a Sonia (Soninha) da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da UERJ. Muito obrigado por toda ajuda prestada a tempo e a hora e parabéns pela eficiência de sempre.

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro e ao Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes pela infra-estrutura proporcionada pela realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida no âmbito do Programa de Capacitação em Taxonomia (Protax).

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho. Muito obrigado a todos e me perdoe caso eu tenha esquecido de você.

RESUMO

LACERDA, Luiz Eduardo Macedo. **Revisão do gênero Neotropical *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 (Mollusca, Pulmonata, Basommatophora, Planorboidea, Ancylidae):** morfologia, distribuição geográfica, sistemática e filogenia. 2015. 262f.: il. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Gundlachia Pfeiffer 1849 é o gênero de molusco de água doce pateliforme com a mais ampla distribuição geográfica dentre os oito gêneros de Ancylidae assinalados para a região Neotropical. A concha pateliforme, considerada uma homoplasia por diversos autores em vários basomatóforos, tem sido historicamente utilizada para definir a unidade da família Ancylidae, apesar dos questionamentos contrários à monofilia do grupo. Dados moleculares confirmaram que "Ancylidae" é um grupo parafilético, principalmente por causa do gênero *Burnupia*. Os demais gêneros foram incluídos em Ancylinae, dentro de Planorbidae. No entanto, a ausência de todos os gêneros Neotropicais nas filogenias propostas, com base molecular ainda é um assunto que necessita ser investigado. Os principais objetivos desse trabalho foram: (a) revisar as espécies de *Gundlachia*, através de estudos morfológicos das conchas e partes moles; (b) padronizar as descrições das espécies para iniciar uma análise cladística do gênero *Gundlachia*; (c) iniciar um estudo de biologia molecular utilizando distintas espécies de representantes de Ancylinae, para verificar as suas interrelações e o provável grupo-irmão de *Gundlachia*; (d) e por fim, construir um mapa de distribuição geográfica. Para isso, examinamos diversas coleções científicas e realizamos coletas nas localidades-tipo. A morfologia das conchas foi comparada por análises morfométricas e por microscópio de luz e de varredura. As partes moles dos espécimes foram dissecadas e estudadas sob o microscópio estereoscópico. A análise molecular foi realizada em três espécimes de cada amostra, utilizando os genes da citocromo c oxidase I e o 16S mtDNA. Após o sequenciamento verificamos as distâncias genéticas entre as diferentes espécies de *Gundlachia* e as suas relações com os outros gêneros por meio do teste *Neighbor-joining* e *Maximum likelihood*. Com esse estudo apresentamos a redescrição de algumas espécies de *Gundlachia*, discutimos a validade de novos táxons descobertos e sequenciamos e analisamos espécies de sete gêneros de Ancylinae que ocorrem na região Neotropical. Com base nesses dados discutimos a monofilia de *Gundlachia* e o seu provável grupo-irmão. E ainda abordamos a validade dos demais gêneros neotropicais.

Palavras-chave: Ancylinae. Análise molecular. Moluscos límnicos. América do Sul.

ABSTRACT

LACERDA, Luiz Eduardo Macedo. **Revisão do gênero Neotropical *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 (Mollusca, Pulmonata, Basommatophora, Planorboidea, Ancylidae):** morfologia, distribuição geográfica, sistemática e filogenia. 2015. 262f.: il. Tese (Doutorado em Ecologia e Evolução) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Gundlachia Pfeiffer 1849 is the freshwater pateliform snail genus with the widest geographical distribution among the eight genera of "Ancylidae" marked for the Neotropical region. The pateliforme shell, considered as one homoplasy by several authors in various basommatophorans, has historically been used to define the family unit Ancylidae despite questions against the monophyly of the group. Molecular data confirmed that Ancylidae is a paraphyletic group, mainly because of *Burnupia* genus. The other genera were included in Ancylinae within Planorbidae. However, the absence of phylogenies with molecular basis including all Neotropical genera is still an issue that needs to be investigated. The main objectives of this study was: (a) review the species of *Gundlachia* through morphological studies of their shells and soft tissues; (b) standardize the descriptions of the species providing a basis to begin a cladistic analysis of the genus; (c) begin a molecular biology study using different species of representatives of Ancylinae to check their interrelationship and the likely sister group of *Gundlachia*; (d) and finally, build a geographic distribution map. For that, we examined several scientific collections and collections were conducted in the type localities. The morphology of the shells was compared by morphometric analysis under light and scanning microscopes. The soft tissues of the specimens were dissected and studied under a stereoscopic microscope. Molecular analysis was performed on three specimens of each sample using the genes of cytochrome c oxidase I and 16S mtDNA. Sequences were used to verify genetic distances between *Gundlachia* species and their relation with other genera through Neighbor-joining and Maximum likelihood test. With this study we present the new description of some species of *Gundlachia*, discuss the validity of new taxa discovered and sequenced and analyzed species of seven genera of Ancylinae that occur in the Neotropical region. Based on these data we discussed the monophyly of *Gundlachia* and their likely sister group. And we address the validity of the other Neotropical genera.

Keywords: Ancylinae. Molecular Analysis. Freshwater limpets. South American.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representantes dos oito gêneros de ancilídeos que ocorrem na região Neotropical, em vista dorsal..... 20

Figura 2 Forma gundlaquióide de concha e partes moles, em vista ventral..... 22

Figura 3 Distribuição geográfica dos sete gêneros ancilídeos neotropicais, com ênfase nas seis espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849..... 34

Figura 4 Localidades de coleta recentemente amostradas, na busca de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925 e *G. leucaspis* (Ancey, 1901) nas suas respectivas localidades-tipo..... 38

Figura 5 Localidades de coleta e alguns procedimentos realizados no campo e no laboratório..... 39

Figura 6 Detalhe da protoconcha de *Gundlachia ticaga* (Marcus & Marcus, 1962)..... 43

Figura 7 Desenho da concha de *G. ticaga* (Marcus & Marcus, 1962), ilustrando as medidas utilizadas na conquiliometria..... 44

Figura 8 Espécime de *Gundlachia* n. sp. 2 corado em lugol, parcialmente dissecado..... 47

Figura 9 Procedimento de extração de tecido para a análise molecular 50

Figura 10 Diferentes etapas do processo de sequenciamento das espécies..... 52

Figura 11 Aspectos da morfologia externa da concha e das partes moles de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849..... 76

Figura 12 Detalhe da microescultura apical da concha, em vista dorsal, de diferentes gêneros de Ancylidae..... 77

Figura 13 Morfologia externa e interna (sistema excretor, digestório e reprodutivo) das partes moles de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828)..... 78

Figura 14 Ilustração original da concha e partes moles, ambas em vista dorsal de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828)..... 83

Figura 15 Ilustração da concha e parte mole, ambas em vista dorsal de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828)..... 84

Figura 16 Morfologia externa da concha de *G. radiata* (Guilding, 1828), em

vista dorsal, de distintas localidades..... 88
Figura 17 Variação morfológica da protoconcha de *G. radiata* (Guilding, 1828) de distintas localidades..... 89
Figura 18 Morfologia da concha e variação de coloração de *G. radiata* (Guilding, 1828)..... 90
Figura 19 Morfologia externa das partes moles de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) de distintas localidades..... 99
Figura 20 Desenhos da variação da pigmentação do teto do manto de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828), do Estado do Rio de Janeiro..... 100
Figura 21 Morfologia da rádula de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828)..... 101
Figura 22 Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) de distintas localidades..... 102
Figura 23 Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) de distintas localidades..... 103
Figura 24 Mapa da distribuição geográfica das oito espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849..... 104
Figura 25 *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901)..... 105
Figura 26 Morfologia externa das conchas de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901), possíveis topótipos..... 109
Figura 27 Morfologia externa das conchas de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901)..... 110
Figura 28 Morfologia externa das partes moles de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901) coletada na localidade-tipo..... 116
Figura 29 Morfologia da rádula de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901) coletada na localidade-tipo..... 117
Figura 30 Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901) coletada na localidade-tipo..... 118
Figura 31 Morfologia externa das conchas de *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913 encontradas na localidade-tipo..... 122
Figura 32 Morfologia externa das conchas de *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913.. 123
Figura 33 Morfologia externa e interna (sistema excretor, digestório, reprodutivo e nervoso) das partes moles de *Gundlachia bakeri*

	Pilsbry, 1913 coletada na localidade-tipo (UERJ 7156).....	128
Figura 34	Morfologia da rádula de *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913 coletada na localidade-tipo (UERJ 7161).....	129
Figura 35	*Gundlachia lutzi* Walker, 1925, ilustração original da concha e tipo....	130
Figura 36	Morfologia externa da concha de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925, coletada na localidade-tipo.....	134
Figura 37	Morfologia externa da concha de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925, em vista dorsal.....	135
Figura 38	Morfologia externa da parte mole de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925...	140
Figura 39	Morfologia da rádula de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925.....	141
Figura 40	Morfologia interna da parte mole de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925...	142
Figura 41	Morfologia da concha de *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).....	149
Figura 42	Morfologia da concha e alguns exemplos da variação da coloração do periostraco de *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).....	150
Figura 43	Morfologia externa de *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962)....	154
Figura 44	Morfologia da rádula de *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).	159
Figura 45	Morfologia interna das partes moles de *G. ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).....	160
Figura 46	*Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853), ilustração original da concha.....	161
Figura 47	Holótipo de *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853).....	162
Figura 48	Morfologia da concha de *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853), coletada em Penedo, Rio de Janeiro.....	164
Figura 49	Morfologia externa e interna da parte mole de *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853), coletada em Penedo, Rio de Janeiro.....	166
Figura 50	Morfologia externa da concha de *Gundlachia* n. sp. 1.....	171
Figura 51	Morfologia da concha e variação de coloração de *Gundlachia* n. sp. 1.	172
Figura 52	Morfologia da rádula de *Gundlachia* n. sp. 1.....	178
Figura 53	Morfologia externa das partes moles de *Gundlachia* n. sp. 1.....	179
Figura 54	Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia* n. sp. 1.....	180
Figura 55	Morfologia externa da concha de *Gundlachia* n. sp. 2.....	181
Figura 56	Morfologia externa das partes moles de *Gundlachia* n. sp. 2.....	189

Figura 57 Morfologia da rádula de *Gundlachia* n. sp. 2..... 190
Figura 58 Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia* n. sp. 2..... 191
Figura 59 Mapa da distribuição geográfica de *Gundlachia* n. sp. 2..... 192
Figura 60 Representação gráfica da Análise Discriminante em função da morfometria utilizando as oito espécies de *Gundlachia* analisadas..... 198
Figura 61 Representação gráfica da Análise Discriminante em função da morfometria utilizando as oito espécies de *Gundlachia* analisadas, sem o "*out group"*..... 199
Figura 62 Representação gráfica da Análise Discriminante em função da morfometria utilizando as quatro espécies de *Gundlachia*..... 203
Figura 63 Resultado da análise de parcimônia gerada pela matriz proposta através do consenso estrito..... 211
Figura 64 Resultado da análise de parcimônia gerada pela matriz proposta, apresentando as duas árvores geradas a partir da análise *Tradicional Reserch*..... 213
Figura 65 Árvore construída pelo método *Neighbor joining* a partir das novas sequências geradas do gene 16S do mtDNA de diferentes gêneros de Ancylidae..... 226
Figura 66 Árvore construída pelo método heurístico de *Maximum likelihood* (ML) a partir das novas sequências geradas do gene 16S do mtDNA de diferentes gêneros de Ancylidae..... 227
Figura 67 Árvore parcial construída pelo método heurístico de *Maximum likelihood* (ML) partir das novas sequências geradas do gene 16S do mtDNA para diferentes espécies de *Gundlachia*..... 228
Figura 68 Árvore construída pelo método heurístico de *Maximum likelihood* (ML) a partir das novas sequências geradas do gene COI do mtDNA de diferentes gêneros de Ancylidae..... 231
Figura 69 Árvore parcial de *Neighbor-Joining* (NJ) gerada a partir das novas sequências do gene COI do mtDNA para as populações que formam o "Complexo *G. radiata*" + *Hebetancylus* spp..... 232
Figura 70 Árvore parcial de *Neighbor Joining* (NJ) gerada a partir das sequências do gene COI do mtDNA para diferentes espécies de *Gundlachia*..... 233

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Oligonucleotídeos específicos (*primers*) utilizados nas análises moleculares.....	53
Tabela 2	Lista das sequências utilizadas do GenBank para análise com o iniciador molecular Citocromo oxidase I (COI), como grupo-externo.....	55
Tabela 3	Lista das sequências retiradas do GenBank para análise com o iniciador molecular 16S, como grupo-externo.....	52
Tabela 4	Três diferentes listas sinonímicas atribuídas a *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828).....	74
Tabela 5	Conquiliometria de oito espécies de *Gundlachia*. Estatística descritiva das conchas, apresentando a amplitude morfométrica.....	196
Tabela 6	Comparação morfológica dos caracteres que diferenciam as espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 analisadas.....	193
Tabela 7	Matriz de classificação da Análise Discriminante (AD). Indicando quantos representantes possuem a "identidade morfológica" de cada espécie.....	200
Tabela 8	Matriz de classificação da Análise Discriminante (AD). Indicando quantos representantes das quatro espécies de *Gundlachia* possuem a "identidade morfológica" das espécies analisadas.....	204
Tabela 9	Representantes de Ancylinae utilizados no estudo molecular.....	220
Tabela 10	Média aritmética das divergências genéticas entre *Gundlachia* e os outros grupos analisados com o gene 16S e COI do mtDNA....	229
Tabela 11	Divergências genéticas intra e interespecíficas do gênero *Gundlachia* com o gene COI do mtDNA.....	229

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Histórico das mudanças na sistemática do gênero *Gundlachia* Pfeiffer,1849.....	25
Quadro 2	Informações sobre as seis espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849.....	80
Quadro 3	Matriz de caracteres e táxons utilizados neste estudo.....	214

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO…….....	17
1	**RELEVÂNCIA DO ESTUDO** ……..…….....……..	17
1.1	**Histórico do gênero *Gundlachia* Pfeiffer, 1849**.....	19
1.2	**Posição sistemática de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849**.....	27
1.2.1	Segundo dados morfológicos.....	27
1.2.2	Segundo dados moleculares.....	30
1.3	**Distribuição geográfica de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849**....….....	32
2	**OBJETIVOS**…….....	35
3	**MATERIAL E MÉTODOS**…….....	36
3.1	**Material examinado** ……..……..	36
3.2	**Coletas e curadoria dos ancilídeos**…….....….....	37
3.2.1	Coletas …….....…	37
3.2.2	Curadoria.....	40
3.3	**Estudo morfológico**.....	40
3.3.1	Conquiliomorfologia e conquiliometria.....	41
3.3.2	Obtenção e análise dos dados conquiliométricos.....	43
3.3.3	Descrição morfológica das partes moles.....	45
3.3.4	Análise filogenética baseada em dados morfológicos.....	48
3.4	**Material e procedimentos utilizados nas análises moleculares**.....	49
3.4.1	Procedimentos utilizados para obtenção do sequênciamento das espécies.....	50
3.4.2	Análises moleculares.....	54
3.5	**Identificação específica**.....	56
3.6	**Distribuição geográfica**.....	57
4	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**…….....……	58
4.1	**Definição, padronização e discussão dos caracteres utilizados para a descrição das espécies e análises filogenéticas**.....	58
4.2	**O gênero *Gundlachia* Pfeiffer, 1849**.....	71
4.2.1	*Gundlachia* Pfeiffer, 1849.....	71
4.2.1.1	*Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) …….....……..	81

4.2.1.2 *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901)..... 105
4.2.1.3 *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913 119
4.2.1.4 *Gundlachia lutzi* Walker, 1925..... 130
4.2.1.5 *Gundlachia ticaga* (Marcus & Marcus, 1962)..... 143
4.2.1.6 *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853)..... 161
4.2.1.7 *Gundlachia* n. sp. 1 (AC) 169
4.2.1.8 *Gundlachia* n. sp. 2 (RJ) 181
4.3 **Conquiliometria**..... 196
4.4 **Filogenia baseada em dados morfológicos**..... 205
4.5 **Filogenia baseada em dados moleculares**..... 219
5 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**..... 234
CONCLUSÕES..... 237
REFERÊNCIAS 239
ANEXO A Protocolo de extração de DNA adaptado para moluscos 250
ANEXO B Quantificação do DNA genômico..... 251
ANEXO C PCR (iniciador mitocondrial - 16S)..... 252
ANEXO D PCR (iniciador mitocondrial - COI)..... 254
ANEXO E Preparo do gel de agarose 2%..... 256
ANEXO F Eletroforese..... 257
ANEXO G Visualização do gel de agarose..... 258
ANEXO H Purificação Exosap..... 259
ANEXO I PCR de sequenciamento - Big Die..... 260
ANEXO J Purificação por Sephadex G-50..... 261
ANEXO K Sequenciamento automático - ABI 3500..... 262

INTRODUÇÃO

1 RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Os moluscos são o segundo maior grupo em número de espécies (Strong et al. 2008), depois dos artrópodes, sendo que os de água doce são os que mais carecem de descrições taxonômicas (Lydeard et al. 2004).

Os moluscos de água doce são considerados o grupo de animais aquáticos mais impactados em todo o mundo (Poole e Downing 2004). Os declínios de suas populações têm sido retratados por alguns autores (Lanzer e Schäfer 1985; Darrigran 1999) como consequência da perda e degradação de habitats (Strong et al. 2008) e da introdução de espécies invasoras, que podem levar à diminuição ou extinção de espécies ainda não conhecidas (Primack e Rodrigues 2002; Son 2007). Isso está diretamente relacionado ao presente trabalho, que visa aumentar o conhecimento sobre as espécies de *Gundlachia*, um dos gêneros que vivem nesse tipo de ambiente.

Uma das razões para não se conhecer integralmente a diversidade dos moluscos límnicos é que, a maioria dos trabalhos, é feita com espécies de importância médica, econômica e/ou sanitária (Myers et al. 2000), deixando as demais em segundo plano.

Outro problema que também dificulta estimar sua real riqueza é a incerteza taxonômica, devido às inadequadas descrições genéricas e específicas (Basch 1963), e à plasticidade ecofenotípica da morfologia das conchas (Basch 1963; Durrant 1977; McMahon e Whitehead 1987; McMahon 2004), levando à chamada inflação taxonômica dos gastrópodes límnicos (Strong et al. 2008).

O pequeno conhecimento sobre a biodiversidade de moluscos límnicos também pode ser relacionado à escassez de taxonomistas para a maioria dos grupos de invertebrados brasileiros (Younés 2001), com exceção dos artrópodes (Ribeiro-Costa e Marinoni 2006) e isto se aplica também aos ancilídeos (Santos 2003; Santos et al. 2010), foco desta tese. Assim, um dos maiores desafios da atualidade é a formação de taxonomistas, para que se possa conhecer a diversidade biológica brasileira, descrevendo-a sob vários aspectos (biológicos, morfológicos, comportamentais, biogeográficos, moleculares, etc); são estudos que requerem certa urgência já que a perda de habitats é evidente e a cada dia mais acelerada (Barbosa 2001).

O conhecimento taxonômico, além de ser fundamental, é um dos mais importantes passos para conhecermos a diversidade biológica, e está por trás de todos os dados e interpretações relativos a ela (Younés 2001). Por isso, é importante conhecer os diferentes grupos taxonômicos, suas relações com o meio e suas áreas de distribuição geográfica, a fim de estabelecer as áreas com maior endemicidade, biodiversidade ou risco de degradação, por exemplo, e a partir daí, estabelecer áreas prioritárias para conservação.

Diante disto, os métodos moleculares tornaram-se uma ferramenta útil para a identificação de espécies quando os dados morfológicos não são conclusivos, contribuindo para o avanço da taxonomia (Arif e Khan 2009). A utilização da técnica de código de barras de DNA como uma ferramenta para a determinação da espécie, principalmente devido à sua contribuição para a padronização e validação de dados (Romero e Ramíres 2011), e como um método rápido e relativamente de baixo custo de identificação (Golding et al. 2009), é bastante apropriado para o auxílio da identificação de espécies crípticas. Considerando os ancilídeos, a maioria dos caracteres diagnósticos das espécies são baseados somente em dados morfológicos contínuos, como a posição do ápice e a relação largura/comprimento da concha, que segundo Walther et al. (2010) são os caracteres utilizados para distinguir *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) e *F. rivularis* (Say, 1817). Buscamos nesse trabalho associar informações morfológicas, minimizando as influências ambientais para a diagnose das espécies e, informações moleculares observando a variação intra e interespecífica, no intuito de caracterizar as espécies com base nessas duas ferramentas.

Portanto, este trabalho de revisão traz contribuições para as necessidades apontadas acima, principalmente buscando aumentar o conhecimento sobre a nossa biodiversidade, ao refinar o estudo comparado da morfologia de Ancylidae e fornecer dados para a realização de análise cladística dos ancilídeos neotropicais. Nossos resultados também contribuirão para a rediscussão do *status* taxonômico da família.

Além disso, tendo em vista a carência de recursos humanos na área de moluscos límnicos, o presente estudo visa contribuir para minimizar o impedimento taxonômico na área (Santos et al. 2010).

1.1 **Histórico do gênero *Gundlachia* Pfeiffer, 1849**

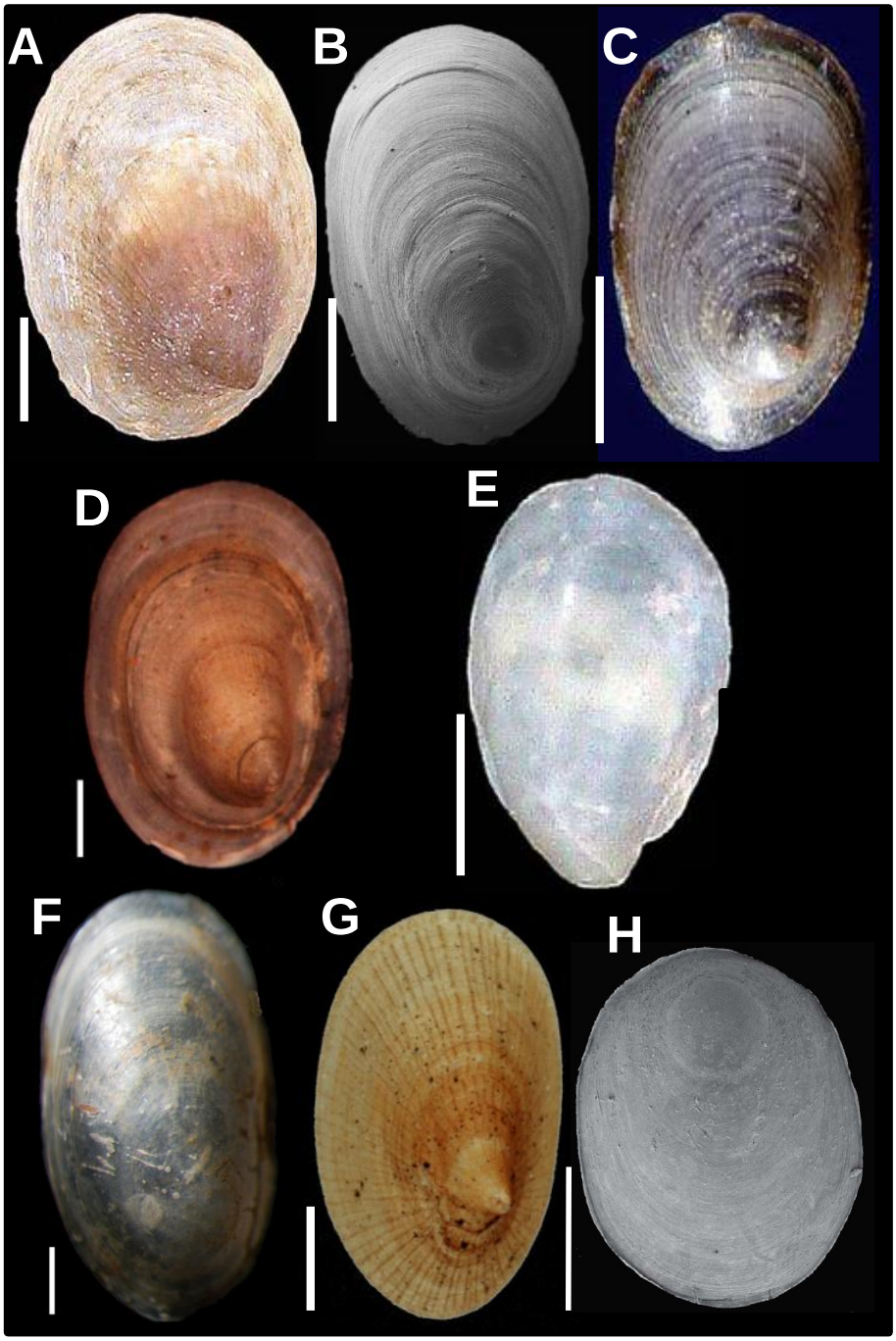
O gênero *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 apresenta concha pateliforme (que tem a forma de prato), que é considerada uma homoplasia, presente não só em várias famílias de basomatóforos (Hubendick 1978; Haszprunar 1988; Albrecht et al. 2004; Mordan e Wade 2008), mas também em diversos prosobrânquios como Haliotidae, Fissurellidae, Acmaeidae e Patellidae (Ruppert et al. 2005). No âmbito dos Basommatophora, tem sido historicamente utilizada para definir a unidade da família Ancylidae, embora existam questionamentos contrários à monofilia do grupo, tanto com dados morfológicos (Hannibal 1914; Basch 1963; Hodgson e Healy 1998; Santos 1994, 1995, 2000, 2003) quanto de biologia molecular (Morgan et al. 2002; Albrecht et al. 2004; 2007, 2014; Walther et al. 2010).

A família Ancylidae *sensu latum* possui representantes em quase todos os continentes (Hubendick 1964, 1967; Lanzer 1991, 1996; Santos 2003; Walther et al. 2006a; Son 2007; Ovando et al. 2011, 2014). A distribuição geográfica de *Gundlachia* seguia praticamente essa mesma distribuição, até meados do século XIX, devido principalmente a identificações morfológicas equivocadas, baseadas nas formas septadas das conchas.

Gundlachia sofreu diversas considerações taxonômicas ao longo do tempo, levando a diferentes esquemas de classificação. Atualmente é definido por caracteres da concha, rádula e partes moles (Pfeiffer 1849; Walker 1923; Bondensen 1950; Hubendick 1964, 1967; Lanzer 1996; Marcus e Marcus 1962; Santos 2003; Santos et al. 2009; Lacerda et al. 2011, 2013; Lacerda e Santos 2011; Ovando et al. 2011, 2014), considerado um gênero exclusivo da região Neotropical, apesar do relato de sua presença na Ásia (Brandt 1974). Outros gêneros portadores de concha pateliforme, como *Burnupia* Walker, 1912, *Ferrissia* Walker, 1903 e *Laevapex* Walker, 1903, também são registrados para a região Neotropical (Figura 1).

Entre as espécies de *Gundlachia* consideradas válidas, não há uniformidade na descrição de acordo com Santos (2003), ou seja, cada autor enfatizou diferentes aspectos da morfologia, o que dificulta tabular uma matriz de caracteres para realizar uma análise cladística que esclareça as relações de parentesco entre as espécies e gêneros. Essa uniformidade é essencial para análises comparativas (Strong 2008).

Figura 1 - Representantes dos oito gêneros de ancilídeos que ocorrem na região Neotropical, em vista dorsal.



Legenda: **(A)** *Anisancylus* Pilsbry, 1924; **(B)** *Burnupia ingae* Lanzer, 1991 (UERJ 7056); **(C)** *Ferrissia* Walker, 1903; **(D)** *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962) (MZSP 64118); **(E)** *Laevapex vazi* Santos, 1994; **(F)** *Hebetancylus* Pilsbry, 1913; **(G)** *Uncancylus concentricus* (d'Orbigny, 1835) e **(H)** *Sineancylus rosanae* (Gutiérrez Gregoric, 2012). Escala= 1mm.
Fonte: Fotos: A, C e E - Simone, 2006; G - Freitas, AC.; H - Gutiérrez Gregoric, 2012; B, D e F - Lacerda, LEM.

Todas as formas da região Neotropical se agrupavam dentro de *Ancylus* Geoffroy, 1767, gênero Paleártico, baseadas principalmente em caracteres externos das

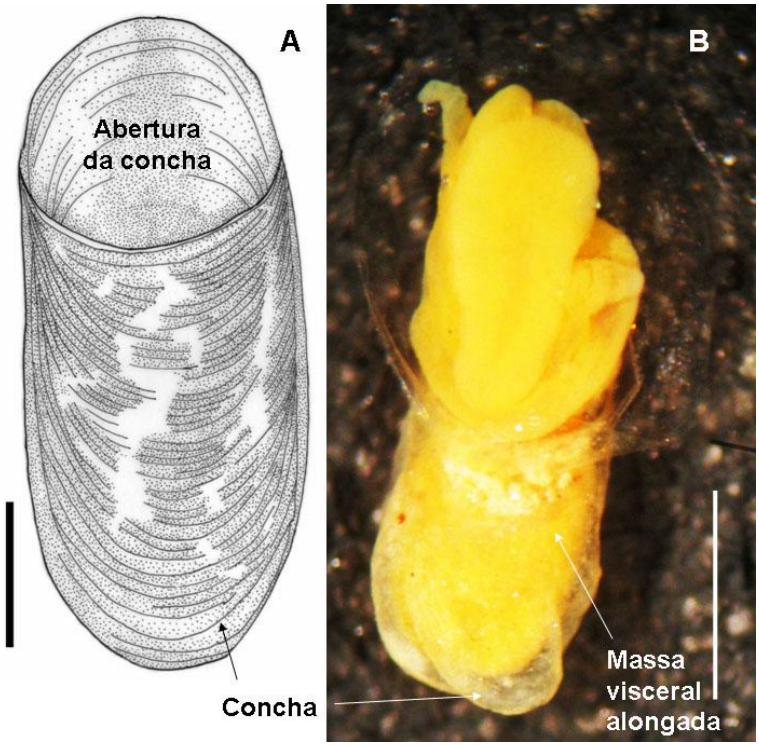
conchas (Santos 1995). Um bom exemplo disto está no trabalho de Bourguignat (1853) que cita 25 espécies nominais de *Ancylus* das Américas (*A. concentricus, A. barilensis, A. petitianus, A. obliquus, A. charpentierianus, A. saulcyanus, A. radiatus, A. culicoides, A. moricandi, A. radiatus, A. irroratus, A. beaui, A. havanensis, A. drouetianus, A. filosus, A. radiatilis, A. fuscus, A. crassus, A. tardus, A. obscurus, A. calcarius, A. haldemanii, A. parallelus, A. cumingianus* e *A. diaphanus*). Esses táxons foram ao longo do tempo alocados em diferentes gêneros, variando de acordo com os caracteres observados por cada pesquisador (Walker 1917; Pilsbry 1913, 1924; Hubendick 1964, 1967).

Apesar da semelhante forma pateliforme entre os representantes do gênero *Ancylus* (espécie-tipo *Ancylus fluviatilis* Müller, 1774) e *Gundlachia*, existem diferenças morfológicas na concha (posicionamento do ápice) e nas partes moles (na forma e número dos músculos adutores, na pseudobrânquia, no sistema excretor e no sistema digestório), segundo Hubendick (1964).

O gênero *Gundlachia* foi descrito para a América Central (Cuba) por Pfeiffer em 1849 (Pfeiffer, 1849), designando como espécie-tipo *Gundlachia ancyliformes* Pfeiffer, 1849. Um dos caracteres diagnósticos citados pelo autor foi a presença do septo basal, que fecha a abertura da concha parcialmente (Figura 2). Em 1852, o mesmo autor complementou a descrição original incluindo formas não septadas, que não modificam a morfologia da concha, conforme observado na Figura 1. Como a descrição foi baseada em formas septadas (Pfeiffer 1849), conhecidas como conchas gundlaquióides ou septadas (Mirroli 1960; Ovando et al. 2011), diversos problemas taxonômicos foram gerados, pois a partir da descrição original do gênero, todas as conchas septadas encontradas sozinhas ou acompanhadas de formas não septadas eram atribuídas ao gênero *Gundlachia* (Walker 1912, 1924; Mirroli 1960; Basch 1963; Hubendick 1964, 1967), ampliando sua distribuição geográfica.

Além disso, os diferentes estágios na formação do septo geraram várias descrições que foram posteriormente invalidadas por sinonimização (Hubendick 1964, 1967) principalmente por terem sido baseadas somente nas conchas. Como exemplo, citamos a criação do gênero *Poeyia* por Bourguignat (1862) com a espécie-tipo *Poeyia gundlachioides* Crosse, 1890 baseada em formas gundlaquióides de *G. ancyliformis*, segundo Crosse (1890) *apud* Santos (1995); como esta espécie é sinônimo sênior de *Ancylus radiatus* Guilding, 1828, *Poeyia* tornou-se sinonímia de *Gundlachia*.

Figura 2 - Forma gundlaquióide de concha e partes moles, em vista ventral.



Legenda: (**A**) Concha modificada de *G. radiata*. (**B**) Massa visceral alongada de *Gundlachia* sp. 2 Ambas as espécies apresentaram menor abertura da concha, que dificulta a perda de água da parte mole para o ambiente (dessecação). Escala = 1mm.
Fonte: (**A**) Ilustração retirada de Ovando et al. (2011); (**B**) foto de LEM. Lacerda.

Hannibal (1912) reconheceu como válido o gênero *Gundlachia*, agrupando-o com *Laevapex* em Laevapecinae. O gênero *Gundlachia* foi dividido em dois sub-gêneros por Hannibal (1912): *Gundlachia ss*., que agrupou todas as formas conhecidas com conchas septadas e *Kincaidilla*, que reuniu espécimes com ápice inclinado e com estrias. O próprio autor já tinha ressaltado que novos estudos nos ápices das conchas dos vários espécimes atribuídos a *Gundlachia* revelariam novos gêneros. *Kincaidilla* atualmente é considerado sub-gênero de *Ferrissia* (Walther et al. 2010). Hannibal em 1914 elevou Laevapecinae (*Laevapex* e *Gundlachia*) e Ancylinae (*Ancylus, Brondelia* Bourguignat, 1862 e *Ancylastrum* Bourguignat, 1853) à categoria de família e argumentou que a concha pateliforme de *Ancylus* é alcançada por um desenvolvimento secundário, sendo inicialmente enrolada.

Gundlachia foi considerado o único gênero de ancilídeo na América do Sul, até que de Pilsbry (1913, 1924), baseados na descrição da concha (forma, ápice e escultura) e da rádula (morfologia do dente central). Em 1913, ele criou *Hebetancylus* (espécie-tipo *Ancylus moricandi* d'Orbigny, 1837), sob a denominação de *group*, e *Uncancylus*

(espécie-tipo *Ancylus barilensis* Moricandi, 1845), sob a denominação de "sub-genus". Em 1924, o autor elevou esses dois táxons à categoria de gênero e criou mais um, *Anisancylus* (espécie-tipo *Ancylus obliquus* Broderip e Sowerby, 1832). Com isso, *Gundlachia* foi dividido em quatro sub-gêneros: *Gundlachia ss*., *Anisancylus*, *Hebetancylus* e *Uncancylus*. Destes, segundo Pilsbry, *Gundlachia* caracteriza-se por possuir na concha um ápice obtuso e arredondado e uma rádula com o dente central bastante assimétrico, tendo a cúspide mediana esquerda mais longa do que a direita.

Segundo as descrições de Pilsbry (1924) em relação ao ápice da concha, o gênero *Uncancylus* é o que mais se distancia de *Gundlachia* por apresentar seu ápice pontiagudo, em forma de gancho e com leves pontuações. Já os gêneros *Hebetancylus* e *Anisancylus* possuem o ápice liso, arredondado e obtuso. Em relação à rádula, a de *Anisancylus* é a mais distinta, com quatro cúspides evidentes no dente central, enquanto que *Hebetancylus* possui o dente central um pouco menos assimétrico e uma placa basal mais larga do que *Gundlachia*.

Thiele (1931), em sua obra considerada fundamental para o estabelecimento da malacologia em bases modernas, não considerou válida a proposta de Pilsbry (1924) e alocou os ancilídeos neotropicais (*Gundlachia*, *Anisancylus*, *Uncancylus* e *Hebetancylus*) como subgêneros de *Protancylus* Sarasin, 1897 na sub-família Ancylinae.

Posteriormente, Zilch (1960) revalidou o gênero *Gundlachia* alocando os táxons propostos por Pilsbry como sub-gêneros de *Ancylastrum* Bourguignat, 1853. *Gundlachia* e os sub-gêneros de *Ancylastrum* foram alocados na família Ferrissiidae. O critério definido por Zilch para separar *Gundlachia* dos demais gêneros propostos por Pilsbry (1913, 1924) foram os caracteres da concha.

Burch (1962), utilizando como caráter principal a morfologia das impressões musculares, considerou válidos os gêneros: *Gundlachia*, *Anisancylus*, *Hebetancylus* e *Uncancylus*. Alocou *Gundlachia* em Ferrissiinae, junto com *Hebetancylus* e os demais (*Anisancylus* e *Uncancylus*) em Laevapecinae.

Basch (1963) cunhou a expressão "ancilídeos neotropicais" para referir-se aos gêneros *Gundlachia*, *Anisancylus*, *Hebetancylus* e *Uncancylus*.

Hubendick (1964, 1967) sinonimizou *Anisancylus, Hebetancylus* e *Uncancylus* com *Gundlachia*, pois para o autor as diferenças morfológicas na protoconcha observadas nesses diferentes gêneros e defendidas como genéricas por diversos autores (Burch 1975; Santos 2003) configuram apenas diferenças específicas, tendo em vista a

similaridade das partes moles dos diversos gêneros. Essa corrente foi seguida por Castellanos (1982) e Lanzer (1996), embora Aguayo (1946) já tivesse feito a mesma proposição anteriormente.

De acordo com Santos (1995), duas correntes foram identificadas após os trabalhos de Pilsbry (1913, 1924): uma que considerava válidos os quatro gêneros propostos por Pilsbry (1924) ou parte deles e, a outra, apenas um gênero, só *Gundlachia*. A corrente que reconhece a validade dos quatro gêneros (Walker 1923; Wurtz 1951; Basch 1959; Paraense 1981; Fernández 1981; Lima 1995; Santos 1995, 1999, 2000, 2003; Simone 2006) é a que cada vez mais ganha sustentação por diferentes conjuntos de dados, tanto morfológicos (Santos 2003; Santos et al. 2009, 2010; Lacerda et al. 2011, 2013; Lacerda e Santos 2011; Ovando et al. 2011, 2014) quanto moleculares (Albrecht et al. 2007; Walther et al. 2010), apesar destes últimos trabalhos utilizarem poucos representantes neotropicais.

Estudos gerais da concha, rádula e partes moles são encontrados em Clessin (1882), Pilsbry (1913, 1924), Hylton-Scott (1953), Marcus e Marcus (1962), Hubendick (1964, 1967), Fernández (1981), Harrison (1983), Miquel (1988), Lanzer (1990, 1994, 1995, 1996), Ohlweiler e Lanzer (1993, 1994), Santos (1994, 1995, 2000, 2003), Lacerda et al. (2011, 2013, 2015), Ovando et al. (2011, 2014). Esses estudos auxiliaram na definição dos gêneros e espécies, baseados na microescultura da concha e, para algumas espécies, também na morfologia muscular.

Contudo, para a identificação precisa destes gêneros e espécies ainda é necessário um estudo comparativo de todas as espécies presentes na região neotropical, principalmente focado na morfologia das partes moles, traçando comparações entre as rádulas, que desde Pilsbry (1913, 1924) já auxiliavam na separação no nível genérico.

O quadro 1 sumariza os principais arranjos e mudanças na conceituação e posição sistemática de *Gundlachia*.

Quadro 1 - Histórico das mudanças na sistemática do gênero *Gundlachia* Pfeiffer,1849 (continua)

Autor/ano	**Conclusão**	**Fundamentação**	**Seguidores**
Pfeiffer (1849)	Criou o gênero *Gundlachia*	Formas septadas de Cuba	-
Pfeiffer (1852)	Complementa a descrição original	Formas não septadas	-
Hannibal (1912)	Restringiu Ancylinae à *Ancylus* (*Brondelia* Bourguignat, 1862 + *Ancylastrum* Bourguignat, 1853) e usou Laevapecinae para incluir *Laevapex* Walker, 1903 + *Gundlachia sensu latum*.	Caracteres das conchas.	Zilch (1960) propôs a família Ancylidae exclusivamente para o gênero *Ancylus*. Dividindo Ferrissiidae (*Ferrissia*, *Burnupia*, *Gundlachia e Ancylastrum*).
Pilsbry (1913, 1924)	Dividiu *Gundlachia* em quatro sub-gêneros, (*Gundlachia* ss., *Anisancylus*, *Hebetancylus* e *Uncancylus*).	Concha e rádula.	Walker (1923), Wurtz (1951), Basch (1959), Paraense (1981), Fernández (1981), Lima (1995), Santos (1995, 1999, 2000, 2003), Simone (2006), Rumi *et al*. (2008), Lacerda *et al*. (2011, 2013) e Ovando *et al*. (2011, 2014).
Walker (1923)	Reconheceu oito sub-famílias, incluindo *Ferrissia*, *Gundlachia*, *Hebetancylus* e *Uncancylus* em Ferrissiinae.	Microscopia apical.	-
Thiele (1931)	Reconheceu as sub-famílias Ancylinae e Acroloxinae. Nesse arranjo, *Gundlachia*, *Anisancylus*, *Uncancylus*, *Hebetancylus*, *Ferrissia* e *Burnupia* são considerados subgêneros de *Protancylus* Sarasin, 1897 na sub-família Ancylinae.	Posicionamento do ápice (sinistrógiro ou dextrógiro).	-
Basch (1959)	Considerou os quatro gêneros Neotropicais válidos.	Observações próprias e ilustrações de Pilsbry (1914); Walker (1925); Baker (1928) e Connoly (1939).	-
Zilch (1960)	Considerou o gênero *Gundlachia* válido e alocou o *Anisancylus*, *Uncancylus* e *Hebetancylus* no sub-gêneros de *Ancylastrum*.	Caracteres das conchas.	-
Burch (1962, 1982)	Admitiu três sub-famílias em Ancylidae: Ancylinae (*Ancylus* e *Rhodacmea* Walker, 1917); Ferrissiinae (*Ferrissia*, *Gundlachia* e *Hebetancylus)* e Laevapecinae (*Anisancylus*, *Burnupia*, *Laevapex* e *Uncancylus*).	Impressões musculares.	Burch e Tottenham (1980)
Hubendick (1964, 1967)	Aceitou a validade de um único gênero *Gundlachia.* Colocando os gêneros propostos por Pilsbry em sinonímia.	Considerava as diferenças morfológicas na protoconcha como sendo apenas específicas.	Aguayo (1946), Castellanos (1982) e Lanzer (1996)
Hubendick (1978)	Reuniu os planorbídeos com os ancilídeos na família Ancyloplanorbidae.	Caracteres das gônadas e próstata.	Foi criticada por Meier-Brooks (1984), por ferir regras nomenclaturais.

Fernández (1981)	Considerou somente três gêneros válidos (*Anisancylus*, *Hebetancylus* e *Uncancylus*). A autora argumenta que apesar de *Gundlachia* ter prioridade na sinonímia com *Hebetancylus*, este último apresenta uma descrição mais ampla e correta.	Apesar de não citar os materiais utilizados, baseou a diagnose nos caracteres da concha, rádula e no sistema reprodutor (complexo ejaculatório).	-
Lanzer (1996)	Seguiu a proposta de Hubendick, considerando os gêneros neotropicais sinônimos de *Gundlachia*.	Baseou-se nas características da concha, rádula e morfologia externa das partes moles, com ênfase nos músculos adutores.	–
Santos (2003)	Considerou válido os ancilídeos neotropicais (*Gundlachia*, *Anisancylus*, *Hebetancylus*, *Uncancylus*) e mais *Ferrissia*, *Burnupia*, *Laevapex* e o gênero paleártico *Ancylus.*	Baseou-se nas características da concha, rádula, mandíbula, musculatura, área adesiva, sistema digestivo e reprodutor.	-

Legenda: As colunas fazem referência ao autor e a data da publicação; a conclusão do autor em seu trabalho; a fundamentação dos dados e aos autores adeptos da hipótese proposta.

Fonte: Compilação dos dados de literatura.

Dentre os táxons citados por Bourguignat (1853) destacamos *A. radiatus* Guilding, 1828 (=*G. radiata*) e *A. saulcyanus* (=*G. saulcyana*) que foram alocados em *Gundlachia* por Hubendick em 1964. Nesse trabalho, o autor ampliou a diagnose do gênero inserindo várias informações sobre as partes moles e iniciou a colocação em sinonímia de diversas espécies nominais, por exemplo, *G. ancyliformes* (=*G. radiata*). Em 1967 ampliou estes estudos colocando todos os 64 nomes existentes em nove *form-groups,* tendo como base caracteres da concha, pigmentação do manto e a distribuição geográfica. Destes nove grupos, seis foram registrados para a América do Sul, todos pertencentes ao gênero *Gundlachia*. Esses trabalhos geraram um aumento das listas sinonímicas e uma simplificação na classificação, sendo reconhecidos somente os seguintes "grupos": *G. radiata* (Guilding, 1828); *G. obliqua* (Broderip e Sowerby, 1832); *G. gayana* (d'Orbigny, 1837); *G. concentrica* (d'Orbigny, 1837); *G. crequi* (Bavay, 1904) e *G. foncki* (Phillippi, 1866). Hubendick (1967) apontou a necessidade da ampliação do entendimento sobre a morfologia interna para melhorar as relações entre os grupos formados.

1.2 **Posição sistemática de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849**

1.2.1 Segundo dados morfológicos

Considerando as categorias taxonômicas supra-familiares, *Gundlachia* está incluído na ordem Basommatophora, da sub-classe Pulmonata (Mordan e Wade 2008). Portanto, compartilha com as famílias Physidae, Lymnaeidae e Planorbidae, características como o sistema reprodutor com duas aberturas genitais e diaulia completa (Duncan 1960; Hubendick 1947, 1978). Pulmonata foi primeiramente definido por Cuvier (1817 *apud* Mordan e Wade 2008) como uma das sete ordens de Gastropoda. Nela eram incluídas famílias de moluscos terrestres, de água doce e algumas marinhas, como Onchidiidae e Ellobiidae (presentes em ambientes estuarinos). Atualmente os principais grupos incluídos em Pulmonata para o ambiente de água doce são: Chilinidae (~10 espécies), Glacidorbidae (~10 espécies), e Hygrophila (~1000

espécies), que agrupa distintas famílias, como por exemplo, Lymnaeidae, Physidae e Planorbidae (Mordan e Wade 2008).

Mais recentemente, os Pulmonata estão inseridos no clado Heterobranchia. Segundo Haszprunar (1985, 1988), Heterobranchia foi criado por Gray (1840) pela combinação de Opistobranchia e Pulmonata, devido à sua proximidade filogenética, baseada em similaridades nos sistemas nervoso (dois gânglios parietais adicionais), genital (hermafrodita, monoáulico com uma bolsa fertilizadora distal e um receptáculo proximal que se conecta com um pênis protrátil) e muscular.

Atualmente os heterobrânquios são caracterizados por possuírem um escudo cefálico, dois pares de tentáculos, somente um dente central por fileira na rádula, glândulas acinosas grandes, estilo de vida pelágico devido ao pé modificado, redução de tamanho e a migração de alguns para a água doce (Wägele et al. 2008). Os heterobrânquios pulmonados se diferenciam dos demais por terem a cavidade palial modificada, com um vaso sanguíneo pulmonar bem desenvolvido, a presença de um procérebro (gânglio cerebróide) e o sistema nervoso central na região médio-dorsal do corpo (Wägele et al. 2008).

Segundo Strong et al. (2008), a maioria dos heterobrânquios pulmonados possui capacidade limitada para habitar águas profundas, devido à falta de um ctenídio (verdadeira brânquia de Mollusca). A cavidade do manto modificada e vascularizada permite a realização das trocas gasosas por difusão. Nos ancilídeos a cavidade do manto é muito reduzida, sem vascularização. Todavia, desenvolveu-se na parede lateral do corpo, logo abaixo da abertura da cavidade palial, uma pseudobrânquia, que auxilia nas trocas gasosas (Russel-Hunter e McMahon 1976; Walther et al. 2006), possibilitando a permanência desses pequenos moluscos debaixo d'água. A pseudobrânquia, não é um caráter exclusivo dos ancilídeos e está presente em outros representantes de Planorbidae (Paraense 1955), apesar de parecer bem mais desenvolvida nos ancilídeos.

No âmbito dos Basommatophora, em relação aos moluscos límnicos pateliformes, a família Ancylidae *sensu latum* é o maior grupo e a mais derivada, segundo Hubendick (1978), por ter seu sistema reprodutor com duas aberturas genitais e diaulia completa (Duncan 1960; Hubendick 1947, 1978), um caracter dos "basomatóforos superiores" numa visão clássica, compartilhado com as famílias Physidae, Lymnaeidae e Planorbidae. Já as suas relações filogenéticas ainda se encontram com várias lacunas segundo Bouchet e Rocroi (2005), embora considerem o clado Hygrophila monofilético, este se encontra inserido no grupo informal

Basommatophora, e este último no grupo Pulmonata, sendo, portanto, grupos não monofiléticos. Além disso, os autores consideraram Ancylidae

Comparações sobre a morfologia externa da cabeça (tentáculos), órgãos da cavidade do manto, sistema digestório (mandíbula) e reprodutor (pênis) entre as quatro famílias que constituem os basomatóforos superiores são vistos em Hubendick (1978). Todas as quatro famílias são agrupadas no clado Hygrophila, que tem como característica um par de tentáculos não retráteis com olhos na base, composto por representantes que são relacionados a ambientes úmidos.

Considerando as categorias do nível de família, a revisão do gênero *Gundlachia* mostra alterações conforme o acúmulo de conhecimento, quando inicialmente alocado na família Ancylidae, passou sucessivamente por Laevapecidae (Hannibal 1912), Ferrissidae (Thiele 1931), Ferrissiinae (Burch 1962) e na tribo Bulinini dos Ancyloplanorbidae (Hubendick 1978).

Ao considerarmos as relações internas, também observamos discrepâncias entre os diversos autores que trataram do tema. Burch (1962) admitiu três sub-famílias em Ancylidae, baseado nas impressões musculares: Ancylinae (*Ancylus* e *Rhodacmea* Walker, 1917) que é caracterizado por ter o músculo direito contínuo e em forma de "C"; Ferrissiinae (*Ferrissia*, *Gundlachia* e *Hebetancylus*) com três impressões musculares e sem área adesiva e Laevapecinae (*Anisancylus, Burnupia*, *Laevapex* e *Uncancylus*), com três impressões musculares e pequenas áreas adesivas entre as anteriores e a posterior e anterior direita). Segundo essa classificação, *Gundlachia* aparece como grupo irmão de *Hebetancylus*.

Hubendick (1978) propôs a família "Ancyloplanorbidae" (junção de Ancylidae e Planorbidae), baseado nos caracteres das gônadas e próstata, agrupando gêneros que tinham as conchas espirais, planispirais e pateliformes. O autor reconheceu as sub-famílias: Bulininae ((*Laevapex*+*Gundlachia*) + (*Bulinus*+*Indoplanorbis*)) + (*Ferrissia* + *Burnupia* + *Protancylus*)*;* Planorbinae (por exemplo, *Ancylus*) e Rhodacmeinae (por exemplo, *Amphigyra*) o qual foi considerado extinto por se tratar de um gênero monotípico e endêmico para o rio Coosa, EUA (Hubendick 1967). Propôs ainda a tribo Bulinini (para agrupar *Gundlachia*, *Laevapex*, *Bulinus* e *Indoplanorbis*), a tribo Physistrini (para agrupar *Ferrissia*, *Burnupia*, *Physastra, Amerianna*, *Miratesta*, *Ancylastrum*, *Protancylus* e *Patelloplanorbis*) e a tribo Ancylini (para o gênero *Ancylus*).

Os trabalhos recentes de biologia molecular (Morgan et al. 2002; Albrecht et al. 2004, 2007, 2014; Walther et al. 2010) rejeitam pelo menos em parte todas as propostas apresentadas anteriormente, embora Albrecht et al. (2007) confirme algumas relações internas dentro da sub-família Ferrissiinae (*Gundlachia* + *Hebetancylus*) no caso da proposta de Burch (1962).

1.2.2 Segundo dados moleculares

A artificialidade de Ancylidae foi sugerida por Hannibal (1914) e depois acatada por Walker (1923) e outros autores subsequentes (e.g. Basch 1963; Santos 2003), mas a falta de dados completos sempre foi um entrave para a sistemática do grupo. O uso de marcadores moleculares (mitocondriais e nucleares) é uma indispensável ferramenta para determinar variação genética e biodiversidade com um alto grau de confiança e reprodutibilidade (Arif e Khan 2009), podendo ser utilizada para diversas finalidades, dentre elas a reconstrução das relações filogenéticas entre diferentes táxons.

Nas últimas décadas, os marcadores moleculares tem sido utilizado para auxiliar nas resoluções de diversos problemas entre os táxons de Basommatophora (e.g. Morgan et al. 2002; Pfenninger et al. 2003; Walther et al. 2006a,b,c, 2010; Albrecht et al. 2004, 2007; Klussmann-Kolb et al. 2008; Strong et al. 2008; Jöger et al. 2010; Morrone et al. 2011, 2014; Lacerda et al. 2015).

Ao analisar os trabalhos recentes sobre os Ancylidae, cada vez mais as identificações estão atreladas ao uso da ferramenta molecular. Por exemplo, Walther et al. (2006b) ao criticarem Jorgensen et al. (2004) que consideraram Acroloxidae como grupo irmão de Ancylidae (*Ancylus* (*Ferrissia+Acroloxus*)) contrariando uma série de informações morfológicas corroboradas anteriormente (Burch 1962; Hubendick 1964; Hodgson e Healy 1998). Dentre as principais diferenças entre esses táxons estão a organização corporal, em Ancylidae é sinistrógira e em Acroloxidae é dextrógira, e o posicionamento do ápice (Ancylidae é para direita e Acroloxidae para esquerda). Burch (1962) admitiu três sub-famílias em Ancylidae: Ancylinae, Ferrissinae e Laevapecinae (Quadro 1). O posicionamento de representantes de Ancylidae dentro da família Planorbidae, conforme proposto por Morgan et al. (2002) e Albrecht et al. (2004), também não foi aceito por Walther et al. (2006b).

Morgan et al. (2002) utilizaram em suas análises dois marcadores moleculares (Actin exon 2 e 28S rDNA) para reconstruir a filogenia de 38 táxons representados por 16 gêneros de planorbídeos. Segundo os seus resultados Planorbidae é formado por dois clados, um representando a sub-família Bulininae e a outra, Planorbinae. Eles destacaram que os dois táxons da família Ancylidae (*Ferrissia*+*Laevapex*) caíram dentro de Planorbidae e apontaram a necessidade para mais análises e reclassificação do grupo. Algumas incongruências podem ser assinaladas, por exemplo, o determinador dos táxons sendo os próprios autores, que admitiram a pouca experiência com o grupo, e a inserção de *Ferrissia* e *Laevapex* no clado da sub-família Planorbinae, contrariando a morfologia de Hubendick (1978) que considerava ambos os gêneros dentro de Bulininae.

Os trabalhos de Albrecht et al. (2004, 2007) apontaram que Ancylidae não é um grupo monofilético e que as relações internas eram pouco conhecidas. Albrecht et al. (2004), utilizando marcadores COI e 18S concatenados, demonstraram que *Burnupia* formava um clado fora de Ancylidae e também de Planorbidae. As relações internas do grupo foram (*Laevapex* + (*Ferrissia* + *Ancylus*)). Para Albrecht *et al*. (2007), *Burnupia* permaneceu fora dos Ancylini enquanto que os demais taxa, considerados Ancylidae, formaram um clado bem suportado, os Ancylini *s.l*., através de dois clados: um incluindo *Ancylus* + (*Ferrissia* + *Pettancylus*) e outro com *Laevapex* + (*Gundlachia* + *Hebetancylus*).

Os autores destacaram que a hipótese de Hubendick (1978) foi corroborada em parte pois Ancylini *s.l.* estão inclusos dentro de Planorboidea (=“Ancyloplanorbidea” de Hubendick 1978). Além disso, mostraram que enquanto em Hubendick (1978) os gêneros de Ancylidae eram divididos nas sub-famílias Planorbinae (*Ancylus*) e Bulininae (*Gundlachia*, *Laevapex, Bulinus* e *Indoplanorbis*) os táxons de Ancylidae foram monofiléticos, exceto *Burnupia* e *Protancylus*. Gostaria de destacar que o grupo irmão de Bulinini (*Bulinus* + *Indoplanorbis*) não foi bem suportado, com um índice de *máxima Likelihood* (0,52) e o outro grupo formado pelos ancilídeos neotropicais (Ancylini *s.l.* + clado B do Sulawesi) + (clado Planorbinae sensu Hubendick). Então, estamos diante de um clado robusto de ancilídeos representados pelos Ancylini *s.l.*, inserido dentro de “Planorbidae” embasado por um suporte fraco. Este foi o primeiro trabalho do grupo do pesquisador Christian Albrecht (J.W. Goethe-University Frankfurt, Alemanha), que utilizou espécies da região Neotropical: *Gundlachia cf. radiata* (Costa

Rica) e *Hebetancylus excentricus* (México). Essas sequências, disponíveis para o gene COI, foram inseridas e discutidas no presente trabalho.

Walther et al. (2010) concordaram com os trabalhos de Albrecht et al. (2007) e Strong et al. (2008), apesar de não discuti-los, e admitiram a mudança dos ancilídeos do *status* de família Ancylidae para sub-família Ancylinae dentro de Planorbidae. O presente trabalho adotou essa proposição, até uma filogenia mais robusta com dados de diferentes marcadores, mitocondriais e nucleares, ser utilizada para os gêneros neotropicais e as outras sub-famílias de Planorbidae.

Todavia, uma vez que esta questão ainda não está sedimentada na literatura, há trabalhos que se referem à família Ancylidae (Hovingh 2010; Morrone et al. 2011; Lacerda et al. 2011), outros usam com ressalvas quanto à monofilia do grupo (Lacerda e Santos 2011; Ovando et al. 2011, 2014) e ainda aqueles que sabem do problema, expõem em seu texto, mas não opinam (Simone et al. 2012). Acreditamos que, após o acréscimo nas análises filogenéticas dos representantes dos ancilídeos neotropicais no clado Ancylini *s.l.* de Albreacht et al. (2007) ou a utilização de novos marcadores moleculares, esse cenário pode ser modificado.

1.2 **Distribuição geográfica de *Gundlachia***

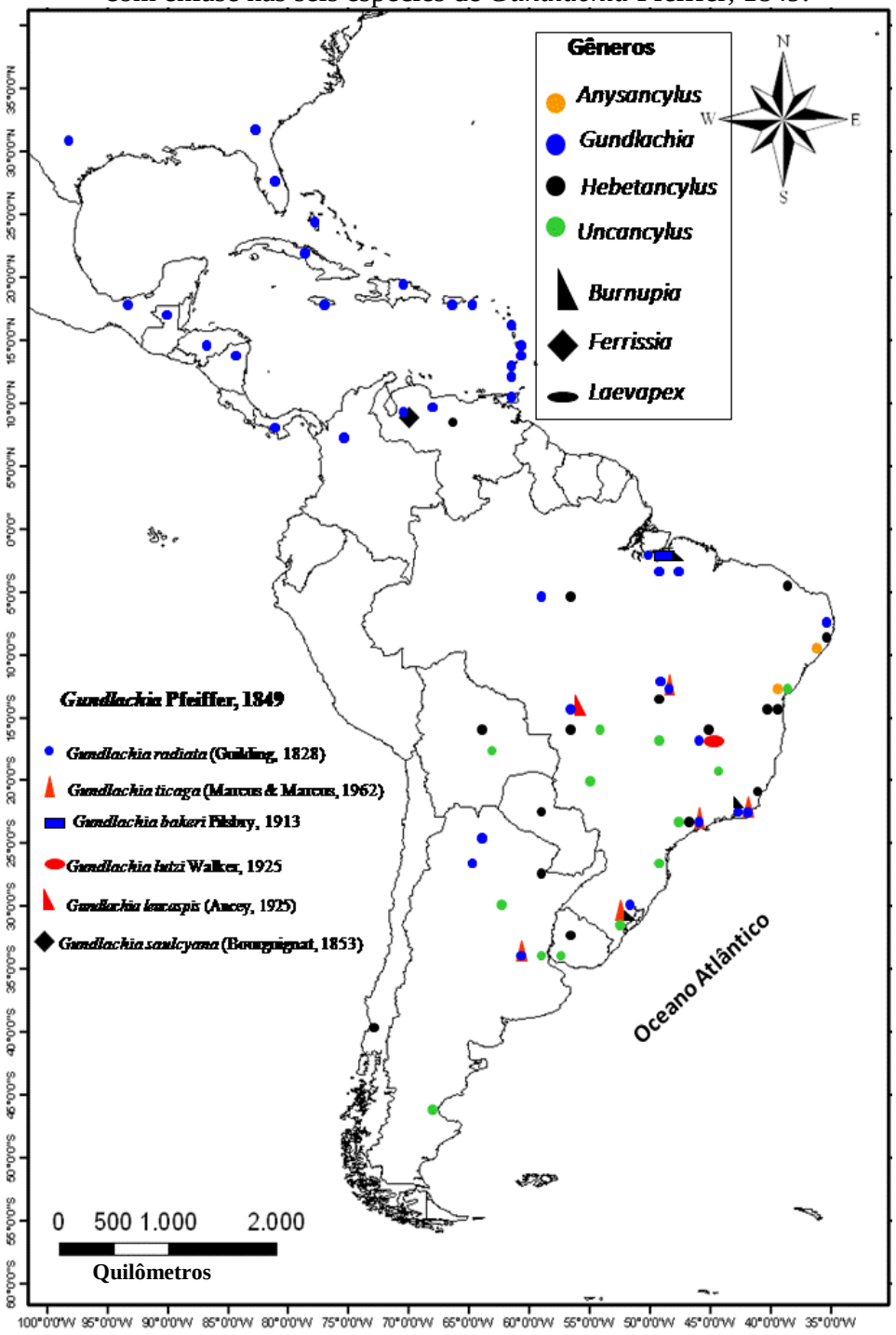
Segundo Hubendick (1964), *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 possui distribuição na região Neotropical. Vivem em ecossistemas límnicos, preferencialmente em ambientes lênticos, como córregos, rios, lagoas e açudes (Santos 1995, 2003; Lanzer 1996; Lacerda et al. 2011). Na mesma região também são encontrados os gêneros: *Anisancylus*; *Burnupia*; *Ferrissia*; *Hebetancylus*; *Laevapex, Uncancylus* e *Sineancylus* (Santos 2003; Ovando et al. 2014) (Figuras 1 e 3), com os quais podem ser confundidos devido ao pequeno tamanho e pela morfologia da concha similar.

Gundlachia, segundo dados da literatura e de coleções científicas, se estende do sul dos Estados Unidos até a região noroeste da Argentina na América do Sul, com referências para o Texas (Basch 1963), Georgia e Flórida (Basch 1963; Hubendick 1967); América Central: Antigua (*apud* Lanzer 1996), Bahamas (Hubendick 1967), Barbados (Schomburgk 1848), Costa Rica (Hubendick 1967), Cuba (Aguayo 1938, Hubendick 1967), República Dominicana (Malek 1985), Granada (Harrison 1983),

Guadalupe (Hubendick 1967; Pointier 1976), Guatemala (Walker 1917; Goodrich e van der Schalie 1937; Hubendick 1967), Honduras (Pfeiffer 1858), Jamaica (Walker 1921; Hubendick 1967), Martinica (Aguayo 1966), México (Hubendick 1967), Nicarágua (Tate 1870; Hubendick 1967; Lanzer 1996; Thompson 2008), Panamá (Zetek 1918), Porto Rico (Harry e Hubendick 1964; Hubendick 1967), Santa Lúcia (Harrison 1983), São Vincente (Harrison 1983) e Trinidade (Smith 1896); América do Sul: Colômbia (Hubendick 1967), Venezuela (Hubendick 1967), Argentina (Ovando et al. 2011, 2014) e no Brasil, esta espécie foi encontrada nas regiões Norte (Irmler 1975; Lanzer 1996), Nordeste (Santos 2003; Kotzian e Amaral 2013; Cantanhede et al. 2014), Centro-Oeste (Thiengo et al. 2005; Mattos et al. 2013), Sudeste (Lacerda et al. 2011, 2013; Marcus e Marcus 1962; Miyahira et al. 2010a,b; Santos 2003; Santos et al. 2003, 2007, 2009, 2010; Simone et al. 2012; Thiengo et al. 1998, 2001, 2002a,b, 2004a,b, 2006) e sul (Lanzer 1996).

A capacidade de produzir septos gerou uma ampliação equivocada na distribuição geográfica de *Gundlachia*, como, por exemplo, as citações para a Austrália de *G. petterdi*, Johnston,1879 e para a Tasmânia, as espécies *G. beddomei*, Petterdi, 1888 e *G. eremia* Cotton e Godfrey, 1938 sinonimizadas por Hubendick (1967) com *Ferrissia* (*Petancylus*) *petterdi.* Além destas, *G. neozelanica* Suter, 1905 (=*Ferrissia* (*P*.) *neozelanica*) para Nova Zelândia e *G. burnupi* Walker, 1926 (=*F. burnupi*) para a África. Diversos autores verificaram que outros gêneros de Ancylinae também possuem a capacidade de formar septos, como *Ferrissia* (Basch 1963; Hubendich 1964), *Gundlachia* não mais seria um gênero com ampla distribuição geográfica, ocorrendo em várias regiões biogeográficas. Portanto, *Gundlachia* necessita de revisão minuciosa dos táxons incluídos nele, especialmente nas espécies nominais descritas apenas com base na concha, a fim de resolver problemas de sinonímia e, consequentemente, de distribuição geográfica do gênero.

Figura 3: Distribuição geográfica dos sete gêneros ancilídeos neotropicais, com ênfase nas seis espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849.



Legenda: Os diferentes gêneros ocorrentes na região Neotropical, estão destacados no mapa com suas respectivas simbologias.

Fonte: Compilação de alguns trabalhos da literatura, Lanzer 1996; Santos 2003; Ovando et al., 2011.

2 **OBJETIVOS**

Geral: Ampliar o conhecimento sobre a sistemática dos moluscos de água doce do gênero *Gundlachia* Pfeiffer, 1849.

Específicos:

1) Revisar as espécies de *Gundlachia*, através de estudos morfológicos (conchas e partes moles) e moleculares de animais procedentes das localidades-tipo, do exame dos exemplares-tipo, quando possível, e análise de dados de literatura;

2) Padronizar a descrição dos caracteres morfológicos visando construir uma matriz de caracteres para a análise cladística do gênero *Gundlachia;*

3) Realizar análise cladística buscando verificar as relações de parentesco entre as espécies alocadas no gênero através de dados morfológicos e moleculares;

4) Testar as relações filogenéticas entre as espécies de *Gundlachia* e os demais gêneros de Ancylinae ocorrentes na região Neotropical, baseado em dados morfológicos e moleculares;

5) Atualizar o mapa de distribuição geográfica das espécies válidas de *Gundlachia*.

3 **MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 **Material examinado**

Foram examinados materiais pertencentes a diversas coleções científicas de moluscos: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil (MZSP), Museu Nacional do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (MN/UFRJ), Coleção de Moluscos da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (UERJ), Coleção de Invertebrados Aquáticos da Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, Brasil (CIAMT), Coleção de Moluscos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil (CMIOC), Coleção de Moluscos do Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotância do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil (MCN) e Coleção de Moluscos do Museo de La Plata, La Plata, Argentina (MLP). Nesses museus efetuei a análise da morfologia das conchas e partes moles, quando disponível, a mensuração dos espécimes íntegros de *Gundlachia* e a aquisição de fotos de distintos lotes.

Alguns museus no exterior foram pesquisados via website, para adquirir informações e fotografias sobre os táxons que são o foco desse estudo: Natural History Museum (NHM, British Museum, Reino Unido), Academy of Natural Sciences of Philadelphia (ANSP, EUA), Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum (SMF, Frankfurt, Alemanha) e University of Michigan, Museum of Zoology (UMMZ, Michigan, EUA). Alguns lotes depositados em museus no exterior foram previamente visitados pela Dra. Sonia Barbosa dos Santos, que cedeu os dados para esta tese.

Adicionalmente utilizei materiais procedentes de coletas realizadas pela equipe do Laboratório de Malacologia Límnica e Terrestre da UERJ (Figuras 4 e 5), visando à obtenção de material para a realização da análise molecular. Este material foi examinado e inserido na Coleção de Moluscos da UERJ. Ao final deste estudo, serão desmembrados alguns lotes para o envio a outras coleções científicas.

Para evitar repetições, nos Resultados, ao descrever cada espécie, na lista do material estudado serão apresentados os estados, seguido pelos municípios e, entre parênteses as localidades de ocorrência, a quantidade de espécimes examinados

(conchas e partes moles), data, a coleção científica à qual pertence e o nome dos coletores.

As coletas foram realizadas com licença SISBIO 29047-1, em nome de Luiz Eduardo Macedo de Lacerda e SISBIO 23607-2, em nome de Sonia Barbosa dos Santos. O material obtido encontra-se depositado na Coleção de Moluscos da UERJ (UERJ).

3.2 **Coletas e curadoria dos ancilídeos**

3.2.1 **Coletas**

As coletas foram efetuadas utilizando concha de captura para moluscos e coleta ativa (Figura 4), conforme descrito em Thiengo (1995). Além disso, a figura 4 (A, B, D, E, F) apresenta uma amostra dos diversos ambientes que foram examinados e que são propícios à presença dos ancilídeos: rios, riachos, brejos, cachoeiras e lagoas costeiras.

Em cada localidade examinamos todos os biótopos favoráveis: vegetação marginal, folhas submersas, ramos, pedras e substratos (Figura 4C e D; 5A e B) como sacos plásticos e caixas. Os exemplares coletados foram acondicionados em potes plásticos com água do local de coleta, acondicionados em bolsa térmica para o transporte até o local atuando como laboratório improvisado (Figura 5C-E). Posteriormente os animais foram colocados em pequenos aquários, para transporte até o laboratório da UERJ e sob estereomicroscópio (Figura 5F) foram submetidos à triagem e primeiros procedimentos de curadoria, como a retirada do excesso de substrato e a separação dos diferentes morfotipos (Figura 5G), seguindo os aspectos gerais das conchas e partes moles uma vez que é comum existir diferentes espécies em um único local de coleta (Figura 5H-J).

Figura 4- Localidades de coleta recentemente amostradas, na busca de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925 e *G. leucaspis* (Ancey, 1901) nas suas respectivas localidades-tipo.

Legenda: (A-C) Rio das Velhas (Lassance, MG). (B) Mostrando a forma e local de coleta, ambiente propício à coleta de ancilídeos, menor correnteza. (C) Retirada do substrato e acondicionamento para o transporte. (D) Riacho São Gonçalo (Lassance, MG). (E) Rio Coxipó (Cuiabá, MT) e (F) Rio Cuiabá (Cuiabá, MT), coletores utilizando conchas de captura e busca ativa.

Fonte: Fotos de L.E.M. Lacerda.

Figura 5 - Localidades de coleta e alguns procedimentos realizados no campo e no laboratório.

Legenda: (A) Integrantes do Laboratório de Malacologia da UERJ que participaram da coleta no Dique no Tororó (Bahia, BA). (B) Integrantes do Laboratório de Malacologia da UERJ na margem do rio Cuiabá (Cuiabá, MT). (C) Laboratório improvisado na Pousada do Recanto da Escaramuça (Lassance, MG). (D) Triagem inicial e acondicionamento do material coletado para transportar até o Laboratório de Malacologia da UERJ. (E) Potes com espécimes de diferentes pontos de coleta e suas respectivas etiquetas. (F) Estereomicroscópio Olympus SZH10 utilizado na triagem, dissecções e ilustrações dos espécimes. (G) Procedimento de separação dos distintos grupos, provenientes do mesmo ponto de coleta. Espécimes separados da triagem da figura anterior: (H) *Gundlachia lutzi* Walker, 1925; (I); *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) e (J) *Anisancylus* sp.

Fonte: Fotos de L.E.M. Lacerda, exceto (D) I.C.B. Gonçalves.

3.2.2 Curadoria

A curadoria dos ancilídeos é trabalhosa, pois é necessário separar conchas e partes moles (Santos 2003), uma vez que a preservação dos ancilídeos no álcool, sem a devida separação, tem mostrado que, com o passar do tempo a concha perde a rigidez, proporcionada pelo carbonato de cálcio da camada prismática, restando apenas o perióstraco (camada mais externa da concha), inviabilizando o uso dessas conchas para os estudos de sistemática.

Para evitar esse tipo de problema, no caso dos animais coletados vivos, após a anestesia dos espécimes com nembutal (0,05%) ou mentol (após a diluição dos cristais), pelo período que pode variar de 30 a 120 minutos, dependendo do tamanho dos exemplares, estes foram mortos com água aquecida a 60 ^{o}C (10 segundos de imersão) e, as conchas foram separadas das partes moles sob estereomicroscópio. As conchas foram colocadas para secar em placas de Petri forradas com papel absorvente, protegidas da poeira, e posteriormente acondicionadas em tubos plásticos tipo *eppendorfs*, identificados.

As partes moles foram fixadas em diferentes soluções, de acordo com a finalidade do estudo: Railliet-Henry (modificado para moluscos, segundo Thiengo 1995) para estudos morfológicos e álcool 96º GL para estudos que utilizem a análise molecular.

3.3 **Estudo morfológico**

Para a realização do estudo morfológico, primeiro foi analisado as conchas por diversos caracteres morfológicos e conquiliológicos, conforme explicaremos a seguir e também as partes moles, que tiveram a morfologia externa e interna ilustradas para o estudo comparativo entre os táxons, pelo autor da tese.

3.3.1 Conquiliomorfologia e conquiliometria

A descrição da morfologia da concha, conquiliomorfologia, foi baseada na observação ao Microscópio Óptico (M.O.) e ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), buscando refinar as descrições ou até mesmo detectar novos caracteres diagnósticos. Usualmente para o grupo, em relação à concha, os caracteres de diagnose são observados na teleoconcha (linhas radiais, linhas concêntricas, pelos periostracais) ou na protoconcha (pontuações, linhas radiais, depressão apical e área lisa). Entretanto, em relação à morfologia da concha, buscamos ampliar essas comparações e padronizar os caracteres morfológicos observados.

Para a descrição das conchas, foram usados 18 caracteres discretos, a seguir: forma da concha, forma da abertura da concha pateliforme; projeção do ápice, posição do ápice, sentido do desvio do ápice; forma da protoconcha, escultura da protoconcha, tipos de escultura da protoconcha, disposição das pontuações na protoconcha, número de regiões na protoconcha, proporção da região com pontuações em relação a outra região, depressão apical da protoconcha, forma da depressão apical da protoconcha, profundidade da depressão apical da protoconcha; microescultura na teleconcha projeções filamentosas originadas no perióstraco, comprimento dos pelos periostracais) e mais dois caracteres contínuos, que definiram a espécie como tendo uma concha alta ou baixa (forma geral da concha de acordo com o índice da altura pelo comprimento (A/C)) ou larga ou estreita (forma geral da concha de acordo com o índice da altura pela largura (A/L)).

A visualização da protoconcha fica comprometida quando estão recobertas por microorganismos do ambiente que as impregnam, como por exemplo, algas ou protozoários coloniais sésseis (Santos 2003), que ao aderirem ao perióstraco, impedem a observação da microescultura. Para evitar esse problema é necessário fazer a retirada do perióstraco, submergindo a concha em solução de hipoclorito de sódio (água sanitária) a 5% durante um período que pode variar de 30 a 120 minutos, até a separação do perióstraco. Após esse procedimento, a concha deve ser lavada com água destilada pelo menos três vezes, e depois colocada sobre uma placa de Petri forrada com papel absorvente para secar.

Conforme ressaltado acima, o perióstraco além da impregnação de diversos seres vivos (como algas e protozoários), sua coloração pode sofrer influência do ambiente a

qual está submetida. Geralmente, ancilídeos coletados em brejos com muita matéria orgânica em decomposição, tendem a ter conchas com a cor mais escura, em contrapartida, em águas mais límpidas costumamos encontrar colorações mais claras ou neutras.

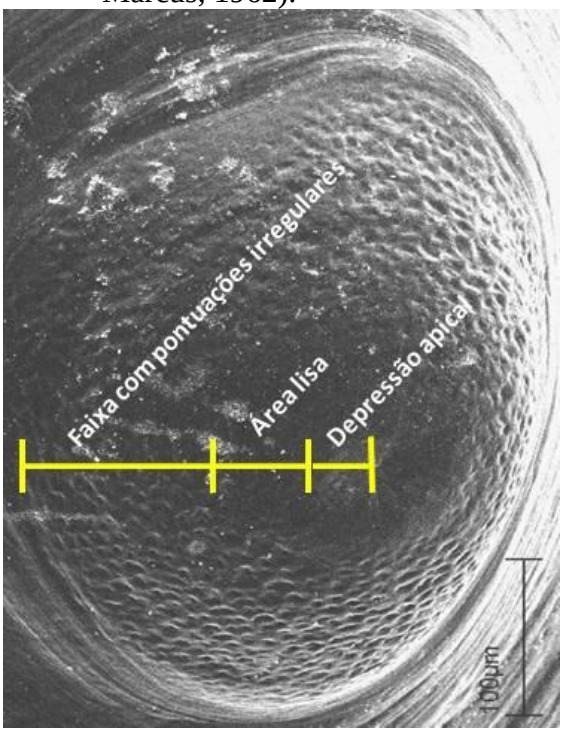
A coloração do perióstraco variou entre os gêneros utilizados para a comparação morfológica com *Gundlachia* e entre as diversas espécies deste gênero, tendo ainda uma considerável variação inter e intrapopulacional. Para padronizar a coloração das distintas populações estudadas foi utilizado como referência o catálogo de cores de Ridgway (1912).

Complementando as observações ao M.O., a microescultura apical foi estudado utilizando imagens geradas pelos seguintes microscópios eletrônicos de varredura (MEV): Laboratório de Microscopia Eletrônica Dr. Monteiro Leal da UERJ (LABMEL), LEO; no Centro de Microscopia Eletrônica de Varredura do Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), e JEOL JSM-6390LV, no Laborabório de Pesquisa em Petrologia Sedimentar e Orgânica (Faculdade de Geologia/UERJ). Após o processo de retirada do perióstraco, lavagem e secagem, metalização por ouro e posterior captura das imagens.

Os desenhos da morfologia externa e os sistemas internos das espécies estudadas foram efetuadas com estereomicroscópio com câmara clara, marca Olympus, modelo SZH10, em aumentos variando de 40 a 70 vezes.

Foram analisadas as três regiões da protoconcha já conhecidas: área de pontuações irregulares, que se localiza na região mais externa; área lisa, que é a área intermediária; e a área mais central da protoconcha, a região da depressão apical (Figura 6). A proporção dessas três regiões na protoconcha e sua variação morfológica tem se demonstrado interessante para a diferenciação de gêneros e espécies de ancilídeos (Hubendick 1964; Lanzer 1996; Santos 2003). Esta análise buscou verificar as proporções relativas dessas áreas, a fim de verificar se existe uma padronização, a qual poderia ser mais um caráter diagnóstico relevante à identificação específica. Para isso, utilizamos o maior eixo observado, por MEV ou M.O., que normalmente se dá entre os quadrantes anterior e posterior esquerdo da protoconcha (Figura 6). A partir daí, fizemos mensurações dessas três regiões, de forma linear, transformando-as em índices com as respectivas amplitudes para cada espécie.

Figura 6 - Detalhe da protoconcha de *Gundlachia ticaga* (Marcus & Marcus, 1962).

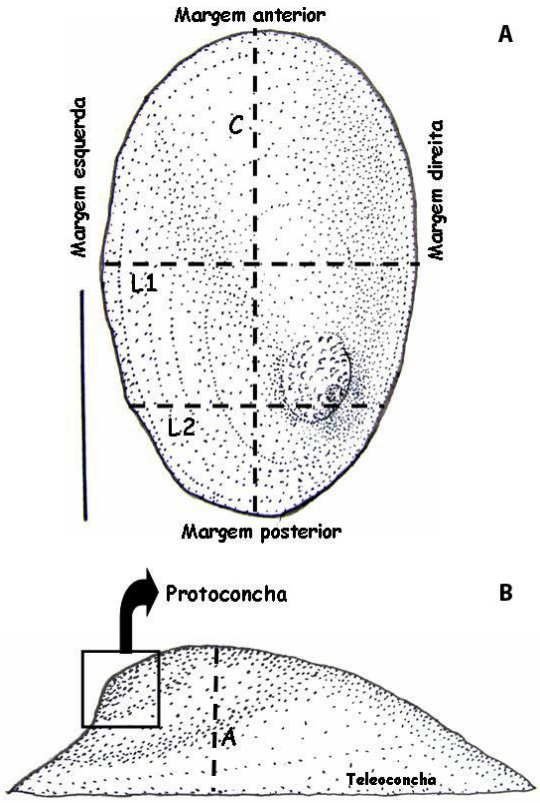


Legenda: indicação das três regiões da protoconcha (faixa com pontuações irregulares, área lisa e depressão apical).
Fonte: O autor, 2015.

3.3.2 Obtenção e análise dos dados conquiliométricos

As conchas foram mensuradas sob estereomicorscópio, com auxílio de paquímetro Mitutoyo (precisão 0,05mm), obtendo-se nove variáveis conquiliométricas: comprimento (C), altura (A), largura anterior (L1) e largura posterior (L2), além das relações entre essas medidas L1/C; L2/C; A/C; A/L1; L2/L1 (Figura 7), segundo Santos (2003) e Lacerda et al. (2011).

Figura 7 - Desenho da concha de *G. ticaga* (Marcus e Marcus, 1962), ilustrando as medidas utilizadas na conquiliometria.



Legenda: (A) Vista dorsal; C= comprimento, L1= largura anterior (região mais larga da concha), L2= largura posterior (ultrapassa o limite posterior da projeção do ápice). (B) Vista lateral; A= altura. Escala= 1mm.
Fonte: Modificado de Lacerda et al., 2011.

Para esta análise, foram utilizadas somente conchas íntegras, para que fossem respeitadas as suas proporções métricas. As variáveis foram utilizadas para fornecer a amplitude de variação conquiliométrica das espécies e ainda testar se, através dessas as espécies podem ser distinguidas umas das outras.

Para isso, os dados foram organizados em planilhas do Excel e submetidos à estatística descritiva básica, utilizando o pacote estatístico SYSTAT 10.2. Após esta análise descritiva, foi testado a normalidade pelo teste Shapiro-Wilk (Arango 2005). As variáveis que não apresentaram uma distribuição normal foram transformadas utilizando logaritmo de (X + 1), seno de X, cosseno de X, inverso de X ou raiz de X e, em seguida, padronizados (Krebs 1998; Zar 1999).

Para verificar quais as variáveis são altamente correlacionadas foi usado a análise de Correlação de Pearson, retirando-as da Análise Discriminante (AD), evitando

que fossem superestimadas na análise. Foram consideradas elevadas as correlações que apresentaram valores maiores ou iguais a 95%.

A Análise Discriminante foi realizada para verificar o grau de discriminação das amostras, através da regressão múltipla das variáveis, as quais geram funções que fornecem uma interpretação espacial e identifica qual destas variáveis tem maior peso na diferenciação das populações de diferentes localidades (Klecka 1982).

A Análise Discriminante gera a Matriz F entre os grupos, que indica a semelhança entre as amostras das populações; quanto menor o índice, mais semelhantes são os grupos (Klecka 1982; Engelman 1997). Esta análise gera ainda a Matriz de Classificação, que classifica os representantes de cada população amostrada, agrupando-os conforme a "identidade morfológica" de cada grupo.

Sempre que possível, utilizamos dados fornecidos por outros autores para realizarmos comparações com as espécies de ancilídeos encontradas em diferentes bacias hidrográficas.

3.3.3 Descrição morfológica das partes moles

Um dos principais problemas que buscamos evitar em nossas observações foi a falta de uniformidade de descrição, ou seja, cada autor utilizou diferentes caracteres da morfologia, e isso dificulta tabular uma matriz de caracteres para uma análise cladística que esclareça as relações de parentesco entre as espécies e gêneros. Essa uniformidade é essencial para análises comparativas (Strong et al. 2008).

Em relação à **morfologia externa**, foram observados 14 caracteres morfológicos, a seguir: comprimento dos tentáculos, forma do palpo oral, número de impressões musculares, forma da impressão muscular anterior direita, forma da impressão muscular anterior esquerda, posição da impressão muscular posterior, forma da impressão muscular posterior, pigmentação no teto do manto, forma do pé, forma da extremidade posterior do pé, quantidade de lobos na pseudobrânquia, relação da largura do lobo ventral em relação ao dorsal da pseudobrânquia, número de lamelas no lobo dorsal da pseudobrânquia e número de lamelas no lobo ventral da pseudobrânquia.

Para a visualização das impressões musculares foi necessário que toda a parte mole do animal fosse submersa em solução de Iodo (lugol), durante um período que

pode variar de 10 a 60 minutos (modificado de Paraense 1981). Após esse período, as impressões musculares ficaram com uma cor mais avermelhada, enquanto o restante do teto do manto ficou um pouco mais claro, facilitando reconhecer as diferentes formas das três impressões observadas.

Em relação à **morfologia interna**, foi efetuado primeiramente as dissecções das diferentes estruturas, conforme observado na figura 8. Foi observado 44 caracteres morfológicos, agrupados da seguinte forma:

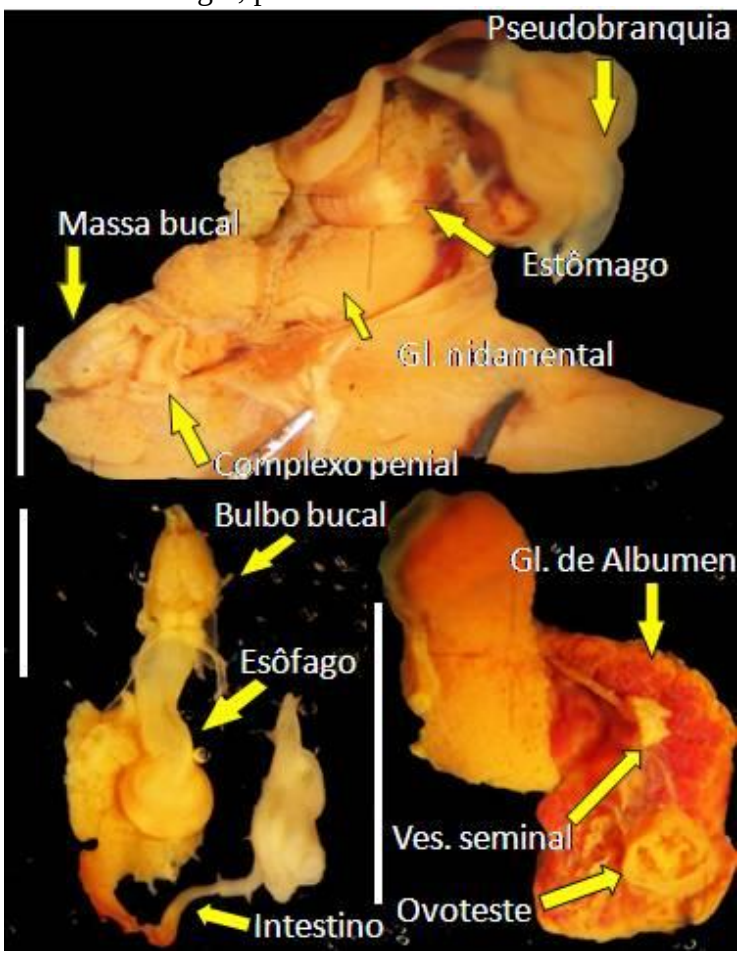
No **sistema digestório** foram observados 16 caracteres: rádula (simetria das cúspides principais do dente raquidiano, tamanho das cúspides principais, número de cúspides do dente raquidiano, forma das cúspides principais do dente raquidiano, forma da placa basal do dente raquidiano em relação às formas geométricas, altura da placa basal do dente raquidiano, largura das três cúspides principais do dente lateral, número de cúspides entre o endocone e o ectocone do dente lateral e número de cúspides do dente marginal) e as demais estruturas (forma do bulbo bucal, comprimento da glândula salivar, diâmetro da glândula salivar, saco radular, estômago, proporção da região muscular do estômago em relação à região pilórica e ceco).

No **sistema excretor** foram observados seis caracteres**:** forma geral do sistema excretor, forma geométrica do sistema excretor, forma da porção proximal do sistema excretor, posicionamento do sistema excretor em relação à borda do manto, proporção do tamanho do ventrículo pelo átrio e porção terminal do sistema excretor.

No **sistema reprodutor** foram observados 17 caracteres**:** forma geral do ovoteste, forma dos ácinos do ovoteste, número de divertículos do ovoteste, posição da vesícula seminal em relação ao ovoteste, número de divertículos da vesícula seminal, forma da glândula nidamental, glândula de albumem, útero, apêndice terminal do útero, comprimento do apêndice terminal do útero em relação à largura da glândula nidamental, largura do apêndice terminal do útero, proporção da vagina em relação à espermateca, próstata, número de folículos da próstata, presença ou ausência de pênis no complexo ejaculatório, flagelo e comprimento do flagelo.

No **sistema nervoso** foram observados cinco caracteres: comissura cerebral, largura da comissura cerebral, forma da porção intermediária do protocérebro, comissura pediosa e largura da comissura pediosa.

Figura 8 - Espécime de *Gundlachia* sp. 2 corado em lugol, parcialmente dissecado.



Legenda: Vista dorsal do sistema digestório (imagem inferior esquerda) e vista dorsal do sistema reprodutor (imagem inferior direita). Escala = 1 mm.
Fonte: O autor, 2015.

A rádula foi retirada do bulbo bucal e separada das partes moles utilizando hidróxido de potássio (KOH, potassa) a 5%; este processo deve ser observado até que a rádula esteja totalmente limpa. Tanto para o estudo ao M.O quanto ao MEV foi necessária a passagem da rádula em sequência alcoólica crescente (60, 70, 80, 90 e 100 GL). Para o M.O., a rádula foi montada sobre lâmina de vidro, com uma gota de glicerina e coberta com lamínula. Para o M.E.V., a rádula foi montada em *stub* (base utilizada para colocar as amostras) sobre a fita dupla face de prata ou carbono e metalizada com ouro.

3.3.4 Análise filogenética baseada em dados morfológicos

As relações obtidas foram submetidas à metodologia cladística proposta por Henning (1966). Para isso, após os estudos morfológicos, os dados obtidos foram tabulados, comparados com as descrições e com as proposições filogenéticas disponíveis, propostos por Hubendick (1978), com base em caracteres morfológicos e por Albrecht et al. (2004, 2007) e Walther et al. (2006, 2010) com base em dados moleculares. É importante ressaltar que o conceito de homologia adotado foi o morfológico, assumindo a definição de homologia como uma característica encontrada em mais de um táxon, adquirida por uma evolução contínua a partir de uma característica compartilhada por um ancestral comum (Sereno 2007).

O programa Nexus (Page 2001) foi usado para a construção da matriz de caracteres e foi realizado a análise cladística no programa TNT (Goloboff et al. 2003), buscando a construção da árvore mais parsimoniosa, ambos para PC utilizando o algoritmo *traditional search*. *Ancylus fluviatilis* Müller, 1774 foi utilizado como grupo externo, por reter caracteres primitivos, como por exemplo, a presença de dois músculos adutores, segundo Hubendick (1964, 1967) em contraposição aos Ancylinae, que possuem três. Adotamos o trabalho de Hubendick (1964, 1967) como referência por conter uma descrição completa do táxon, para a composição e codificação da matriz.

Nossa análise compreendeu representantes dos oito gêneros que possuem registro de ocorrência na região Neotropical (Lanzer 1996; Santos 2003; Lacerda et al. 2013; Ovando et al. 2014). Buscou-se incluir representantes de diferentes gêneros, para analisar qual era o grupo-irmão de *Gundlachia* e verificar quais são as sinapomorfias do grupo. Os táxons terminais utilizados para o grupo interno foram: *Burnupia ingae; Sineancylus rosanae; Ferrissia fragilis e F. gentilis; Laevapex* sp.*; Anisancylus obliquus e A. dutrae; Uncancylus concentricus; Hebetancylus moricandi e Hebetancylus* sp. e *Gundlachia* spp. Dentre essas espécies as únicas que não foram observadas diretamente foram *F. gentilis* e *S. rosanae*. Para ambas se utilizou as descrições originais de Lanzer (1991) e Gutierrez-Gregoric (2012), respectivamente. Para *F. gentilis* utilizamos MEV do parátipo (FZRS 31010), que estava com o ápice corroído e fotos do holótipo de *S. rosanae* (MLP 13221) que foram efetuadas durante a minha visita à coleção do Museu de La Plata, em 2013.

Os caracteres selecionados, após serem definidos e padronizados, foram listados na seção de Resultados e discussão "Definição, padronização e discussão dos caracteres utilizados para a descrição das espécies e análises filogenéticas", para posterior confecção da matriz filogenética. Para as definições dos caracteres, foi seguido o proposto por Sereno (2007) para criação dos nossos caracteres e estados dos caracteres, uma vez que os caracteres devem ser estabelecidos de forma independente e os seus estados estabelecidos mediante uma condição mutuamente exclusiva. Em um total de 70 caracteres foram utilizados, 46 deles codificados como caráter binário e os 26 restantes como multiestados. Os 70 caracteres, foram estudados nos 23 táxons terminais e mais o grupo externo; 20 são relacionados às conchas e 50 às partes moles, sendo 14 à morfologia externa e 36 da morfologia interna.

Uma matriz foi construída com os caracteres não ordenados e sem pesagem *a priori*. Os caracteres cujos estados não puderam ser verificados foram codificados como "?" (*missing data*) na matriz e os não-aplicáveis como "–".

Após a construção da matriz e a análise cladística, as duas árvores geradas foram comparadas e apresentadas.

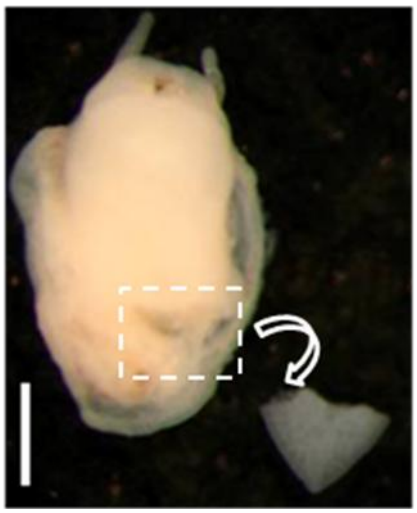
3.4 **Material e procedimentos utilizados nas análises moleculares**

O Laboratório de Malacologia Límnica e Terrestre iniciou uma parceria com o Laboratório de Diagnóstico por DNA (LDD), por meio do Prof. Dr. Elizeu Fagundes de Carvalho e prof. Dra. Dayse Aparecida da Silva. A efetivação desta parceria se concretizou no final de 2012 (30/10/12) com a minha ida para o LDD, a fim de aprender os procedimentos básicos, desde utilizar corretamente uma pipeta até usar os sequenciadores automáticos. O intuito desta etapa do trabalho foi associar os inéditos dados moleculares, que poderiam ser produzidos, aos dados morfológicos que já vinham sendo gerados.

Embora os dados moleculares não tenham sido o objetivo primário da tese, tínhamos em mente que se obtivéssemos resultados positivos após a padronização da metodologia seria um grande avanço para auxiliar nas identificações de espécies crípticas, além de fornecer um maior suporte às relações entre os representantes de *Gundlachia*.

Para a análise molecular utilizamos três espécimes de cada população. É importante ressaltar que a maioria das populações que foram submetidas à análise molecular tiveram os espécimes dissecados para análise morfológica. Após a curadoria, foram acondicionados sob baixas temperaturas, no refrigerador (-15°C) e imersos em álcool absoluto (100% GL) até a extração do DNA.

Figura 9 - Procedimento de extração de tecido para a análise molecular.



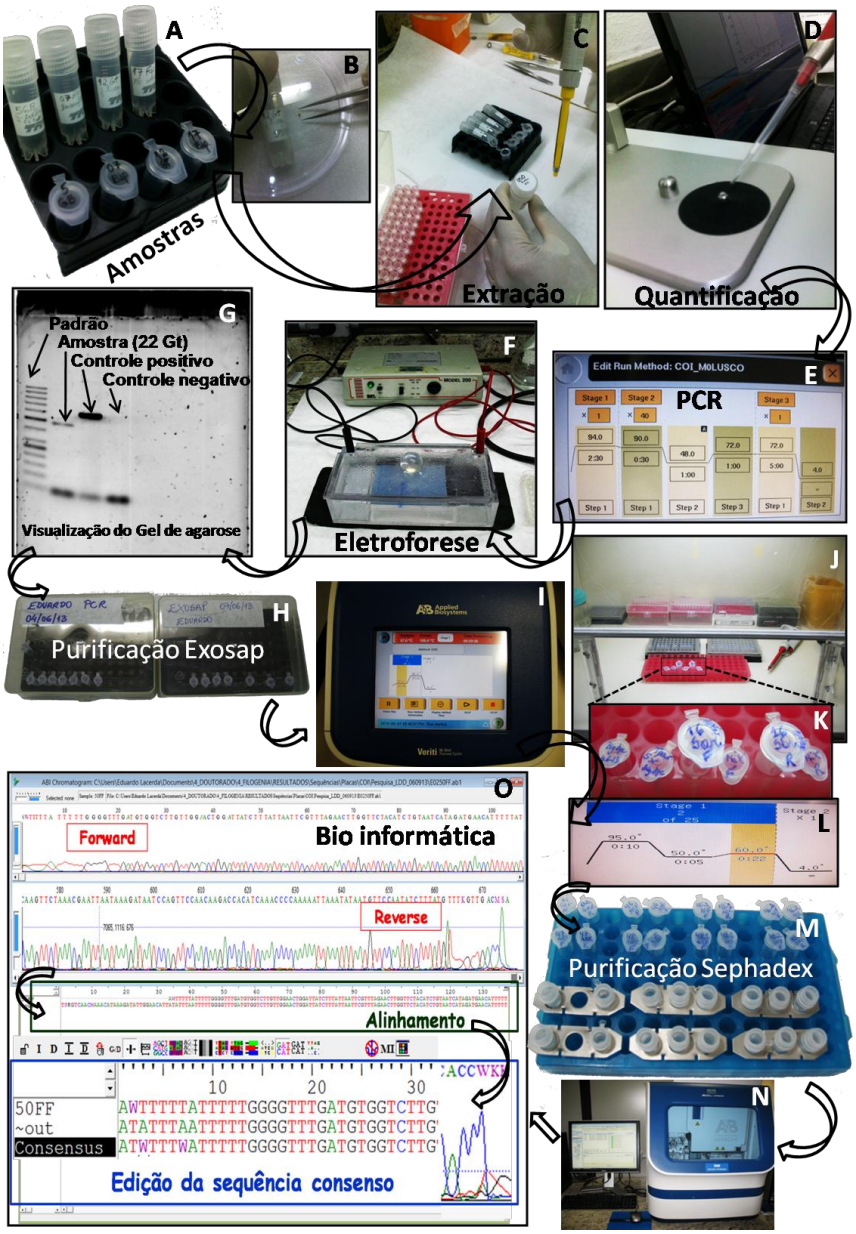
Legenda: Vista dorsal de um ancilídeo ilustrando a retirada do terço posterior do pé, separado para a extração de DNA. Escala = 1 mm.
Fonte: Autor, 2015.

3.4.1 Procedimentos utilizados para obtenção das sequências

O material genético foi obtido dos tecidos do pé muscular dos espécimes (Figura 9) utilizando o protocolo de extração do *Qiagen QIAmp DNA FFPE Tissue kit*. Este protocolo foi modificado do protocolo utilizado pelos outros pesquisadores que trabalham no LDD com peixes (Amaral et al. 2013) e anfíbios (Chaves 2014). O protocolo de extração com todas as etapas encontra-se no anexo A. Após a extração o DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando o aparelho NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*). Mais detalhes anexo B. Disponibilizamos através dos anexos A ao K todos os cálculos e procedimentos necessários para a realização das análises

moleculares. A figura 10 exemplifica as etapas, da extração até a aquisição das sequências consenso, das diferentes espécies analisadas.

Figura 10 - Diferentes etapas do processo de sequenciamento das espécies.



Legenda: **(A)** Quatro amostras em álcool absoluto e seus respectivos microtubos com os códigos que foram os mesmos até o final do processo. **(B)** Separação e maceração do tecido, antes de inseri-lo no microtubo que receberá os reagentes do kit de extração. **(C)** Extração, adicionamento de tampão ATL, para lise celular, o primeiro reagente utilizado na etapa de extração. **(D)** Quantificação, aplicação do DNA extraído no aparelho NanoDrop 2000. **(E)** Tela do termociclador da Applied Biosystems®, apresentando o tempo de ciclagem da PCR. **(F)** Representação de uma eletroforese e alguns componentes necessários (fonte, cuba e gel). **(G)** Visualização de um gel de agarose, demonstrando a quantificação e qualificação do produto amplificado. **(H)** Após a verificação do produto de PCR foi feita a purificação com Exosap. **(I)** Tempo de ciclagem da Exosap no termociclador. **(J)** Capela. **(K)** Microtubos com o BigDye Terminator v3.1. (com fluoróforos) e os *primes Foward* e *Reverse*. **(L)** Tempo de ciclagem desse processo. **(M)** Purificação Sephadex, amostras e colunas em gel. **(N)** Sequenciador automático ABI 3500. **(O)** Etapas da bio informática, após o sequenciamento (verificação das fitas F e R, alinhamento e finalmente edição da sequência consenso).

Fonte: L.E.M. Lacerda, exceto (C) ; (D) Vanusca Maciel.

O estudo molecular consistiu na análise de duas regiões do DNA, a subunidade I do gene Citocromo *c* oxidase (COI) proposta por Folmer et al. (1994) e o 16S do RNAr mitocondrial proposto por Palumbi (1996). O COI foi solucionado por possuir altas taxas de mutação, podendo ser utilizados para comparações de níves taxonômicos menos abrangentes e o 16S pelo conhecimento prévio e disponibilidade desse iniciador junto ao LDD, e por ser uma iniciador mais lento sendo o seu uso indicado para reconstituir relações filogenéticas supraespecíficas (p. ex. gêneros), segundo Arif e Khan (2009). Essas regiões foram amplificadas por PCR (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), utilizando iniciadores específicos. Os detalhes sobre o tempo e a temperatura de desnaturação, anelamento e extensão das fitas, assim como o número de ciclos de cada iniciador pode ser obtido nos anexos C e D. A tabela 1 apresenta os dois Oligonucleotídeos (*primers*, em inglês) específicos utilizados neste estudo.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos específicos (*primers*) utilizados nas análises moleculares.

Primers	Sequência (5' - 3')	Código
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	COIF
HC02198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	COIR
16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	16SF
16Sbr	CCGGTCTGAACTCAGATCA	16SR

Fonte: Folmer et al., 1994; Palumbi, 1996.

Após as amplificações por PCR, os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% (anexo E), após eletroforese (anexo F). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (anexo G) e levado para a visualização no aparelho FM BIO (anexo H).

Ao confirmarmos, pela visualização do gel, que o fragmento de interesse foi amplificado, para todas as amostras analisadas, submetemos o produto de PCR à purificação *Exo*SAP (anexo H). Durante este procedimento, ocorre a ação de duas enzimas contidas nesse conjunto (Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase*-SAP), que atuam na retirada dos restos de iniciadores, DNAs e tampões utilizados na amplificação (Onofri et al. 2006; Brion et al. 2005).

A próxima etapa visa a incorporação de fluoróforos aos fragmentos amplificados (COI e 16S) por meio de uma reação de sequenciamento, utilizando o Kit BigDyeH Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Inc.) (anexo I). Como cada

amostra submetida ao PCR gera fragmentos de DNA de distintos tamanhos os fluoróforos ao se ligarem nesses fragmentos de distintos tamanhos irão ser lidos pelo capilar contido no sequenciador automático, numa etapa futura, para a determinação da posição de cada nucleotídio de uma dada sequência.

Depois de serem retirados do termociclador, as amostras foram submetidas à purificação Sephadex G-50 (anexo J) que se trata de uma coluna de resina, a qual os fragmentos do DNA com fluoróforos são aplicados sobre a coluna e centrifugados para a retenção de fluoróforos livres e separação dos ácidos nucleicos por tamanho. Por fim, os produtos do sequenciamento foram processados no sequenciador automático ABI 3500 *capillary system* (*Applied Biosystems, Inc.*) (anexo K).

3.4.2 **Análises moleculares**

As sequências foram visualizadas e alinhadas no programa BioEdit (*Version* 7.1.3.0) com o aplicativo *Clustal W Multiple Alignment* implementado no programa (Thompson et al. 1997); houve a edição a olho nu e a criação da sequência consenso, a partir das fitas *Foward* and *Reverse*. Quase todas as novas sequências geradas já foram introduzidas no *BOLD database* (http://www.barcodinglife.com) sob os projetos acrônimos ANCY e CSRM.

No programa MEGA (*Version* 5.20) (Tamura et al. 2007), usamos o teste de *Neighbor-joining* (NJ), com base no modelo Kimura 2-parâmetros (K2P), para calcular a distância genética e verificar os níveis de divergência genética entre as sequências estudadas.

As relações filogenéticas foram testadas utilizando a análise de Máxima Verossimilhança, do inglês, *Maximum Likelihood* (ML), utilizando para isso o *Model test* para determinar o melhor modelo de evolução das sequências com base no critério de Akaike (AIC), conforme aplicado para peixes por Amaral et al. (2013) e para moluscos por Lacerda et al. (2015). Utilizamos os genótipos de *Anisancylus* Pilsbry, 1924*; Gundlachia* Pfeiffer, 1849*; Hebetancylus* Pilsbry, 1913; *Uncancylus* Pilsbry, 1913*; Burnupia* Walker, 1912; *Ferrissia* Walker, 1903 e *Laevapex* Walker, 1903 como representantes do grupo interno. As sequências dos representantes de *Ancylus* (Müller,

1774), *Biomphalaria* (Preston, 1910) *Physa* e *Lymnaea* foram retiradas do GenBank e usadas como grupo externo (Tabelas 02 e 03).

Tabela 02- Lista das sequências utilizadas do GenBank para análise com o iniciador molecular Citocromo oxidase I (COI), como grupo-externo.

Espécies	**Localidade**	**Autor**	**Código**
Ancylus fluviatilis	Irlanda	Walther et al. 2006	DQ328270
Ancylus scalariformis	Macedônia	Albrecht et al. 2005	DQ301839
Ancylus tapirulus	Macedônia	Albrecht et al. 2005	DQ301837
Biomphalaria glabrata	Brasil	Martin et al. 1999	AF199092
Biomphalaria tenagophila	Brasil	Martin et al. 1999	AF199089
Biomphalaria straminea	Brasil	Martin et al. 1999	AF199084
Biomphalaria peregrina	Argentina	Standley et al. 2009	GU168593

Legenda: Lista das espécies, com as localidades de coleta, os trabalhos que determinaram as sequências e os seus respectivos códigos no GenBank.
Fonte: GenBank, 2013.

Tabela 03- Lista das sequências retiradas do GenBank para análise com o iniciador molecular 16S, como grupo-externo.

Espécies	**Localidade**	**Autor**	**Código**
Ancylus scalariformis	Macedônia	Albrecht et al., 2005	DQ301839
Ancylus tapirulus	Macedônia	Albrecht et al. 2005	DQ301837
Biomphalaria glabrata	Brasil	Martin et al. 1999	AF199092
Biomphalaria tenagophila	Brasil	Martin et al. 1999	AF199089
Biomphalaria tenagophila	Brasil	Tuan et al. 2013	KF926154
Biomphalaria straminea	Brasil	Martin et al. 1999	AF199084
Biomphalaria straminea	Hong Kong	Martin et al. 1999	AF199085
Biomphalaria peregrina	Argentina	Standley et al. 2009	GU168593
Biomphalaria crequii	Chile	Collado et al. 2003	JX567602
Physa pomilia	EUA	Wethington e Lydeard 2007	EU038364
Lymnaea diaphana	Chile	Bargues et al. 2012	JF909501

Legenda: informando os táxons, a localidade de coleta, os trabalhos que determinaram as sequências e os seus respectivos códigos no GenBank.
Fonte: GenBank, 2013.

Até o presente momento, apenas o trabalho do nosso grupo (Lacerda et al. 2015) utilizou espécimes de ancilídeos coletadas no território brasileiro em estudos de biologia

molecular. Todavia existem estudos utilizando espécies da região Neotropical. Walther et al. (2006a,c) estudaram *Uncancylus* sp. da Argentina (Genbank DQ452035 e DQ328269), *Hebetancylus excentricus* (Morelet, 1851) dos Estados Unidos (Genbank GU391111-3) para COI e *Gundlachia radiata* (Genbank AY465064) para o gene nuclear 28S. Albrecht et al. (2007) utilizaram *Gundlachia cf. radiata* da Costa Rica (Genbank EF 012181) e *H. excentricus* (Genbank EF012182) do México para o gene COI. As sequências de COI disponíveis no GenBank foram inseridas e discutidas nesse estudo.

3.5 **Identificação específica**

Uma das discussões mais importantes da atualidade, no âmbito da biologia da conservação, está no conceito de espécie utilizado, que pode resultar em diferentes estimativas de parâmetros da biodiversidade, uma vez que utiliza como unidade fundamental de análise as espécies (Aleixo 2009). Diante disto, buscamos explicitar o conceito de espécie adotado nesse estudo.

Utilizamos o conceito filogenético de espécie. Segundo esse conceito, as populações diferenciadas e com um histórico de evolução independente, ainda que recente, de outras populações próximas devem ser definidas como espécies distintas (Aleixo 2007, 2009). Ele se diferencia do conceito biológico de espécie, nesse aspecto, por considerar essas populações como espécies distintas só mediante ao grau de isolamento reprodutivo, que na maioria dos estudos taxonômicos não são observados.

Por esse motivo adotamos o primeiro conceito, apesar de estar ciente que alguns autores consideram esse conceito responsável por uma verdadeira "inflação taxonômica" (Alroy 2003; Issac et al. 2004). Não entraremos nessa discussão, mas acreditamos que o conceito escolhido se adequa melhor ao nosso conjunto de dados, mais detalhes sobre esse assunto ver Issac et al. (2004), Aleixo (2007, 2009) e Strong et al. (2008).

Para a identificação das espécies os caracteres obtidos foram tabulados e comparados com as espécies já identificadas, utilizando bibliografia especializada (Aguayo 1946; Hubendick 1964, 1967; Basch 1959; Burch 1975; Lanzer 1991, 1996; Mirolli 1960; Santos 1995, 1999, 2000, 2003; Santos et al. 2009, Lacerda et al. 2011,

2013; Ovando et al. 2014) e a coleção de referência de ancilídeos da UERJ, buscando validar ou não as espécies já conhecidas e ampliar as informações morfológicas sobre as demais. Foram sumarizados em uma tabela os principais caracteres morfológicos observados, visando facilitar as identificações e comparações entre as espécies estudadas.

Esses caracteres obtidos foram comparados com os já descritos para todas as espécies já identificadas dos demais gêneros neotropicais, utilizando bibliografia especializada e dados obtidos de coleção, a fim de descrever as possíveis espécies novas, destacando as autapomorfias, utilizando-as para a diagnose de cada uma.

A análise filogenética auxiliou na verificação do monofiletismo e nas inter-relações das espécies de *Gundlachia*, frente aos demais ancilídeos neotropicais. Os dados moleculares foram confrontados com os dados morfológicos, buscando contribuir ainda mais com a resolução taxonômica e filogenética do grupo de forma independente.

3.6 **Distribuição geográfica**

Elaboramos os mapas de distribuição das espécies utilizando os dados das coletas efetuadas, das coleções científicas visitadas (material examinado) e de literatura. Para isso, os registros de ocorrência das diferentes espécies de ancilídeos, foram organizados em um banco de dados composto pelas diferentes espécies, após a sua correta identificação.

O mapa de distribuição geográfica foi gerado, utilizando um programa de georreferenciamento (ArcGis), plotando cada espécie nas localidades onde foram coletadas, a partir de suas coordenadas geográficas. Os registros de ocorrência que não tiverem as coordenadas geográficas foram georreferenciadas com o auxílio do programa Google Earth. As distribuições conhecidas atualmente de cada espécie, incluindo os novos registros de ocorrência, serão apresentadas nos resultados.

4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O estudo do material atribuído ao gênero *Gundlachia* nos levou ao seguinte resultado. Primeiramente serão apresentados os caracteres utilizados para a descrição das espécies e composição da matriz de caracteres que foi utilizada na análise cladística, que será apresentada na seção 4.4.

A lista sistemática abaixo segue Bouchet e Rocroi (2006) para as categorias supra-familiares.

Mollusca Linnaeus, 1758

Gastropoda Cuvier, 1797
Heterobranchia Gray, 1840
Pulmonata Cuvier, 1814
Basommatophora Kefferstein, 1864
Hygrophila Férussac, 1822
Planorboidea Rafinesque, 1815
Planorbidae Rafinesque, 1815
Ancylinae Rafinesque, 1815
***Gundlachia* Pfeiffer, 1849**
***Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913**
***Gundlachia radiata* (Guilding, 1828)**
***Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901)**
***Gundlachia lutzi* Walker, 1925**
***Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853)**
***Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962)**
***Gundlachia* n. sp. 1**
***Gundlachia* n. sp. 2**

4.1 **Definição, padronização e discussão dos caracteres utilizados nas análises filogenéticas e na descrição das espécies.**

Caracteres discretos

Morfologia externa das conchas

1. Forma da abertura da concha pateliforme: (0) elíptica, (1) arredondada, (2) alongada. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

A forma da concha historicamente tem sido utilizada para auxiliar na identificação das espécies de moluscos, apesar das variações que sofre sob influência do

ambiente. Diante disto, buscamos padronizar e estabelecer alguns parâmetros para a padronização dos caracteres utilizados na descrição da mesma, assim como os seus distintos estados.

A forma arredondada possui a largura igual ao comprimento, conforme observado em *Ancylus* Müller, 1773, *Anisancylus*, *Burnupia* e *Sineancylus* (Gutiérrez Gregoric 2011: fig. 2). Elíptica quando o comprimento é até o dobro da largura, conforme observado na maioria das espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849, *Uncancylus* Pilsbry, 1913 e *Laevapex* Walker, 1903 (Figura 1A-E). Alongada quando o comprimento é maior que o dobro da largura, conforme observado em *Hebetancylus* Pilsbry, 1913 (Ovando et al. 2014: fig. 9a; Figura 1F).

2. Projeção do ápice: (0) projetado, (1) não projetado. (Ci= 1,00; Ri= 0,00).

A projeção apical ocorre em vários gêneros dentro de Ancylinae (*Anisancylus*; *Gundlachia*; *Hebetancylus*; *Uncancylus*, *Burnupia* e *Laevapex* (Santos 2003: fig. 33; Figura 1A, B, D-G), todavia alguns grupos não apresentam tal caráter como é o caso de *Ferrissia* Walker, 1903 (Figura 1C) e *Sineancylus* (Figura 1H).

3. Posição do ápice: (0) centralizado e posterior, (1) centralizado e anterior, (2) descentralizado e posterior. (Ci = 0,50; Ri= 0,00).

O gênero *Ancylus* é considerado um grupo mais basal dentro dos Ancylidae e possui o ápice projetado na região central. O ápice central foi definido por estar sobre a linha mediana da concha, como observado em *F. irrorata* (Guilding, 1828) (Ovando et al. 2014: fig 6a). O ápice na região posterior (*Ancylus*) (Hubendick 1964: fig. 27) ou anterior (*Sineancylus*) (Figura 1H) por estar localizado nesta região em relação ao eixo transversal, tomado na linha mediana da concha. Em contrapartida, *Gundlachia* apresenta o ápice na região posterior, mas descentralizado em relação à linha longitudinal (Figura 1D).

4. Desvio do ápice: (0) sem desvio, (1) com desvio. (Ci = 0,33; Ri= 0,88).

O ápice com desvio foi definido por apresentar uma projeção lateral do eixo logitudinal da concha, como é observado em *Anisancylus*, *Gundlachia*, e *Uncancylus* (Figura 1A, D e G). *Ancylus* (Hubendick 1964: fig. 27), *Ferrissia* (Figura 1C) e *Sineancylus* (Figura 1H) não apresentam desvio do ápice.

5. Sentido do desvio do ápice: (0) para trás, (1) para a direita, (2) para atrás e para a direita (Ci = 0,33; Ri= 0,95).

O ápice desviado para trás é observado em *Ancylus* (Hubendick 1964: fig. 27); e em *Uncancylus* (Figura 1D). Já o ápice desviado para a direita ocorre em *Anisancylus*,

Gundlachia, *Hebetancylus*, *Ferrissia*, *Burnupia* e *Laevapex* (Figura 1A-F).

6. Forma da protoconcha: (0) aguda, (1) plana, (2) obtusa, (3) arredondada. (Ci = 0,20; Ri= 0,00).

As formas da protoconcha foram determinadas, em vista lateral, de acordo com as formas geométricas representadas.

7. Escultura da protoconcha: (0) com escultura, (1) sem escultura. (Ci= 0,50; Ri= 0,00).

A escultura pode ser definida como a presença de estruturas particulares sobre a superfície da protoconcha, como por exemplo, pontuações, conforme observado em *Gundlachia* (Lacerda et al. 2011: fig. 2) ou linhas, conforme observado em *Ferrissia* (Lacerda et al. 2015: fig. 3).

8. Tipos de escultura na protoconcha: (0) linhas radiais, (1) pontuações, (2) linhas radiais e pontuações. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

As linhas radiais são definidas como estruturas dispostas em raios, que vão em direção a depressão apical na protoconcha, conforme visto em *Ferrissia*. As pontuações são pequenas depressões subcirculares dispostas na protoconcha, conforme observado em *Gundlachia* (Lacerda et al. 2011: fig. 2), *Burnupia* (Lacerda e Santos 2011: fig. 1), *Laevapex* (Santos et al. 1989: fig. 1) e *Uncancylus* (Santos et al. 2009: fig. 2; Ovando 2014: fig. 11). A presença de linhas e pontuações é observada somente em *Anisancylus obliquus* (Broderip e Sowerby, 1832) (Ovando 2014: fig. 2).

9. Disposição das esculturas na protoconcha: (0) regular, (1) irregular. (Ci= 1,00; Ri= 1,00).

A escultura regular ocorre quando se apresentam de forma ordenada na protoconcha, conforme observado em *Burnupia ingae* (Lacerda e Santos 2011: fig. 1) e irregular como observado em *Gundlachia* (Lacerda et al. 2011: fig. 2).

10. Número de regiões na protoconcha: (0) duas regiões, (1) três regiões. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

Foram analisadas e definidas as três regiões na protoconcha, em *Gundlachia*: área de pontuações irregulares, que se localiza na região mais externa; área lisa, que é a área intermediária; e a área mais central da protoconcha, a região da depressão apical (Figura 6). A protoconcha dos ancilídeos é definida por ter uma região, geralmente, ornamentada que pode ter pontuações, por exemplo, *Gundlachia* (Santos 2003: 46c; Lacerda et al. 2011: fig.2) ou linhas radiais em *Ferrissia* (Ovando et al. 2014: fig. 6c; Lacerda et al. 2015: fig. 3). Em contrapartida, alguns grupos, como *Hebetancylus* só

apresentam duas regiões: uma lisa, que corresponde à maior parte da protoconcha e à depressão apical (Ovando et al. 2014: fig. 9a).

11. Proporção da região com escultura da protoconcha em relação às demais regiões: (0) acima de 3/4, (1) entre 1/2 e 3/4. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

12. Depressão apical da protoconcha: (0) presente, (1) ausente. (Ci= 1,00; Ri= 0,00).

Os moluscos límnicos pateliformes, como os ancilídeos e acroloxídeos apresentam uma depressão apical pequena (Santos 2003; Ovando et al. 2014; Hubendick 1962) que pode variar em forma.

13. Proporção da depressão apical da protoconcha em relação à região lisa: (0) curta, (1) ampla. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

A depressão apical foi definida como curta, quando o seu raio for menor ou igual a 1/4 em relação ao raio da região lisa (Figura 26C) e amplo quando for maior ou igual 1/3 (Figura 17A).

14. Profundidade da depressão apical da protoconcha: (0) rasa, (1) profunda. (Ci= 0,20; Ri= 0,00).

Definimos como rasa a depressão apical, quando ela está quase no nível da protoconcha (Figura 17A) e profunda quando se apresenta como uma escavação (Figura 31C).

15. Microescultura na teleoconcha: (0) linhas radiais, (1) linhas espirais e (2) ausente. (Ci= 0,14; Ri= 0,71).

As linhas radiais podem ou não estar presentes, como é o caso de *G. ticaga* observado por Lacerda et al. (2011: fig. 2) em alguns indivíduos de distintas populações. As linhas espirais foram definidas quando as suas trajetórias sofrem um deslocamento no sentido horário, dando um padrão espiralado, conforme observado em *G. bakeri* (Santos et al. 2003: fig. 41a).

16. Projeções filamentosas originadas no perióstraco: (0) presentes, (1) ausentes. (Ci= 0,50; Ri= 0,95).

As projeções filamentosas originadas no perióstraco são conhecidas como pelos periostracais, que podem ocorrer em toda a teleoconcha (Hubendick 1964; Santos 2003; Ovando et al. 2014), conforme observado em *Uncancylus* (Ovando 2014: fig. 11g).

17. Comprimento dos pelos periostracais: (0) curto, (1) longo. (Ci= 1,00; Ri= 0,00).

Os pelos periostracais são bastante conhecidos e até então tratados como um caracter exclusivo de *U. concentricus* dentre os ancilídeos Neotropicais (Hubendick 1964; Santos 2003; Ovando et al. 2014). Entretanto, em material recentemente coletado

(Nov/2014) de *Burnupia ingae* Lanzer, 1991, observamos a presença de curtas projeções do perióstraco (Ovando et al. em preparo) que haviam sido detectadas mas tratadas como pequenas saliências pela própria autora da espécie (Lanzer 1991: fig. 13C), e como linhas radiais na teleoconcha por Lacerda e Santos (2011: fig. 1).

Caracteres contínuos

18. Forma geral da concha de acordo com o índice da altura pelo comprimento (A/C): (0) alta, (1) baixa. (Ci= 0,20; Ri= 0,00).

Lanzer (1996: figs. 30, 31) utilizou as médias dos índices morfométricos como descritor das formas. Segundo a autora, as conchas que possuíam o índice da altura pelo comprimento (A/C) maior ou igual do que 0,35 deveriam ser consideradas uma concha alta e quando menor do que 0,35 baixa. Utilizamos a média geral das distintas populações para definir o estado desse caráter.

19. Forma geral da concha de acordo com o índice da altura pela largura (A/L): (0) estreita, (1) larga. (Ci= 0,50; Ri= 0,00).

Já a utilização do índice altura pela largura (A/L), tendo como o seu limite de corte 0,65, segundo Lanzer (1991: fig. 31), definia se as conchas de uma determinada espécie deveriam ser consideradas estreitas (< 0,65) ou largas (≥ 0,65). Utilizamos a média geral das distintas populações para definir o estado desse caráter. Por exemplo, *G. bakeri* possui uma concha alta (A/C= 0,36; N= 49) e estreita (A/L1= 0,51; N= 49).

Morfologia externa das partes moles

20. Tentáculos: (0) curtos, (1) longos. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

Os tentáculos foram considerados curtos quando o comprimento é menor do que a distância interocular (Figura 19C) e longos quando o comprimento maior ou igual à distância interocular (Figura 28C).

21. Forma do palpo oral: (0) inteiro, (1) bífido. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

O palpo oral inteiro foi definido quando a borda anterior da região cefálica é continua, conforme observada em *B. ingae* (Lacerda e Santos 2011: fig. 2) e bífida quando a parte distal da região cefálica está dividida em duas partes (Figura 28C).

22. Número de impressões musculares: (0) duas, (1) três. (Ci= 1,00; Ri= 1,00).

Ancylus fluviatilis (Müller, 1774) possui somente duas impressões musculares (Hubendick 1964: fig. 33). Os ancilídeos neotropicais apresentam três impressões musculares (Figura 11C).

23. Forma da impressão muscular anterior direita: (0) alongada, (1) elíptica. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

Definimos como alongada quando a largura da impressão for três ou mais vezes maior do que o comprimento (Figura 38A) e elíptica quando a largura for até duas vezes maior que o comprimento (Figura 19A).

24. Forma da impressão muscular anterior esquerda: (0) elíptica, (1) arredondada, (2) alongada. (Ci= 0,14; Ri= 0,00).

Definimos como arredondada, quando a largura foi igual ao comprimento; elítica quando a largura for até duas vezes maior que o comprimento e arredondada quando a largura da impressão for três ou mais vezes maior do que o comprimento.

25. Posição da impressão muscular posterior: (0) ausente, (1) central, (2) esquerdo. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

As posições desse músculo foram baseadas na linha média do corpo do animal. O músculo posterior esquerdo é contínuo, formando um C invertido com a MAD está ausente em *Ancylus fluviatilis*, conforme figurado por Hubendick (1962, fig. 33). Os demais Ancylinae apresentam esse músculo e os demais anteriores, formando um estojo que abriga todos os órgãos da massa visceral. Em *Acroloxus lacustris* (Linnaeus, 1758) esse músculo está posicionado no lado direito da cavidade palial, por se tratar de um animal dextrógiro (Hubendick 1962: fig. 13). Entretanto algumas espécies como *Gerstfeldtiancylus kotyensis* Starobogatov, 1989 (Shirokaya e Röpstorf 2004: fig. 4F) (Acroloxidae) e *Sineancylus rosanae* (Gutiérrez Gregoric 2012: fig. 8) apresentam o músculo posicionado no centro. Os demais ancilídeos apresentam a impressão muscular posterior no lado esquerdo (Ovando et al. 2014: fig. 3).

26. Forma da impressão muscular posterior: (0) ausente, (1) alongada, (2) arredondada, (3) elíptica. (Ci= 0,11; Ri= 0,00).

27. Pigmentação no teto do manto: (0) ausente, (1) presente. (Ci= 0,33; Ri= 0,90).

A ausência de pigmentação na superfície do manto é observada em *Burnupia ingae* (Lanzer 1991, fig. 15) e em *F. irrorata* (Harrison 1983, fig. 3B). Algumas espécies de ancilídeos apresentam o teto do manto pigmentado, como é o caso da maioria das espécies de *Gundlachia* (Santos 2003, Lacerda et al. 2011; Ovando et al. 2014). Todavia algumas espécies podem apresentar populações com ou sem pigmentação, como é o caso de *A. dutrae* (Santos 1994: figs. 6-8) e *S. rosanae* (Gutiérrez Gregoric 2012: figs. 7 e 8).

28. Forma do pé: (0) alongada, (1) arredondada. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

O pé foi definido como arredondado quando a largura for igual ao comprimento (Gutiérrez Gregoric 2012: figs. 7 e 8). Alongado quando o comprimento for maior que a largura (Figura 19D).

29. Forma da extremidade posterior do pé: (0) arredondada, (1) truncada, (2) afilada. (Ci= 0,17; Ri= 0,00).

A forma arredondada foi definida a partir de uma borda obtusa (que forma um ângulo obtuso) (Figura 28B), o truncado tem um formato retangular (que tem um ângulo reto) (Figura 19E) e o afilado tem um formato triangular (que tem um ângulo agudo) (Figura 19D).

30. Quantidade de lobos na pseudobrânquia: (0) um, (1) dois. (Ci= 0,33; Ri= 1,00).

Em geral os grupos considerados mais basais como *Ancylus* (Hubendick, 1964: fig. 30) e *Ferrissia* (Hubendick 1967: fig. 75) dentro dos moluscos límnicos pateliformes só apresentam um lobo na pseudobrânquia. O gênero *Sineancylus* também só apresenta um lobo (Gutiérrez Gregoric 2012, fig. 9). Em contrapartida os demais gêneros neotropicais apresentam dois lobos na pseudobrânquia (Hubendick 1964, 1967; Santos 1995, 2003).

31. Largura do lobo ventral em relação ao dorsal da pseudobrânquia: (0) Ausente, (1) menor, (2) igual, (3) maior. (Ci= 0,17; Ri= 0,00).

Em *G. ticaga* o lobo ventral tem a mesma largura do dorsal (Figura 42E), enquanto em *G. radiata* o dorsal é bem maior (Figura 19H).

32. Número de lamelas no lobo dorsal da pseudobrânquia: (0) Menor ou igual a três, (1) maior que quatro. (Ci= 0,50; Ri= 0,00).

As lamelas são geralmente finas e delicadas e tem a função de aumentar a superfície de contato com a água, aumentando a eficiência das trocas gasosas. Lacerda (2011) observou que espécimes de *G. ticaga* ocorrente em localidades mais impactadas, com lançamento de esgoto *in natura*, apresentavam um número maior de lamelas do que as encontradas em locais mais preservados. Todavia, isso deve ser estudado, estabelecendo um desenho amostral apropriado, para avaliar se a variação no número de lamelas se trata de plasticidade ecofenotípica, conforme já foi observado, para as conchas, por Basch (1963) e Lacerda et al. (2011).

33. Número de lamelas no lobo ventral da pseudobrânquia: (0) ausente, (1) de uma a três, (2) de quatro a seis, (3) maior ou igual a sete. (Ci= 0,25; Ri= 0,83).

Morfologia interna das partes moles

Rádula

34. Simetria das cúspides principais do dente raquidiano: (0) simétricas, (1) assimétricas. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

As cúspides principais simétricas são observadas em *Ancylus* (Hubendick 1967: fig. 32), *Ferrissia* (Harrison 1983: fig. 4; Lanzer 1991: fig. 12) e *Burnupia* (Lanzer 1991: fig. 22). As assimétricas ocorrem nos demais gêneros neotropicais (Santos 1995, 1989, 2003; Ovando et al. 2014).

35. Tamanho das cúspides principais: (0) longo, (1) curto. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

As cúspides principais curtas são aquelas que não alcançam a metade da altura da placa basal. As longas alcançam ou ultrapassam a metade da altura da placa basal (Figura 13J).

36. Número de cúspides do dente raquidiano: (0) menor ou igual a sete, (1) maior que oito. (Ci= 1,00; Ri= 0,00).

Segundo Meier-Brook (1979) a redução do número de cúspides dos dentes laterais e marginais do gênero *Gyraulus* Charpentier, 1837 (Planorbidae) pode ser interpretado como um caráter evolutivo. *Sineancylus rosanae* (Gutiérrez Gregoric 2012, fig. 16) tem três cúspides, enquanto *Acroloxus lacustris* (Hubendick 1962: fig. 15) e *Ferrissia fragilis* (Say, 1863) (Lacerda et al. 2014: fig. 5), possui cinco cúspides no dente raquidiano.

37. Forma das cúspides principais do dente raquidiano: (0) afilada, (1) truncada. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

Definimos como cúspides principais truncadas quando a extremidade não forma um ângulo agudo, em contrapartida a afilada forma um ângulo agudo. *Gundlachia bakeri* e *A. lacustris* (Hubendick 1962: fig. 15) apresentam as cúspides principais truncadas (Figura 34B), enquanto *S. rosanae* (Gutiérrez Gregoric 2012: fig. 16) e *G. radiata* (Figura 21A) afilada.

38. Forma da placa basal do dente raquidiano em relação às formas geométricas: (0) retangular; (1) trapezoidal. (Ci= 0,25; Ri= 0,89).

A forma da placa basal retangular é observada em *A. lacustris* (Hubendick 1962, fig. 15), *Sineancylus* (Gutiérrez Gregoric 2012: fig. 16), *A. obliquus* (Ovando et al. 2014: fig 4a), *Burnupia ingae* (Lanzer 1991: fig. 22c), *Hebetancylus moricandi* (d'Orbigny, 1837) (Lanzer 1996: fig. 28; Ovando et al. 2014: fig 10a) e *Ferrissia fragilis* (Lacerda et al. 2014: fig. 5a). Em contrapartida, *Uncancylus concentricus*

(Ovando et al. 2014: fig 10d), *Laevapex vasi* Santos, 1989 (Santos 1989: fig. 12) *e Gundlachia* (Lanzer 1991: fig. 28; Ovando et al. 2014: fig 4e, h) apresentam a placa basal com forma trapezoidal (Figura 21B).

39. Altura da placa basal do dente raquidiano: (0) longa (1) curta. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

A placa basal é longa quando a largura da base é menor que a altura, conforme observado em *H. moricandi* (Ovando et al. 2014: fig. 10a) e curta quando a largura da base maior ou igual a altura (Figura 34B).

40. Largura das três cúspides principais do dente lateral: (0) diferentes, (1) iguais. (Ci= 0,50; Ri= 0,00).

41. Número de cúspides entre o endocone e o ectocone do dente lateral: (0) zero, (1) um, (2) dois, (3) maior ou igual a três. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

O número de cúspides acessórias foi quantificado, quando presentes, entre o endocone e o ectocone (Figura 34B).

42. Número de cúspides do dente marginal: (0) até dez, (1) mais do que dez. (Ci= 0,20; Ri= 0,00).

A rádula tende a sofrer uma redução de tamanho nos dentes e um aumento no número de cúspides na medida em que se aproxima da margem da rádula (Ohlweiler e Lanzer 1993; Santos 2003). Algumas vezes foram tratados nas descrições como multicuspidados, devido à dificuldade de quantificação dos numerosos dentes apenas à microscopia óptica (Figura 21F).

<u>Sistema digestório</u>

43. Forma do bulbo bucal: (0) arredondada, (1) alongada. (Ci= 0,17; Ri= 0,00).

A forma do bulbo bucal é arredondada quando a largura é igual ao comprimento, conforme observado em *Ancylus* (Hubendick 1964: fig. 36), *Anisancylus*, *Burnupia* e alongada quando o comprimento é pelo menos uma vez e meia a largura, conforme observado em *G. radiata* (Figura 22D).

44. Comprimento da glândula salivar: (0) longo, (1) curto. (Ci= 0,50; Ri= 0,00).

As glândulas salivares foram consideradas curtas quando sua extensão não ultrapassava a porção distal do bulbo bucal, conforme observado em *G. bakeri* (Figura 33C).

45. Diâmetro da glândula salivar: (0) irregular, (1) regular. (Ci= 0,20; Ri= 0,00).

O diâmetro da glândula salivar é regular quando a largura é similar ao longo de

toda a glândula, conforme observado em *Gundlachia* n. sp. 1 (Figura 54A) e *G. ticaga* (Figura 45A). O diâmetro irregularpode ser observado no acroloxídeo *Baicalancylus boettgerianus* (Lindholm 1909: fig. 7D) e *A. fluviatilis* (Hubendick 1962: fig. 32).

46. Saco radular: (0) longo, (1) curto. (Ci= 0,50; Ri= 0,66).

O saco radular é longo quando ultrapassa o bulbo bucal, conforme observado em *H. moricandi* (Hubendick 1964: fig. 119).

47. Proporção da região muscular do estômago em relação à região pilórica: (0) igual, (1) menor, (2) maior. (Ci= 0,20; Ri= 0,00).

O estômago é definido por uma dilatação evidente do intestino médio, podendo ou não ter regiões musculares, conforme a definição dada por Figueiredo et al (2013). Contrário a essa definição, em algumas espécies de Acroloxidae, como *Baicancylus kobelti* (Dybowski, 1885), não apresentam um estômago evidenciado, conforme observado em Shirokaya e Röpstorf (2004, fig. 5C). Em contrapartida Ancylinae tem um estômago diferenciado (Hubendick 1964, 1967; Lanzer 1996; Santos 2003).

Segundo Santos (2003) o estômago apresenta uma região muscular e outra pilórica. Utilizamos a proporção igual quando a largura das duas regiões foi semelhante, conforme observamos em *Gundlachia* n. sp. 1 (Figura 54C). A menor conforme observado em *Uncancylus concentricus* (Hubendick 1964: fig. 204) e a maior conforme observado em *Anisancylus dutrae* (Santos 1994).

48. Comprimento do ceco em relação à espessura da região muscular: (0) curto, (1) longo. (Ci= 0,33; Ri= 0,90).

O ceco curto é quando o comprimento dele não ultrapassa a largura da região muscular, conforme observado para *F. gentilis* (Figura 8) e longo quando ultrapassa a largura da região muscular, como visto em *B. ingae* (Figura 19), segundo Lanzer (1991).

Sistema excretor

Segundo Hubendick (1964) a redução da cavidade do manto, o deslocamento do sistema excretor para a borda do manto e sua forma serpenteante são consequências secundárias da evolução da forma pateliforme. Diante disto, buscamos analisar esses aspectos do sistema excretor e acrescentar outras informações, quando possível.

49. Posicionamento do sistema excretor em relação à borda do manto: (0) intermediário, (1) próximo. (Ci= 0,25; Ri= 0,86).

O posicionamento do sistema excretor foi definido utilizando o músculo anterior

esquerdo como referência. O próximo foi definido quando a maior parte se encontra a esquerda, isto é, próximo da borda do manto (Figura 22G) e o intermediário, quando se encontrava em uma região mediana, conforme observado em *Gundlachia* n. sp. 1 (Figura 54D).

50. Forma geral do sistema excretor: (0) reta, (1) sinuosa. (Ci= 0,50; Ri= 0,00).

A forma geral reta é quando a sua extensão acompanha de forma paralela a borda do manto, conforme observado por Paraense (1975) em *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835). Em contrapartida a forma sinuosa pode ser observada em *Physa marmorata* Guilding, 1828, segundo Paraense (1986: fig. 6) e *G. radiata* (Figura 22G).

51. Forma geométrica do sistema excretor: (0) triângular isósceles, (1) retângular, (2) triângular equilátero, (3) triângular escaleno. (Ci= 0,20; Ri= 0,00).

Foram definidas de acordo com as formas geométricas. Os pontos de referência utilizados foram: a região pericárdica, a região terminal do sistema (na altura do poro excretor) e a porção mais anterior do sistema, próximo ao osfrádio.

52. Forma da porção proximal do sistema excretor: (0) retilínea, (1) sinuosa. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

A primeira porção do sistema excretor é glandular, podendo estar evidente ou não, e a segunda é chamada de tubular (Santos 1995). A forma retilínea foi definida quando o trecho de transição dessas duas porções são retas, isso ocorre após a primeira curva da porção glandular, conforme observado em *G. bakeri* (Figura 33E). Já na forma sinuosa, é formada por inúmeras flexuras em formato de V aberto, conforme descrito em (Santos 1995) e observado em *Gundlachia* n. sp. 1 (Figura 54D).

53. Proporção do tamanho do ventrículo em relação ao átrio: (0) semelhante, (1) menor, (2) pelo menos o dobro. (Ci= 0,17; Ri= 0,00).

54. Porção terminal do sistema excretor: (0) paralela, (1) não paralela. (Ci= 0,20; Ri= 0,00).

A porção terminal do sistema excretor foi definida como paralela quando se encontra no mesmo sentido da borda do manto e não paralela quando não termina no mesmo sentido, conforme observado em *Uncancylus concentricus* (Hubendick 1964: fig. 203).

<u>Sistema reprodutor</u>

55. Forma geral do ovoteste: (0) esférica, (1) elipsóide (2) semi-esférica. (Ci= 0,50;

Ri= 0,95).

Foram definidas de acordo com as formas geométricas, em vista lateral. A forma cilíndrica pode ser observada em *Biomphalaria* (Paraense 1975) e a semi-esférica em *Gundlachia* (Santos 2003: fig. 24) (Figura 54F) e a elipsóide em *S. rosanae* (Gutierrez Gregoric 2002: fig. 18).

56. Forma dos ácinos do ovoteste: (0) alongada, (1) arredondada. (Ci= 1,00; Ri= 0,00).

A forma alongada foi constituída por agrupamentos de ácinos visíveis e com o comprimento maior do que a largura, conforme observado em *A. fluviatilis* (Hubendick 1964: fig. 38). A forma arredondada é observada na maioria dos ancilídeos (Santos 1995: fig. 22).

57. Número de ácinos no ovoteste: (0) até dez, (1) de 11 até 20, (2) de 21 até 35, (3) maior ou igual a 36. (Ci= 0,13; Ri= 0,00).

58. Posição da vesícula seminal em relação ao ovoteste: (0) mediana, (1) proximal, (2) distal, (3) da região proximal até a mediana. (Ci= 0,17; Ri= 0,00).

O estado 3 foi observado somente em *U. concentricus* (Santos 1995: fig. 96). Para definir esse estado foi necessário estender a vesícula seminal, que se encontra enovelada em seu próprio eixo, e observar toda a sua extensão.

59. Divertículos na vesícula seminal: (0) presentes, (1) ausentes. (Ci= 0,20; Ri= 0,00).

A vesícula seminal pode apresentar-se sem divertículos evidentes como relatado por Lanzer (1991) em *B. ingae*; observado por Santos (1995: fig. 82) em *G. saulcyanus*. Em contrapartida, os divertículos estão presentes em diferentes espécies de *Gundlachia* (Figura 23A).

60. Número de divertículos da vesícula seminal: (0) maior ou igual a oito, (1) até sete, (2) sem divertículos. (Ci= 0,50; Ri= 0,00).

O número de divertículos da vesícula seminal pode variar entre gêneros e espécies, conforme observado em *A. obliquus* (Santos 2000: fig. 4c), com aproximadamente 20 divertículos e *G. bakeri* (Figura 33G), com quatro. Todavia, pode não apresentar divertículos, conforme observado em *G. saulcyana* (Figura 49C).

61. Forma da glândula nidamental: (0) elíptica, (1) alongada. (Ci= 0,25; Ri= 0,81).

Segue a mesma definição da abertura da concha (Caráter 1).

62. Proporção entre a largura glândula de albúmen e a nidamental: (0) mais do que o dobro, (1) semelhante, (2) menor. (Ci= 0,17; Ri= 0,00).

Definimos que a proporção dessas estruturas deve ser tomada, em vista dorsal (Figura 23A). (Ci= 0,17; Ri= 0,00).

63. Útero: (0) arredondado, (1) afilado, (2) com três projeções. (Ci= 0,25; Ri= 0,00).

A região anterior do útero pode apresentar uma variação de formas entre os Ancylinae (Hubendick 1964, 1967; Lanzer 1993; Santos 1995, 2003). Utilizamos a região anterior para definir essas distintas formas, observadas em vista dorsal. A forma arredondada foi observada em distintas espécies conforme observada em *Gundlachia radiata* (Figura 23A). A afilada foi observada em *H. moricandi* (Santos 1995: fig 63) e a com três projeções foi observada em *G. leucaspis* (Figura 30F) e *Gundlachia* n. sp. 2 (Figura 58E).

64. Apêndice terminal do útero: (0) ausente, (1) presente. (Ci= 0,25; Ri= 0,86).

Ausente em *Biomphalaria*, *Sineancylus* (Gutierrez Gregoric 2002: fig. 18) e presente em na maioria dos ancilídeos (Figura 23A).

65. Proporção da espessura da vagina em relação à espessura da espermateca: (0) diferente, (1) igual. (Ci= 0,50; Ri= 0,95).

A relação dessas duas estruturas pode ser observada em vista lateral esquerda (Figura 30G).

66. Forma da próstata: (0) com folículos evidentes, (1) sem folículos evidentes. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

67. Número de folículos da próstata: (0) até cinco, (1) de seis até dez. (Ci= 1,00; Ri= 1,00).

68. Complexo ejaculatório: (0) presente, (1) ausente. (Ci= 0,50; Ri= 0,95).

O gênero *Ancylus* (Hubendick 1964: fig 38 e 39), *Burnupia* e *Sineancylus*, dentre os moluscos límnicos pateliformes, apresentam todo o complexo ejaculatório. Os gêneros *Anisancylus, Gundlachia*, *Ferrissia*, *Uncancylus* e *Hebetancylus* não apresentam pênis (Lanzer 1991; Santos 1995, 2003).

69. Flagelo: (0) presente, (1) ausente. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

Segundo Santos (1989: fig. 9) *Laevapex vazi* descrita pela própria autora não possui flagelo e nem *Burnupia* (Lanzer 1991). Os demais gêneros de Ancylinae possuem flagelo, como observado em *G. radiata* (Figura 23H).

70. Comprimento do flagelo: (0) curto, (1) longo. (Ci= 0,33; Ri= 0,00).

O flagelo curto foi definido quando não ultrapassa o comprimento do prepúcio, conforme observado em *A. fluviatilis* (Hubendick 1964: fig. 24) e em *G. bakeri* (Figura 33I); e longo quando ultrapassa o comprimento do prepúcio (Figura 23H).

4.2 **O gênero *Gundlachia* Pfeiffer, 1849**

4.2.1 *Gundlachia* Pfeiffer, 1849

Descrição original: "*Testa tenuis, ancyliformis, non spirata, oblique conica, vertice retrorsum inclinato; latere basali lamina plana, horizontali ad duos trientes clauso; apertura antica, horizontali, semicirculari. – Operculum nullum.*
Animal...?"

Lista sinonímica:

Ancylus d´Orbigny, 1835: 24—Pfeiffer, 1839: 350—Bourguinat, 1862: 82—*Poeyia*, 1856: 10. [Partim].
Gundlachia Pfeiffer, 1849: 97.
Poeyia Bourguinat, 1862: 803.
Protancylus (*Gundlachia*)—Thiele, 1931: 483.
Hebetancylus —Pilsbry e Aguayo, 1933: 116—Wurtz, 1951: 127. [Partim]
Gundlachia—Martens, (1890-1901): 403—Hannibal, 1912: 148—Pilsbry, 1924: 55—Zilch, (1959-1960): 127—Hubendick, 1964: 29—Hubendick, 1978: 40—Santos, 2003: 208—Gutierrez Gregoric et al. 2006: 51—Rumi et al. 2008: 83.
Uncancylus—Marcus e Marcus, 1962: 217.

Espécie-tipo: *Gundlachia ancyliformis* Pfeiffer, 1849

Segundo Dance (1966), os materiais-tipo da coleção de L. Pfeiffer (1815-1877) foram para a coleção de H. Cuming (1791-1865) que está no Natural History Museum. Contudo, ao verificarmos o banco de dados eletrônico do museu, só localizamos os tipos de *Ancylus saulcyanus* (nº 1982180), *Ancylus baconi* (nº 1982181), *Ancylus regularis* (nº 1974044) e *A. cumingianus* (nº 1982179).

Localidade-tipo: Cuba, Cardenas

Diagnose emendada: concha com ápice elevado e arredondado situado no quadrante posterior direito, flexionado para a direita e com achatamento dorsal.

Protoconcha com depressão apical, com ou sem pontuações irregulares, sem linhas radiais. Teleoconcha pode ter ou não linhas radiais. Impressão muscular direita formada por dois fascículos musculares. Dente central da rádula assimétrico (Pfeiffer 1849; Walker 1923; Marcus e Marcus 1962; Hubendick 1964, 1967; Lanzer 1996; Santos 1995, 2003; Lacerda et al. 2011; Ovando et al. 2014).

Comentários: A descrição original da espécie-tipo do gênero foi feita por Pfeiffer (1849) baseada em conchas septadas; posteriormente, em 1852, o mesmo autor complementou a descrição original incluindo formas não septadas. Após os trabalhos de Pfeiffer foi Pilsbry (1913, 1924) que contribuiu com mais informações para a diagnose do gênero *Gundlachia* ao compará-lo aos outros gêneros recém criados por ele: *Hebetancylus* Pilsbry, 1913; *Uncancylus* Pilsbry, 1913 e *Anisancylus* Pilsbry, 1924. Hubendick (1967) considerou *G. ancyliformis* sinômino de *G. radiata* (Guilding 1828) e atribuiu a essa espécie várias outras com forma gundlaquioide. O gênero atualmente é definido pela características das conchas e das partes moles que serão apresentadas em seguida.

Redescrição geral da concha: *Gundlachia* possui a concha pateliforme (Figuras 11A e B). De pequenas dimensões, na maioria das populações a concha varia entre dois a cinco milímetros de comprimento, mas algumas espécies podem alcançar 15 milímetros como é o caso de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) (Santos 2003; Lacerda et al. 2013). As conchas em geral são finas, frágeis, compostas por duas regiões: a região apical, a protoconcha, que corresponde à concha embrionária e a região pós-embrionária, a teleoconcha (Figura 11B). A escultura da protoconcha foi utilizada por diferentes autores como caracter diagnóstico para a determinação de gêneros e espécies (Burch 1975; Hubendick 1964, 1967; Santos 2003) (Figura 12).

Enquanto que a microescultura apical da concha de *Gundlachia* apresenta pontuações irregulares (Figura 11A), o gênero *Ferrissia* apresenta linhas radiais (Figura 12B), em *Hebetancylus* é liso não apresentando linhas radiais e nem pontuações (Figura 12C), *Burnupia* possui pontuações regulares (Figura 12D) e *Uncancylus* apresenta o ápice pontiagudo (Figura 12E), distinto dos demais gêneros que são arredondados.

Sob condições ambientais normais, os ancilídeos apresentam a morfologia externa das conchas e partes moles de acordo com as características gerais apresentadas na Figura 13. Quando submetidos a condições de estresse ambiental, espécies dos gêneros *Gundlachia* e *Ferrissia* podem sofrer modificações morfológicas (Mirolli 1960; Hubendick 1964; Santos 2003) levando à formação de septos que fecham a abertura das conchas, que então são denominadas conchas septadas ou gundlaquióides. A formação do septo provoca um crescimento diferencial da massa visceral, com seu consequente alongamento (Figura 2). Essa adaptação morfológica é mais frequente em *G. radiata*, podendo alcançar quase 50% da população, conforme observado por Ovando et al. (2011) em dois lagos temporários na Argentina.

Além da formação do septo, a concha dos ancilídeos sofre influência do ambiente (Durrant 1977; Lacerda et al. 2011), de forma que diferentes populações da mesma espécie podem ser descritas como espécies diferentes (Hubendick 1967; Walther et al. 2006; McMahon 2004), resultando em longas listas sinonímicas.

Um exemplo desta situação pode ser observado na tabela 4, que mostra a lista sinonímica de *G. radiata* construída por três diferentes autores e apresentada aqui de forma simplificada. Lanzer (1991), Santos (1995) e Simone (2006) listaram 28, 16 e 25 táxons nominais, respectivamente. É importante ressaltar que a maioria das descrições dos táxons incluída nestas listas sinonímica foi baseada somente em conchas.

Tabela 4: Três diferentes listas sinonímicas atribuídas a *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828).

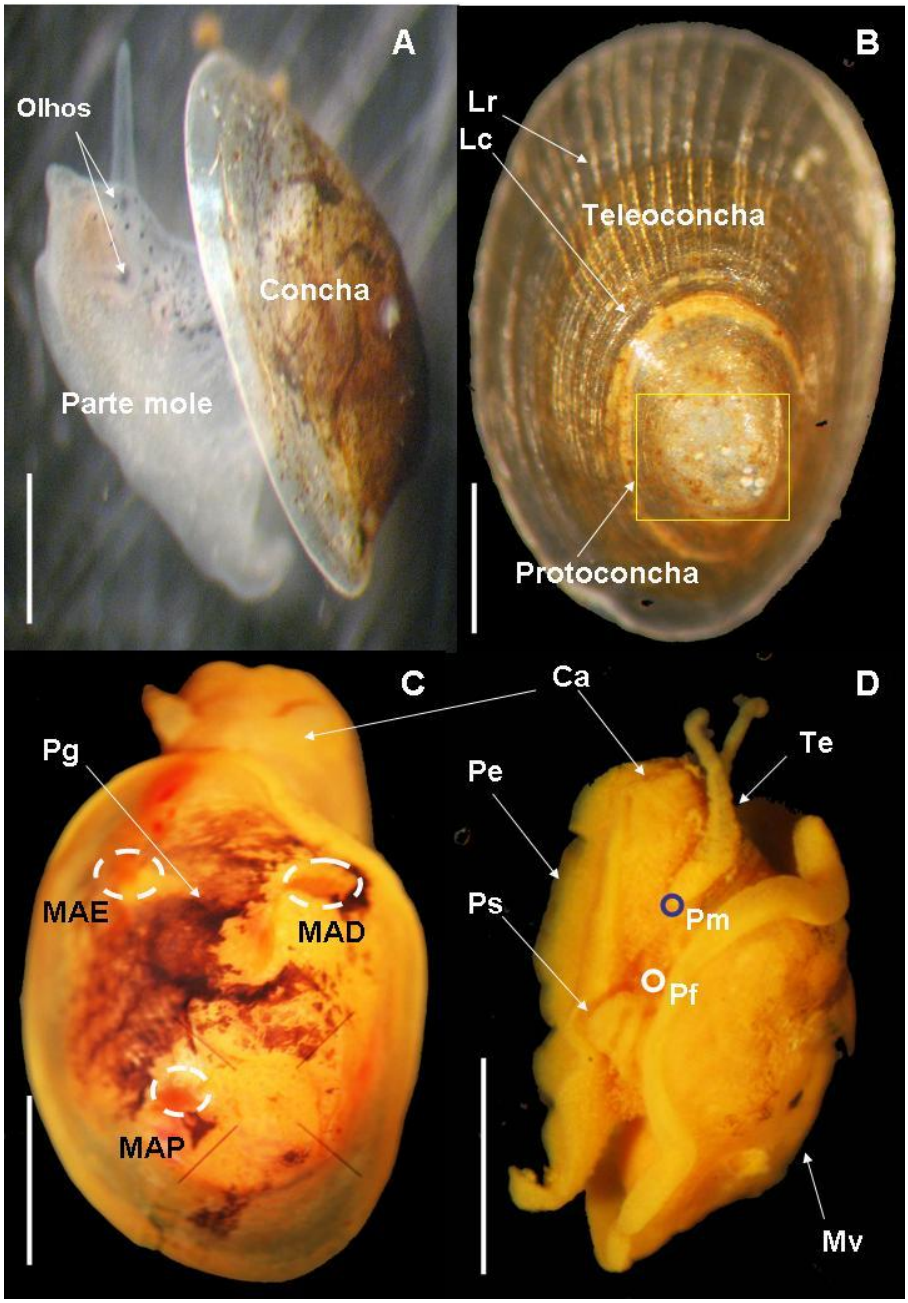
Lanzer 1991	**Santos 1995**	**Simone 2006**
Ancylus radiatus Guilding, 1828.	*Ancylus radiatus* Guilding, 1828	*G. adelinus* (Bourguignat,1862)
Ancylus havanensis Pfeiffer, 1839.	*Ancylus havanensis*: Pfeiffer, 1839.	*G. chittyi* (Adams,1851)
Gundlachia ancyliformis Pfeiffer, 1849.	*Gundlachia ancyliformis*: Pfeiffer, 1849.	*G. excentricus* (Morelet, 1851);
Ancylus chittyi Adams, 1851.	*Poeyia gundlachioides*: Crosse, 1890.	*G. e. var. biolleyi* (Martens,1899)
? *Ancylus excentricus* Morelet, 1851.	*Poeyia gundlachioides*: Aguayo, 1938.	*G. e. var. pittieri* (Martens, 1899)
Ancylus radiatilis Morelet, 1851.	*Ancylus excentricus*: Morelet, 1851.	*G. havanensis* (Pfeiffer,1839)
Ancylus obliquus; Adams, 1852.	*Ancylus Havanensis*: Pfeiffer, 1852.	*G. pallidus* (Poey,1856)
Ancylus saulcyanus Bourguignat, 1853.	*A. [ncylus] radiatus*: Walker, 1902.	*G. papillaris* (Martens,1899)
Ancylus petitianus Bourguignat, 1853.	*A. [ncylus] excentricus*: Walker, 1902.	*G. parasitans* (Drouët,1859)
Ancylus pallidus Poey, 1856.	*Burnupia (unancylus) barilensis* (partim): Haas, 1939.	*G. peninsulae* (Pilsbry e Johnson, 1896)
Ancylus sallei Bourguignat, 1857.	*Protancylus (H.) moricandi*: Benthem-Jutting, 1943.	*G. petitianus* (Bourguignat,1853)
Gundlachia hjalmarssoni Pfeiffer, 1858.	*Hebetancylus havanensis*: Aguayo, 1946.	*G. pfeifferi* (Bourguignat, 1862)
Ancylus parasitans Drouët, 1859.	*Gundlachia (Gundlachia) ancyliformis*: Zilch, 1960.	*G. radiatilis* (Morelet, 1851)
Gundlachia poeyi Bourguignat, 1862.	*Hebetancylus excentricus*: Basch, 1963.	*G. radiatus* (Guiding, 1828)
Gundlachia adelosia Bourguignat, 1862.	*Gundlachia radiata*: Harry e Hubendick, 1964.	*G. sallei* (Bourguignat,1853)
Poeyia gundlachioides Bourguignat, 1862.	*Gundlachia ancyliformis*: Sowerby e Fulton, 1911.	*G. textilis* (Guppy,1870)
Ancylus adelinus Bourguignat, 1862.		*G. bahamensis* (Clench e Schalie, 1938)
Ancylus pffeiferi Bourguignat, 1862.		*G. haitiana* (Clench e Aguayo, 1937)
Ancylus textilis Guppy, 1870.		*G. ancyliformis* Pfeiffer, 1849
Ancylus peninsulae Pilsbry e Jonson, 1896.		*G. hinkleyi* Walker,1917
Ancylus papilaris Martens, 1899.		*G. hjalmarssoni* Pfeiffer, 1858
Gundlachia hinkleyi Walker, 1917.		*G. poeyi* Bourguignat, 1862
?*Ferrissia jamaicensis* Walker, 1921.		*G. cubensis* (Pilsbry e Aguayo, 1933)
Hebetancylus cubensis Pilsbry e Aguayo, 1933.		*G. providentialis* (Wurtz, 1951)
Ferrissia (L.) aquadae Goodrich e van der Schlalie, 1937.		*G. gundlachioides* (Bourguignat, 1862)
Ferrissia (L.) haitiana Clench e Aguayo, 1937.		
Ferrissia (L.) bahamensis Clench e van der Schalie, 1938.		
Hebetancylus providencialis Wurtz, 1951.		

Descrição geral das partes moles: A morfologia externa segue o padrão comum aos basomatóforos pateliformes, com três partes: cabeça, pé e massa visceral (Figura 11C-D). A cabeça é bilateralmente simétrica, com tentáculos variando de curtos a longos, subcilíndricos, geralmente triangulares na base. O pé é muscular, ovalado, sendo mais largo na porção anterior que na posterior. A massa visceral tem forma convexa, que acompanha a forma da concha, sendo recoberta pelo manto que apresenta diferentes padrões de pigmentação, variando em forma e distribuição. A pigmentação pode ser muito reduzida ou ausente em alguns gêneros como em *Ferrissia* e *Burnupia* (Hubendick 1964; Lanzer 1991, 1996; Santos 2003; Lacerda e Santos 2011).

Além da pigmentação do manto, outras estruturas que tem bastante utilidade como caracter taxonômico são os três músculos adutores da concha (Figura 11C). Esses músculos ficam ligados por fibras musculares ao pé, formando um estojo que protege a massa visceral (Santos 2003), os quais ao se contraírem promovem o abaixamento da concha que cobre toda a parte mole do animal (Figura 11). A forma e o número dessas impressões musculares são utilizados por diversos autores (Hubendick 1964, 1967; Lanzer 1991, 1996; Santos 2003; Lacerda et al. 2011 2013; Ovando et al. 2011) para a taxonomia da família, caracterizando gêneros e espécies.

Caracteres gerais da morfologia externa e interna das partes moles podem ser observados na figura 13, assim como o dente central assimétrico observado desde Pilsbry (1924).

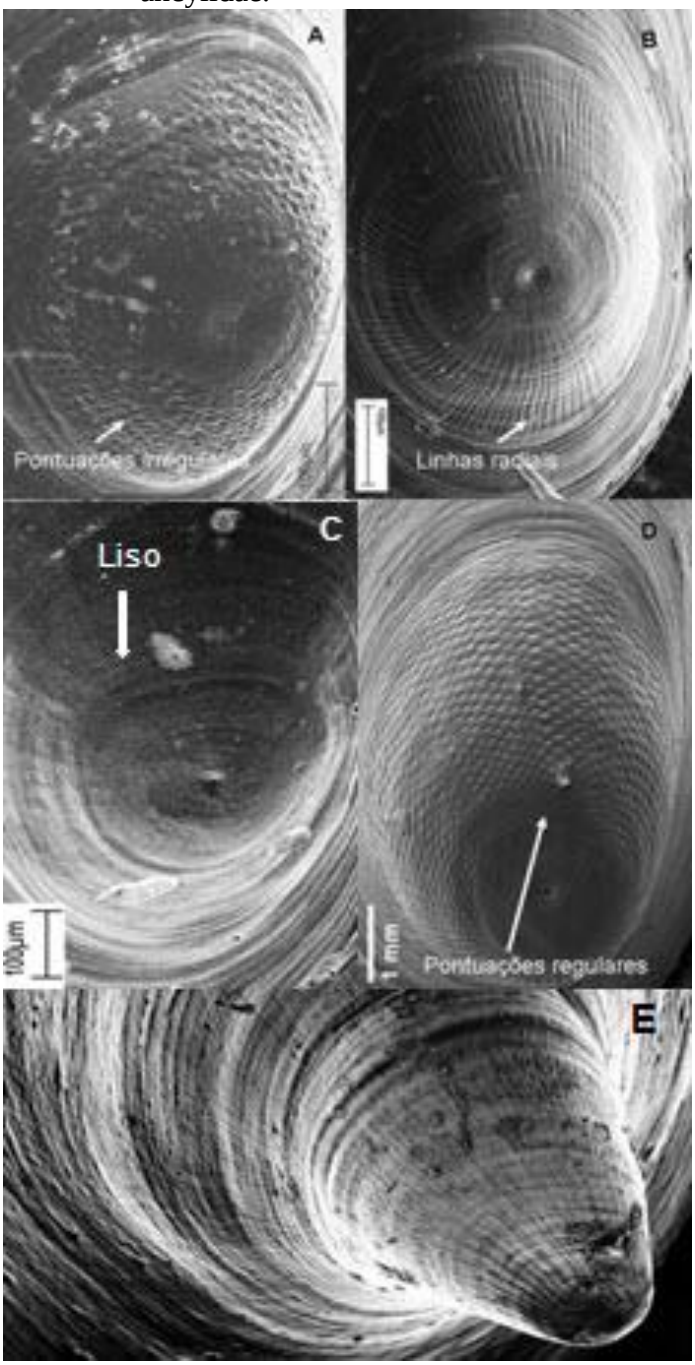
Figura 11 - Aspectos da morfologia externa da concha e das partes moles de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849.



Legenda: **(A)** Concha pateliforme e parte mole com manchas de pigmentação observadas em vista lateral esquerda. **(B)** Concha em vista dorsal; região da protoconcha (quadrado); e teleoconcha com suas linhas radiais (Lr) e linhas de crescimento (Lc). **(C)** Parte mole em vista dorsal (corada em lugol); MAD= Impressão do músculo adutor direito, MAE= Impressão do músculo adutor esquerdo e MAP= Impressão do músculo adutor posterior, Pg= Pigmentação do manto. **(D)** Parte mole em vista lateral esquerda (corada em lugol); Ca= Cabeça, Pe= Pé, Mv= Massa visceral, Te= Tentáculo, Ps= Pseudobrânquia, Pm= Poro masculino e Pf= Poro feminino. Escala = 1mm.

Fonte:O autor, 2015.

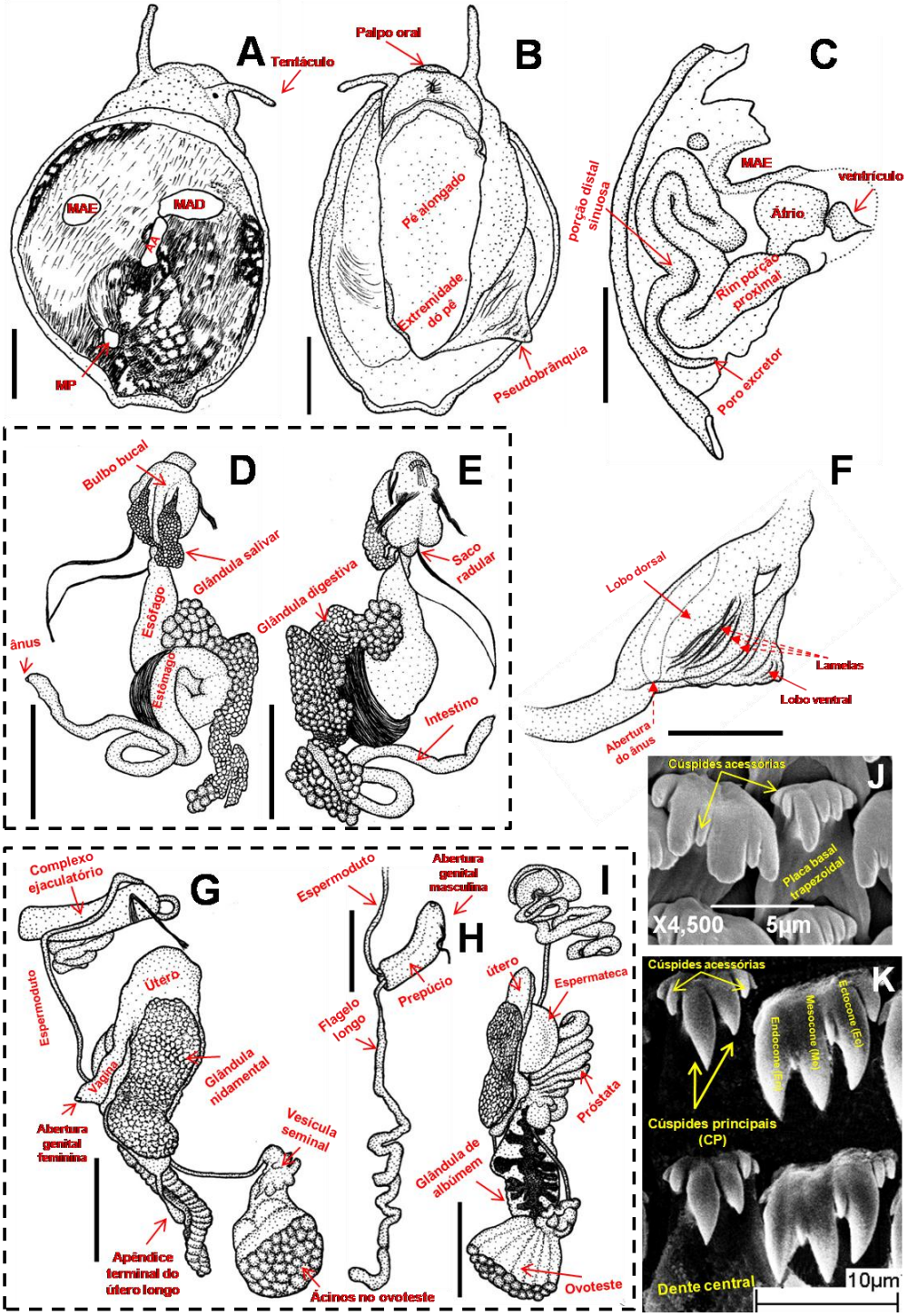
Figura 12- Detalhe da microescultura apical da concha, em vista dorsal, de diferentes gêneros de ancylidae.



Legenda: (**A**) *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962): faixa de pontuações irregulares após a área lisa. (**B**) *Ferrissia fragilis*: presença de linhas radiais. (**C**) *Hebetancylus* Pilsbry 1913: sem pontuações. (**D**) *Burnupia ingae* Lanzer, 1991: pontuações regulares. (**E**) *Uncancylus*: com ápice agudo.

Fonte: O autor, 2015. (**A**) Lacerda et al. 2011; (**D**) Lacerda e Santos, 2011.

Figura 13 - Morfologia externa e interna (sistema excretor, digestório e reprodutivo) das partes moles de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849.



Legenda: **(A)** Vista dorsal da parte mole, evidenciando a MAD-Impressão muscular anterior direita; MAE- Anterior esquerda; MP - Músculo posterior e AA- Área adesiva. **(B)** Vista ventral da parte mole. **(C)** Sistema excretor. **(D)** Vista dorsal do sistema digestório. **(E)** Vista ventral do sistema digestório, mostrando o saco radular. **(F)** Pseudobrânquia, com o lobo dorsal com quatro lamelas e o ventral com seis. **(G)** Vista dorsal do sistema reprodutor. **(H)** Complexo ejaculatório, com o prepúcio grosso e flagelo longo**. (I)** Vista lateral do sistema reprodutor. **(J)** Dente central e lateral de *G. lutzi* Walker, 1925 (UERJ 10418). **(J)** Dente central e lateral de *G. radiata* (Guilding, 1828) (UERJ 10409). Escala = 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

O gênero *Gundlachia* é caracterizado, pela seguinte diagnose: concha com ápice elevado e arredondado situado no quadrante posterior direito, flexionado para a direita e com achatamento dorsal; protoconcha com pequena depressão apical, seguida por uma área lisa e, geralmente, mais uma área com pontuações irregulares, sem linhas radiais; teleoconcha pode ter ou não linhas radiais; impressão muscular direita formada por dois fascículos musculares; e dente central da rádula assimétrico (Pfeiffer 1849; Hubendick 1964, 1967; Lanzer 1996; Marcus e Marcus 1962; Santos 1995, 2003).

Santos (2003), baseando-se em revisões bibliográficas, coletas e observações pessoais sobre dados morfológicos, ecológicos e paleontológicos assinalou dentre as 13 espécies válidas de ancilídeos na América do Sul, três espécies válidas de *Gundlachia* e três outras com identificação duvidosa, devido à falta de descrições morfológicas mais aprofundadas. As primeiras são *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913, *G. radiata* (Guilding, 1828) e *G. ticaga* (Marcus e Marcus, 1962), enquanto que as três seguintes são *G. saulcyana* (Bourguignat, 1853), *G. leucaspis* (Ancey, 1901) e *G. lutzi* Walker, 1925.

Até este trabalho, com base em caracteres de concha, rádula e partes moles, apenas duas das espécies consideradas válidas eram bem descritas (Santos 2003): *G. radiata* e *G. ticaga*. As demais espécies, *G. bakeri*, *G. leucaspis*, *G. lutzi* e *G. saulcyana* são conhecidas apenas das localidades-tipo, através da descrição da concha e alguns detalhes das partes moles, necessitando de redescrição para definir sua validade. Quatro das seis espécies válidas atribuídas ao gênero possuem suas localidades-tipo no Brasil, exceto, *G. radiata* que foi descrita para Saint Vincent (América Central) e *G. saulcyana* descrita para a Venezuela.

Os estudos realizados até hoje (Quadro 2), em conjunto, auxiliaram a definição dos gêneros, baseados na microescultura da concha e, para algumas espécies, também na morfologia muscular, embora ainda faltem informações morfológicas que assegurem a validade de diversos táxons nominais citados para a região Neotropical. O quadro 2 traz os principais trabalhos com os taxa supracitados, destacando os estudos utilizados por cada pesquisador.

Quadro 2: Informações sobre as seis espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849.

Espécie	Tipo de estudo	Referência	Análise
Gundlachia bakeri Pilsbry, 1913	Morfologia	Pilsbry (1913)	Desenho só da C
	Morfologia, distribuição e sistemática	Lanzer (1996)	Desenho da C e PM
	Morfologia, distribuição e sistemática	Santos (2003)	Desenho da C e PM
Gundlachia radiata (Guilding, 1828)	Morfologia	Guilding (1828)	Desenho só da C
	Morfologia e distribuição	Hubendick (1964)	Desenho da C e PM
	Morfologia	Harrison (1983)	Detalhes em MEV da C e R
	Morfologia, distribuição e sistemática	Lanzer (1996)	Desenho da C e PM
	Morfologia, distribuição e sistemática	Santos (2003)	Desenho da C e PM
	Morfologia, distribuição e sistemática	Ovando et al. (2011, 2014)	Detalhes em MEV da C e R e desenho da PM
Gundlachia ticaga (Marcus e Marcus, 1962)	Morfologia	Marcus e Marcus (1962)	Desenho da C, R e PM
	Morfologia, distribuição e sistemática	Lanzer (1996)	Detalhes em MEV da C e R e desenho da PM
	Morfologia, distribuição e sistemática	Santos (2003)	Desenho da C e PM
	Morfologia e distribuição	Lacerda et al. (2011)	Detalhes em MEV da C e desenho da PM
	Morfologia e Biologia	Simone et al. (2012)	Detalhes em MEV da C e desenho da PM
	Morfologia, distribuição e sistemática	Ovando et al. (2014)	Detalhes em MEV da C e R e desenho da PM
G. leucaspis (Ancey, 1901)	Morfologia	Ancey, 1901	Desenho da C
	Morfologia	Walker 1925	Desenho da C e R
Gundlachia saulcyana (Bourguignat, 1853)	Morfologia	Bourguignat (1853)	Desenho da C
	Morfologia, distribuição e sistemática	Santos (1995, 2003)	Desenho da C e PM
Gundlachia lutzi Walker, 1925	Morfologia	Walker (1925)	Desenho da C
	Morfologia, distribuição e sistemática	Santos (2003)	Desenho da C

Legenda: Espécies válidas de *Gundlachia*, destacando o tipo de estudo, as referências bibliográficas e a forma de análise (C= concha; PM= parte mole; R= rádula).
Fonte: Compilação dos trabalhos apresentados no quadro.

4.2.1.1 *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828)

(Figuras 14-24)

Binômio original: *Ancylus radiatus* Guilding, 1828

Descrição original: *"A. flavescens, nigro irroratus, dorso maculis tribus vel quatuor pallidis magnis: facie rufescente: abdomine obscuro. Testa ovali-elliptica, vitrea, diaphana, concentrice plicatula, radiatim striata, epidermide evanescente. Habitat cum preacedente; pulchra species".*

Lista sinonímica

Ancylus radiatus Guilding, 1828: 536—Bourguignat, 1853: 172—Adams e Adams, 1858: 311—Crosse, 1890: 262—Smith, 1896: 311—Aguayo, 1938: 218—Burch, 1972: 168.

Ancylus havanensis: Pfeiffer, 1839: 350.

Gundlachia ancyliformis: Pfeiffer, 1849: 98— Pfeiffer, 1852: 180—Adams e Adams, 1858: 267—Fischer, 1883: 505—Crosse, 1890: 262—Sowerby e Fulton, 1911:5—Walker, 1917: 3—Walker, 1918:121—Pilsbry, 1924: 56—Aguayo, 1938:216—Aguayo, 1946: 55—Wurtz, 1951: 126—Burch 1972: 168.

Poeyia gundlachioides: Crosse, 1890: 263—Aguayo, 1938: 216.

Ancylus excentricus: Morelet, 1851: 17.

Ancylus Havanensis: Pfeiffer, 1852:183—Adams e Adams, 1858: 266—Crosse, 1890: 262—Crosse, 1891: 358.

A. [ncylus] radiatus: Walker, 1902: 87.

A. [ncylus] excentricus: Walker, 1902: 87.

Burnupia (Unancylus) barilensis: Haas, 1939: 267.

Protancylus (Hebetancylus) moricandi: Benthem-Jutting, 1943: 459.

Hebetancylus havanensis: Aguayo, 1946: 59.

Gundlachia (Gundlachia) ancyliformis: Zilch, 1960: 128.

Hebetancylus excentricus: Basch, 1963: 422.

Gundlachia radiata—Hubendick, 1964: 29 [nov. comb.]—Harry e Hubendick, 1964: 62—Aguayo, 1966: 12—Hubendick, 1967: 27—Harrison, 1983: 12—Yong e Perera, 1984: 122—Perera e Yong, 1984: 133—Lanzer, 1996: 188—Santos,

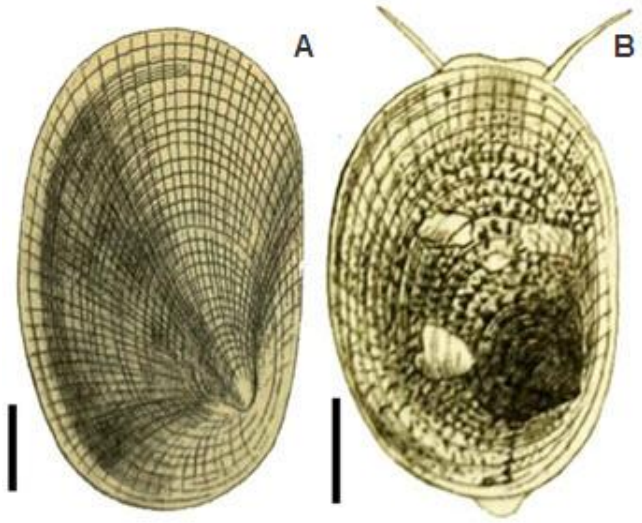
2003: 208—Rumi et al. 2008: 83—Pointier, 2008: 52—Ovando et al. 2011: 263—Lacerda et al. 2013: 125—Ovando et al. 2014: 263.

Material Tipo: Nem o trabalho original de Guilding (1828) e nenhum trabalho posterior (ex. Hubendick 1964; Lanzer 1996; Santos 1995, 2003) citaram onde supostamente foi depositado o material utilizado na descrição original (Figura 14). Após verificar o destino que tomou a coleção de L. Guilding (1797-1831), no livro de Dance (1966), constatei que muitos espécimes coletados nas antigas Indias Ocidentais encontram-se no British Museum (BM). Através de consulta, via meio eletrônico ao banco de dados, não foi localizado. Ovando et al. (2014) também não o localizaram em suas buscas pelo material tipo, que estaria, possivelmente, depositados no Museu de História Natural de Londres, Reino Unido (NHMUK). Anteriormente, na década de 70, o Dr, Wladimir Lobato Paraense já havia tentado localizar os tipos de Guilding, sem sucesso (S.B. Santos, informação pessoal).

Segundo o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICNZ 1999) mesmo na inexistência de tipos uma espécie é considerada válida quando existe o espécime ou a ilustração que o autor designou no momento da descrição original.

O exame da figura original de Guilding mostra uma concha elíptica, com as margens quase paralelas entre si; ápice arredondado, projetado sobre o quadrante posterior direito e posicionada entre a linha mediana e a margem direita da concha; teleoconcha com linhas radiais evidentes e sobre toda a concha. As dimensões das conchas tomadas a partir da ilustração de Guilding foram de 7,50 x 4,50 x 3,75 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior e largura posterior, respectivamente. Seus índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,60; L2/C= 0,50 e L2/L1= 0,83.

Figura 14 - Ilustração original da concha e partes moles, ambas em vista dorsal de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828).



Legenda: **(A)** Vista dorsal da concha, mostrando sua forma oval-alongada e ápice voltado para direita e projetado sobre o quadrante posterior direito da concha. **(B)** Vista dorsal da parte mole, com destaque para as três impressões musculares e os tentáculos longos e afilados. Em ambos os desenhos, o autor destacou a presença das linhas radiais bem marcantes.
Fonte: Ilustrações de Guilding (1828: tab. XXVI suppl.; vol. III; p. 536).

Localidade-tipo: Saint Vicent, América Central.

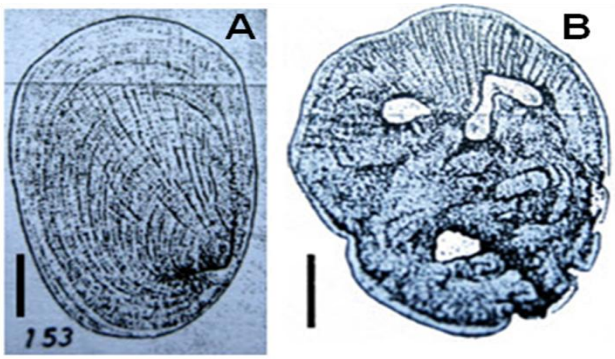
Etimologia: Não foi citado na descrição original, mas provavelmente foi devido a presença de linhas radiais na teleoconcha.

Comentários: esta espécie foi descrita originalmente por Guilding (1828) sob o binômio *Ancylus radiatus*. Apresenta distribuição geográfica mais ampla assinalada na literatura para *Gundlachia*. Somente alguns trabalhos apresentaram informações e ilustrações sobre a morfologia da espécie, e quando presentes, continham em sua grande maioria, informações sobre a concha, sem dados sobre as partes moles. Os trabalhos que mais contribuíram com informações sobre a morfologia da espécie foram os de Hubendick (1964, 1967) e Harry e Hubendick (1964) que apresentaram informações sobre as conchas e parte moles de espécimes coletados em Cuba, México, Panamá, Venezuela e principalmente em Porto Rico e Guadalupe (ex.; Figura 15). Estas localidades estão no entorno das ilhas caribenhas, onde está a localidade-tipo da espécie.

Estes caracteres foram observados em espécimes de outras localidades e atribuídos à *G. radiata* pelos pesquisadores subsequentes que trabalharam com o grupo (Harry e Hubendick 1964; Harrison 1983; Lanzer 1996; Santos, 1995, 2003; Ovando et

al. 2011, 2014; Lacerda et al. 2013). A diferença na morfologia, principalmente da impressão muscular anterior direita, quando se compara Guilding (Figura 14B) com Hubendick (Figura 15B) pode ser pela limitação óptica para a visualização da mesma. Segundo Santos (1995), os trabalhos subsequentes, especialmente Harry e Hubendick (1964) e Harrison (1993), não deixaram dúvidas quanto à identidade da espécie. Atualmente, sempre submeto alguns espécimes ao corante lugol para certificar a forma da impressão muscular direita (MAD), visto que este caráter atua como um dos principais para a diagnose.

Figura 15 - Ilustração da concha e parte mole, ambas em vista dorsal de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828).



Legenda: **(A)** Vista dorsal da concha, mostrando sua forma oval-alongada e ápice voltado para direita e projetado sobre o quadrante posterior direito da concha. **(B)** Vista dorsal da parte mole, destacando a impressão muscular anterior direita com um alongameno interno, não ilustrado por Guilding (1828).
Fonte: Ilustração de Hubendick, 1967: p. 31, fig. 153 e 154.

Diante do panorama apresentado, estou seguindo os autores supracitados, embora seja necessário conseguir material da localidade-tipo, a fim de minimizar algumas dúvidas, como por exemplo, sua ampla distribuição, o que poderia indicar a existência de mais de uma espécie.

Material examinado: Brasil, *Pará*: Belém (Lago Água Preta), 41 animais (41 conchas e 41 partes moles), 11.VII.2007, (UERJ 7154), col. L.E.M. Lacerda e I.C. Miyahira; *Goiás:* Niquelândia (Ponto 48, Represa da Hidrelétrica de Serra da Mesa, grande área alagada na margem esquerda do rio Bagagem), 29 animais (29 conchas e 29 partes moles), XI.2011, (FIOCRUZ s/n), col. M.A. Fernandez e L.E.M Lacerda; *Bahia:* Camaçari (Praia do Parafuso, rio Joanes), 18 animais (18 conchas e 17 partes moles), 05.III.2012, (UERJ 7475), col. L.E.M Lacerda, I.C. Miyahira, G.K.M. Nunes e J.L.

Oliveira; *Mato Grosso do Sul*: Aquidauana (Lagoa Comprida), 05 animais (05 conchas e 04 partes moles), 27.VI.2012, (UERJ 9340); (Lagoa dos Bobos) 02 animais (02 conchas e 02 partes moles), 27.VI.2012, (UERJ 9341), col. I.C. Miyahira; *Rio de Janeiro:* Campos dos Goytacazes (Lagoa Feia, Ponta Grossa dos Fidalgos), 01 animal (01 concha e 01 parte mole), 14.VII.2011, (UERJ s/n); (Lagoa sem nome, próximo ao rio Muriaé, as margens da BR 356), 30 animais (29 conchas e 30 parte moles), 25.IX.2011, (UERJ 8651), col. I.C. Miyahira, J.B. Carneiro, J.L. Oliveira. e L. Souza; Nova Iguaçu (Rio Guandu, Lagoa da CEDAE), 02 animais (conchas e partes moles), 14.VII.2011, (UERJ 8353), col. S.B. Santos e equipe; (Rio Guandu, Lagoa da CEDAE, Todos os Santos), 29 animais (conchas e partes moles), 13.V.2013, (UERJ 10409).

Diagnose: Concha baixa, forma da abertura elíptica e com as margens paralelas entre si, protoconcha com depressão apical rasa, palpo oral inteiro, impressão muscular posterior elíptica, cúspides principais do dente central longas, bulbo bucal arredondado, 38 ácinos no ovoteste (+ que 36) e a glândula de albúmen e a nidamental com largura semelhante.

Descrição da concha de *G. radiata:* as 147 conchas mensuradas são relativamente grandes (< 10mm), variando de 2,25 a 9,72 mm de comprimento. A análise descritiva básica e os índices morfométricos de *G. radiata* encontram-se na Tabela 5.

As dimensões variaram de 2,25 x 1,40 x 1,25 x 0,49 até 9,72 x 5,93 x 7,35 x 2,21 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Seus índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,61; L2/C= 0,56; A/C= 0,23; A/L1= 0,38 e L2/L1= 0,92 (Tabela 05). Segundo os índices morfométricos *Gundlachia radiata* possui uma concha baixa (A/C= 0,23) e estreita (A/L1= 0,38).

Os exemplares mensurados do Estado do Rio de Janeiro são provenientes dos municípios de Santa Cruz (UERJ 8363, 10 conchas), Nova Iguaçu (UERJ 8379, 54 conchas) e Campos dos Goytacazes (UERJ 8651, 30 conchas); na Bahia, utilizamos o lote de Camaçari (UERJ 7475, 18 conchas); em Goiás, Niquelândia (FIOCRUZ s/n, 28 conchas) e Mato Grosso do Sul, Aquidauana (UERJ 9340-1, sete conchas). Esses lotes apresentaram diferença estatística significativa, segundo a Análise Discriminante (AD) (Wilks' Lambda = 0,366; df = 143; F=6,040 p = 0,000). Com esta análise, verificamos

que apesar da diferença estatística significativa, entre as conchas das diferentes populações, a forma geral das conchas dos lotes analisados desta espécie é bastante semelhante, conforme veremos nas descrições e ilustrações a seguir.

Em vista dorsal, observamos que a forma da abertura da concha é elíptica, ápice arredondado e projetado entre a linha mediana e a borda direita da concha (Figura 16A-E).

A protoconcha é arredondada e com escultura, ela é representada por três regiões, uma com pontuações irregulares, que pode variar de profunda e bem evidentes (Figura 16B) até rasa e quase imperceptível (Figura 16D), em distintas populações, que ocupam 1/2 (50%) a 3/4 (75%) do comprimento total da protoconcha, seguida por uma área lisa, que pode variar de 12,5 a 45% e por uma depressão apical, que na maioria dos lotes apresenta-se curta (ex. Figura 16B e D) ou ampla (ex. Figuras 16F, 17A) e rasa (Figuras 16 e 17).

A teleoconcha possui linhas de crescimento concêntricas em toda a superfície (Figura 16). A coloração do perióstraco apresentou diversas cores, geralmente refletindo o ambiente ao qual os espécimes estavam submetidos. O amarelo avermelhado (*Oliver-Ocher*) em solos mais argilosos (Figura 18A); amarelo claro (*Marguerite Yellow*), (Figura 18B) e ambar (*Sea-foam Yellow*) em solos arenosos (Figura 18C); e marrom escuro (*Ecru Olive*) (Figura 18D) em corpos hídricos com uma quantidade maior de ácidos úmicos e fúlvicos, conforme observado no lote (UERJ 10409), coletado no rio Guandu no Rio de Janeiro, apresentou uma variação na coloração da concha, apesar da maioria ter sido classificada como marrom escuro (*Ecru oliver*), esse lote teve duas conchas na cor amarelo claro (*Marguerite Yellow*), demonstrando a variabilidade na coloração intra e inter-populacional. Não observamos projeções no perióstraco em nenhuma das conchas analisadas.

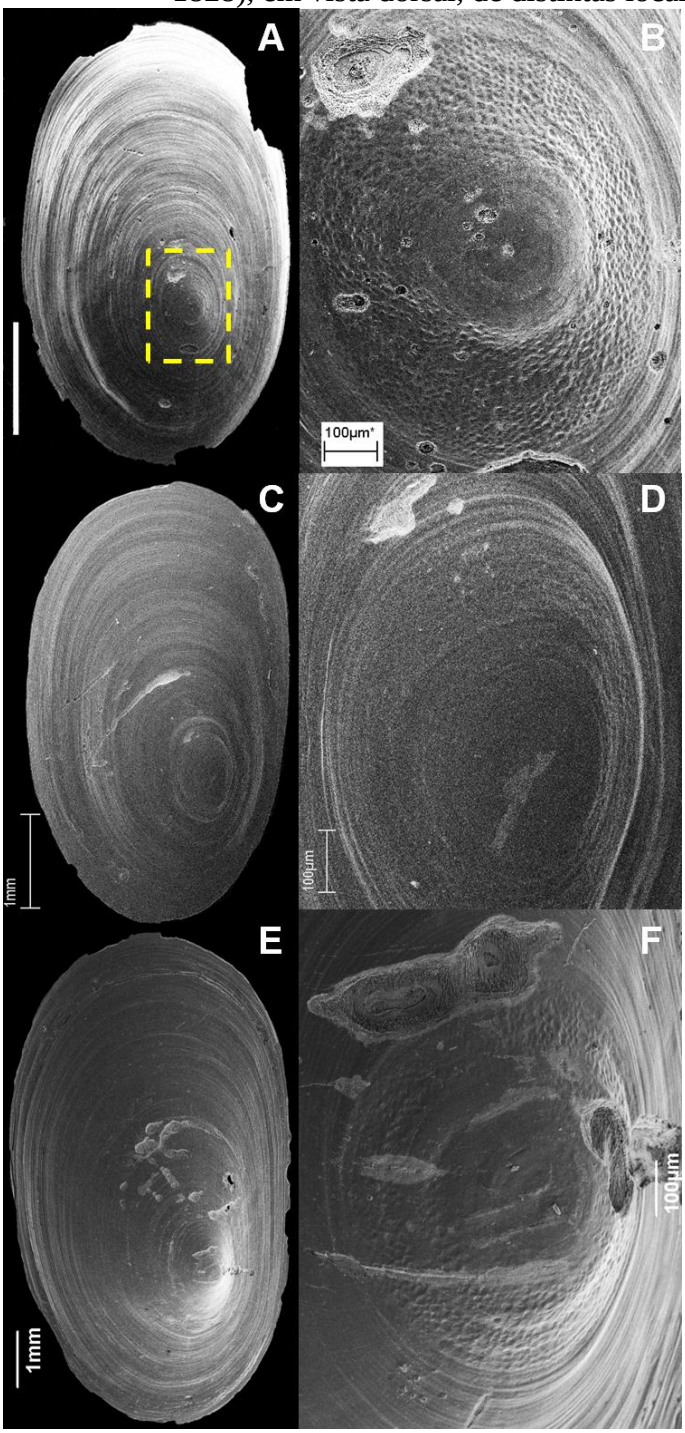
Em vista lateral (Figura 18D), destacamos duas regiões da concha: uma dorsal, convexa e com tênues ondulações relacionadas às linhas de crescimento; e outra com uma discreta concavidade, que pode ser observada na região posterior. Por possuir uma concha baixa e com o ápice menos projetado do que as demais espécies de *Gundlachia*, o ápice de *G. radiata* localiza-se, em vista lateral no terço posterior da concha.

A concha baixa, o ápice projetado e recurvado para direita, posicionando-se entre a linha mediana e a margem direita da concha, a protoconcha com pontuações que podem variar de rasas até profundas, não ultrapassando 3/4 da protoconcha e sua depressão apical curta (podendo apresentar ampla também) e rasa são caracteres da

concha que podem auxiliar na identificação de *Gundlachia radiata*. Apesar de não serem exclusivos, pois alguns caracteres como, por exemplo, o ápice recurvado é projetado entre as linha mediana e a margem da concha ou então a depressão apical ampla e rasa que é compartilhada com *Gundlachia* n. sp. 1, mas diferem quanto ao posicionamento do ápice que é mais centralizado em *G. radiata*. Esses dados, associados aos caracteres das partes moles não deixaram dúvidas sobre a distinção desse táxon.

As comparações conquiliométricas interespecíficas serão apresentadas mais adiante, na seção Morfometria.

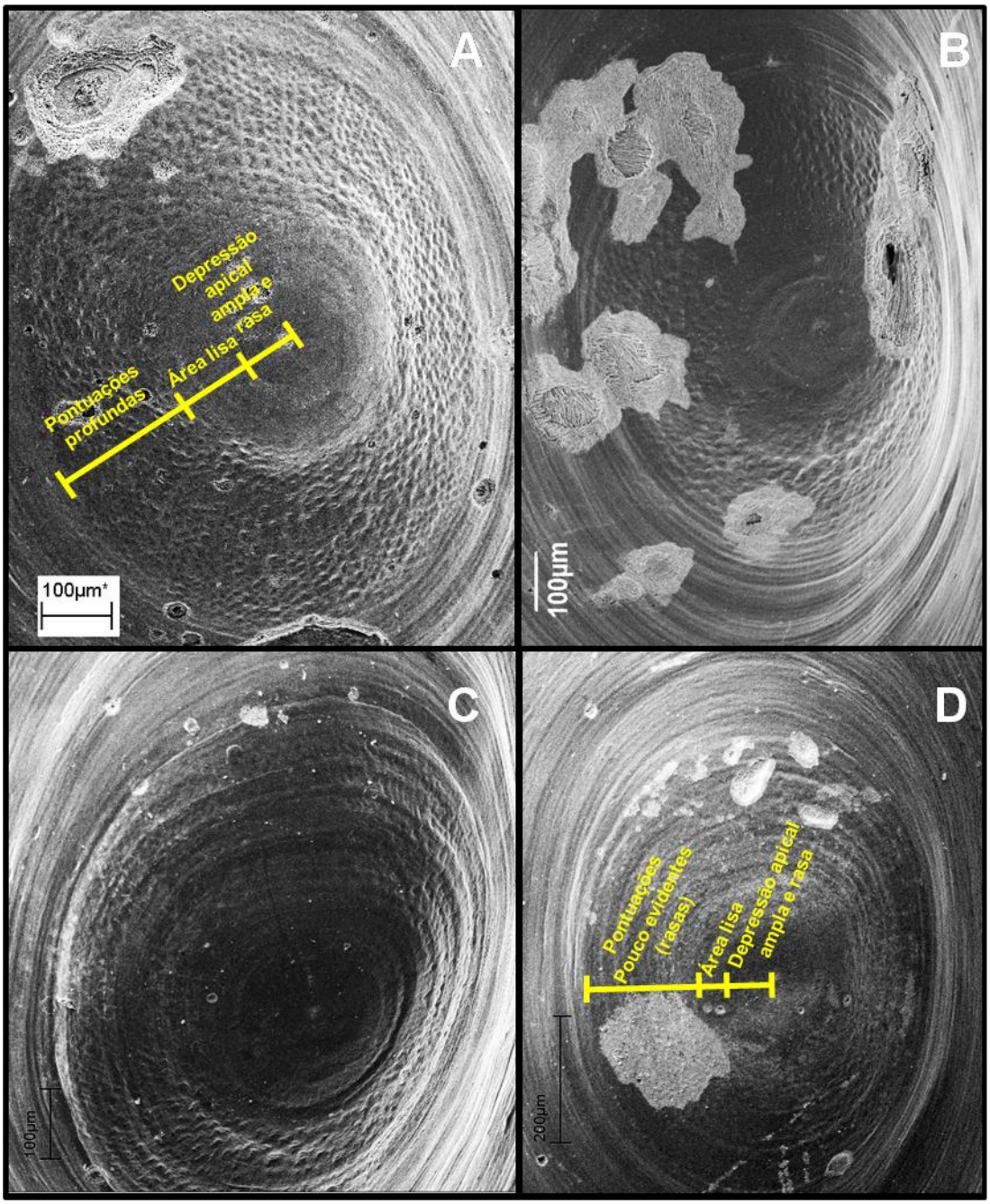
Figura 16 - Morfologia externa da concha de *G. radiata* (Guilding, 1828), em vista dorsal, de distintas localidades.



Legenda: **(A, C, E)** Todas em vista dorsal, evidenciando a abertura elíptica, porém com a largura anterior semelhante a posterior e o ápice projetado próximo da linha mediana da concha. **(B, D, F)** detalhe da microescultura apical da protoconcha, apresentando uma faixa de pontuações irregulares que ocupam 50% da protoconcha, seguida por uma área lisa e uma depressão apical que pode variar. **(A, B)** Niquelândia Goiás **(**Fiocruz s/n); com depressão apical curta e rasa. Destacam-se as pontuações irregulares profundas e bem evidentes. **(C, D)** Camaçari**,** Bahia **(**UERJ 7475); com depressão apical curta e rasa. (**E, F)** Nova Iguaçu**,** Rio de Janeiro **(**UERJ 10409), com depressão apical ampla e rasa.

Fonte: MEV de A. Moraes, editadas por L.E.M. Lacerda para este trabalho.

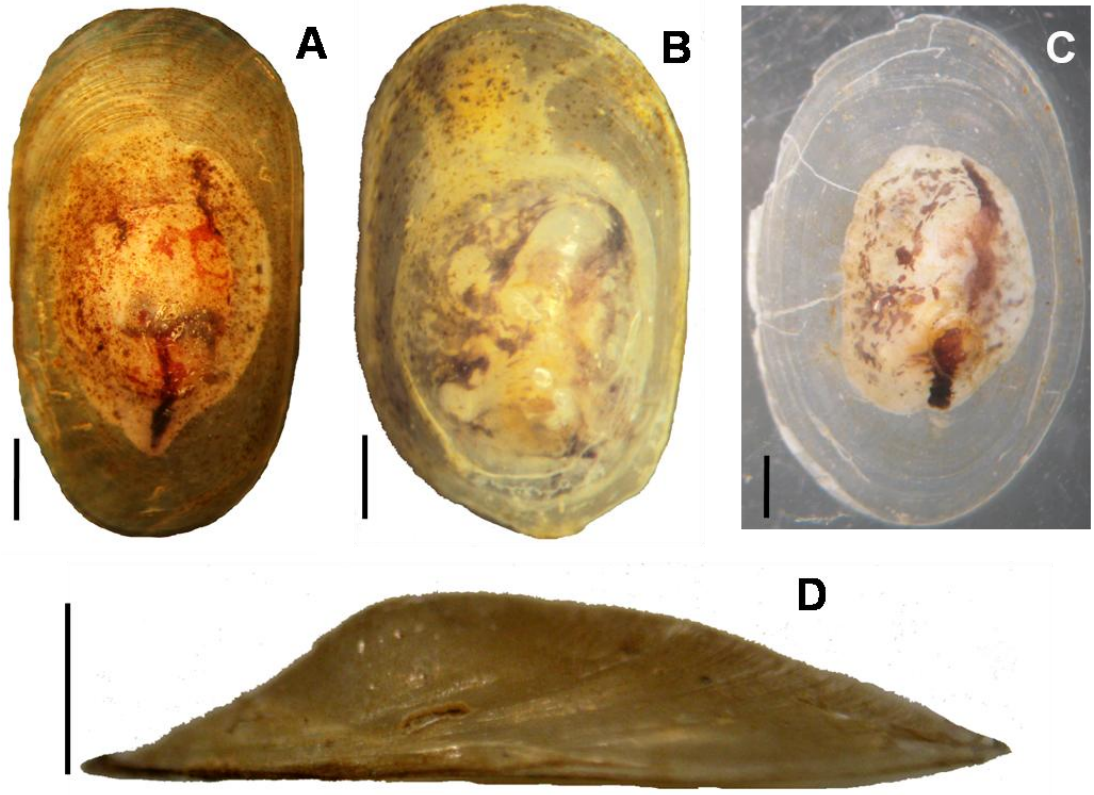
Figura 17 - Variação morfológica da protoconcha de *G. radiata* (Guilding, 1828) de distintas localidades.



Legenda: (**A-D)** Vista dorsal, com detalhes da microescultura apical de diferentes protoconchas, mostrando a faixa de pontuações irregulares que podem ocupar de 2/3 (75%) **(A, B)** a 1/2 (50%) **(C, D)** da mesma, seguida por área lisa, até a depressão apical que pode ser: curta ou ampla e rasa ou profunda. (**A)** Proporção das três regiões (50%; 25%, 25%), com depressão apical ampla e rasa (UERJ 7154). (**B)** (75%; 18,75%, 6,25%), com depressão apical curta e rasa (UERJ 10411). (**C)** (50%; 45%, 5%), com depressão apical curta e rasa (UERJ 1497). (**D)** (50%; 12,5%, 37,5%), com depressão apical ampla e rasa (UERJ 2087).

Fonte: MEV de A. Moraes, editadas por L.E.M. Lacerda para este trabalho.

Figura 18 - Morfologia da concha e variação de coloração de *G. radiata* (Guilding, 1828).



Legenda: **(A)** Animal recém fixado, em vista dorsal, representando a coloração do perióstraco amarelo avermelhado (*Oliver-Ocher*) e a forma da concha elíptica com as bordas paralelas, coletado em Aguidauana, MS (UERJ 9341). **(B)** Animal recém fixado, em vista dorsal, representando a coloração do perióstraco amarelo claro (*Marguerite Yellow*); observa-se sob a concha as três impressões musculares e os tentáculos longos, coletado em Niquelândia, GO (Fiocruz s/n). **(C)** Animal fixado, em vista dorsal, evidenciando a cor ambar (*Sea-foam Yellow*) do perióstraco e alguns aspectos da morfologia externa, como a pigmentação e as impressões musculares; coletado na Usina Hidrelétrica de São Salvador, Tocantins (Fiocruz s/n). **(D)** Vista lateral da concha baixa, evidenciando a cor marrom escuro (*Ecru Olive*) do perióstraco e a região anterior convexa e a posterior com uma discreta concavidade, comparada as demais espécies de *Gundlachia*; coletado em Cuiabá, Mato Grosso (UERJ 10411). Escala = 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

Morfologia externa (Figura 19 e 20): os tentáculos são longos (Figura 19), do mesmo comprimento da distância interocular e o palpo oral é inteiro (Figura 19A-D), apesar de ser menos evidente do que as demais espécies congenéricas.

Gundlachia radiata possui três impressões musculares, sendo a anterior direita elíptica, com uma área adesiva alongada na região interna, que pode estar mais afastada (Figura 19A) ou contigua com o MAD (Figura 19B e C); a impressão muscular anterior esquerda (MAE) e a posterior (MP) arredondadas, podendo o MP ser, em torno da metade do que o MAE (Figura 19C).

Em relação a pigmentação no teto do manto observamos três padrões que já foram descritos por Lacerda et al. (2013) para essa espécie (Figura 20)**:** um

intermediário, com manchas esparsas em todo o teto do manto (Figura 19C e 20A e B); um forte, com toda a superfície do manto coberta(Figura 19A e 20D), e um fraco, que tem uma mancha ao lado do MAD e outra na região posterior (Figura 19A e 20D).

Em vista ventral, observamos que a forma do pé é alongada e a extremidade posterior do pé é arredondada (Figura 19B e D), apesar de algumas populações apresentarem a extremidade afilada (Figura 19D).

A pseudobrânquia apresentou uma grande variação na proporção na largura dos dois lobos e na quantidade de lamelas em cada lobo (Figura 19G-I). Em geral o lobo dorsal é menor do que a largura lobo ventral, variando de duas a cinco lamelas, enquanto o ventral variou de quatro a 12 lamelas (Figura 19). Os espécimes coletados em Goiás (Fiocruz s/n) apresentaram os lobos com a largura semelhante e cinco lamelas em cada lobo (Figura 19G), enquanto que o lote proveniente de Camaçari, Bahia (UERJ 7475) apresentou o lobo ventral aproximadamente o dobro do dorsal, variando de duas a cinco lamelas, e de quatro a cinco no lobo ventral (Figura 19H). Em relação a essa estrutura a população de Rio de Janeiro foi a que mais divergiu das demais, apresentando um lobo ventral cinco vezes maior do que o dorsal e com cinco lamelas no lobo ventral e 12 lamelas no ventral (Figura 19I).

Morfologia interna (Figuras 21, 22 e 23): em relação à morfologia interna foi observado a rádula (Figura 21), o restante do sistema digestório (Figura 22A-F), o sistema excretor (Figura 22G-I), o sistema reprodutor (Figura 23A-I) e o sistema nervoso (Figura 23J-L).

Gundlachia radiata apresenta as cúspides principais do dente raquidiano assimétricas, curtas, apesar de quase atingir a metade da altura da placa basal e afiladas. O dente raquidiano tem seis cúspides no total, sendo duas cúspides principais e mais duas acessórias de cada lado; a placa basal tem forma trapezoidal, e curta com a base igual ao comprimento da altura (Figura 21A-C). O dente lateral apresenta as cúspides principais com largura e comprimentos semelhantes; apesar do mesocone ser ligeiramente mais longo que os demais e tem geralmente duas cúspides acessórias entre o endocone e o ectocone (Figura 21A-E), enquanto que o número de cúspides acessórias externas ao ectocone pode variar de uma a duas. O dente marginal é multicuspidado, apresentando 13 cúspides (Figura 21F), tendo somente duas cúspides principais bem evidentes e com o dobro da largura das cúspides acessórias. A fórmula radular da espécie é 17-1-17.

O **sistema digestório** (Figura 22A-F) apresentou o bulbo bucal com forma arredondada; a glândula salivar longa, pois ultrapassa a extremidade posterior do bulbo; e com o diâmetro que pode ser irregular (Figura 22A) ou regular (Figura 22B); o saco radular longo, (Figura 22C), apesar de ultrapassar pouco o bulbo bucal e o estômago é diferenciado, semelhante aos demais Ancylinae, e formado por duas porções: uma região muscular e uma região pilórica que possuem proporções que variam entre as populações, podendo a muscular ter o dobro (Figura 22E) ou o triplo (Figura 22F) da largura da pilórica, enquanto que em algumas populações essa proporção é semelhante; o ceco é curto, pois não ultrapassa a largura da região muscular do estômago (Figura 22E e F), apesar de atingir 2/3 dessa largura.

O **sistema excretor (**Figura 22G -I) está localizado próximo à borda do manto, forma geral sinuosa, em relação à borda do manto. As extremidades dessa estrutura formam a figura de um triângulo isósceles. A porção proximal do rim é glandular, podendo estar pouco (Figura 22G) ou muito evidente (Figura 22H e I), com forma sinuosa, formando flexuras em forma de V invertido, em relação à borda do manto (Figura 22G -I). O ventrículo variou em forma e tamanho. Em uma amostra de Niquelândia, Goiás (Fiocruz s/n), apresentou-se com a forma triangular, com 1/3 do comprimento do átrio, que tem a forma arredondada (Figura 22G); em uma amostra de Camaçari, Bahia (UERJ 7475) o ventrículo é triangular, medindo três vezes o tamanho do átrio; enquanto que em uma amostra do Rio de Janeiro (UERJ 10560), além do rim estar mais posicionado internamente, o ventrículo e o átrio apresentam a mesma proporção de tamanho (Figura 22I). A porção terminal do sistema excretor não é paralela a borda do manto e ultrapassa a porção glandular, em todas as amostras estudadas (Figura 22G-I). O poro excretor localiza-se na extremidade da porção terminal, o restante das estruturas possui a mesma topologia.

O **sistema reprodutor** (Figura 23A-I) possui ovoteste de forma semi-esférica, com ácinos arredondados e de diâmetros semelhantes. O número de divertículos no ovoteste variou de 22 a 38 (Figura 23A-C). A vesícula seminal esta localizada próximo ao ovoteste e apresentou de três a seis divertículos, pouco projetados (Figura 23D-F); podendo alcançar até o triplo da largura do ovispermoduto. A glândula de albúmen apresenta textura heterogênea, variando da metade da largura (Figura 23A) até uma largura semelhante (Figura 23B e C), em vista dorsal, do que a da glândula nidamental, que tem a forma alongada. Essa glândula tem o comprimento três vezes maior do que a largura e as extremidades anterior e a posterior geralmente arredondadas, porém em

algumas populações a região anterior pode apresentar-se mais aguda (Figura 23B); a superfície dessa estrutura tem uma textura homogênea e de aspecto acinoso (Figura 23A-C). O útero apresenta-se arredondado na região anterior (Figura 23A-G); o apêndice terminal do útero é longo, com o mesmo comprimento da largura da glândula nidamental (Figura 23A-G) e fino, pois tem a mesma largura do ovispermoduto; os espécimes da população de Niquelândia, Goiás (Fiocruz s/n) apresentaram a extremidade dilatada. A espermateca tem forma arredondada e o seu duto tem a mesma espessura da vagina (Figura 23A-C). O número de folículos na próstata variou de cinco a oito (Figura 23D-G) e em vista ventral observam-se os folículos da próstata flexionados, como se fossem dedos voltados sobre a palma das mãos, conforme descrito e figurado por Santos (2003: fig. 27) para essa espécie. O complexo ejaculatório possui flagelo longo, que alcança o triplo do comprimento do prepúcio (Figura 23H-I). O prepúcio é grosso, com largura de 1/3 do seu comprimento (Figura 23H-I).

O **sistema nervoso** apresentou, em vista dorsal, a comissura cerebral visível e geralmente fina, pois a sua largura não ultrapassa a metade da largura do gânglio cerebral (Figura 23J). Os espécimes da população do rio Guandu, Rio de Janeiro (UERJ 10560) apresentaram a forma da porção intermediária do protocérebro convexa e os nervos, tentacular, peritentacular externo e óptico são próximos e partem da região anterior do gânglio cerebral (Figura 23K). Em vista ventral, os gânglios pediosos, são da mesma largura do que os gânglios cerebrais e estão unidos por uma comissura pediosa curta, pois os gânglios pediosos são tão próximos que não se observa a comissura (Figura 23L).

Distribuição geográfica: A distribuição atual de *G. radiata* é ampla e se estende do sul dos Estados Unidos até a região noroeste da Argentina, na America do Sul, com referências para o Texas (Basch 1963), Geórgia e Flórida (Basch 1963; Hubendick 1967); Antigua (*apud* Lanzer 1996), Bahamas (Hubendick 1967), Barbados (Schomburgk 1848), Costa Rica (Hubendick 1967), Cuba (Aguayo 1938; Hubendick, 1967), República Dominicana (Malek 1985), Grenada (Harrison 1983), Guadeloupe (Hubendick 1967; Pointier 1976), Guatemala (Walker 1917; Goodrich e van der Schalie 1937; Hubendick 1967), Honduras (Pfeiffer 1858), Jamaica (Walker 1921; Hubendick 1967), Martinique (Aguayo 1966), México (Hubendick 1967), Nicaragua (Tate 1870, Hubendick 1967; Lanzer 1996; Thompson 2008), Panamá (Zetek 1918), Porto Rico (Harry e Hubendick 1964; Hubendick 1967), Santa Lúcia (Harrison 1983), São

Vincente (Harrison 1983) e Trinidade (Smith 1896) na América Central; Colômbia (Hubendick 1967), Venezuela (Hubendick 1967) e Argentina (Ovando et al. 2014), na América do Sul. No Brasil, esta espécie foi encontrada nas regiões Norte (Irmler 1975; Lanzer 1996), Nordeste (Lanzer 1996; Santos 2003; Cantanhede et al. 2014), Centro-oeste (Santos 1995; Thiengo et al. 2005; Mattos et al. 2013; Fernandez et al. 2014) e região Sudeste (Lacerda et al. 2013).

Kotzian e Amaral (2014) registraram *G. radiata*? na região da Caatinga, no Estado da Bahia, no curso principal do rio Contas e apresentaram fotos das conchas e partes moles, infelizmente desidratadas. Segundo os próprios autores a identificação é duvidosa. A concha apresenta linhas radiais na teleoconcha e ápice centralizado (Kotzian e Amaral 2014: fig. 4a-e), em vista dorsal, já em vista lateral, observa-se a ausência de uma concavidade posterior, característica do gênero *Gundlachia*. Segundo os caracteres observados na concha, uma vez que as impressões musculares não são visíveis, provavelmente se trata de *Laevapex* sp., sendo pouco provável que seja *G. radiata*.

Cantanhede et al. (2014) registraram essa espécie, pela primeira vez, em cinco municípios da baixada maranhense, no Estado do Maranhão (Anajatuba, Monção, Viana, São Bento e São Vicente Férrer).

Ovando et al. (2014) revisando os ancilídeos da Argentina registraram *G. radiata* para quatro localidades (Jujuy, Salta, Tucumán e Corrientes). Os espécimes coletados em Salta foram encontrados em lagoas temporárias, o que pode ter propiciado, a formação de conchas septadas encontradas nesses locais. Essas conchas apresentaram diferentes estágios de formação de septos (Ovando et al. 2011). Em Tucumán foram encontradas em um rio aderidas em folhas marginais, enquanto em Corrientes habitavam brejos e pântanos.

As populações de *G. radiata* com as maiores abundâncias relativas têm sido coletadas em águas lênticas, como reservatórios de Usinas Hidrelétricas (Thiengo et al. 2005; Fernandez et al. 2014), embora sejam coletados também em ambientes lóticos, como a população coletada no rio Guandu (UERJ 10409), o hábitat que eles são mais facilmente encontrados são nas regiões de pouca correnteza. Os espécimes coletados em Belém foram encontrados no Lago Água Preta, aderidos nas vegetações marginais, enquanto que na praia do Parafuso, Camaçari, Bahia foram encontrados aderidos em *Eichornia* spp., acreditamos que a hipótese levantada para *F. fragilis* (Lacerda et al. 2015), possa se aplicar para *G. radiata*; uma vez que essa planta aquática invasora pode

facilitar a dispersão de diferentes macroinvertebrados (Henry-Silva et al. 2010), para bacias hidrográficas com origem e história de formação distintas (Leal 2011). A ampla distribuição geográfica e a baixa divergência genética de *G. radiata* observada nas populações analisadas de distintas bacias hidrográficas (Atlântico Leste, Alto do rio Paraná e a bacia do rio do Paraguai) nos permitiram levantar essa hipótese, uma vez que a espécie está registrada atualmente nessas distintas bacias, suas divergências morfológicas e moleculares não são significativas, conforme observado em *F. fragilis* (Lacerda et al. 2015).

Os lotes provenientes dos estados do Pará, Belém (UERJ 7154); da Bahia, Camaçari (UERJ 7475); do Mato Grosso do Sul, Aquidauana (UERJ 9340-1); Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes (UERJ 8651) representam novos registros de ocorrência para a espécie. A figura 24 apresenta a distribuição geográfica das espécies de *Gundlachia*.

Considerações: Até o momento não foi possível coletar material da localidade-tipo, mas os trabalhos subsequentes apresentaram em conjunto, diversos caracteres utilizados na diagnose de *Gundlachia radiata.* A descrição original de Guilding (1828) reproduzida na Figura 14, apresenta uma concha relativamente, grande (> 6,5mm de comprimento) quando comparada com as demais espécies de *Gundlachia*; com as bordas paralelas semelhantes aos diversos espécimes observados nesse estudo (Figura 16); diferindo um pouco o ápice, que em Guilding é um pouco mais agudo e descentralizado (Figura 14A). Em contrapartida, nas partes moles, a presença da área adesiva alongada e continua na parte interna da impressão muscular anterior direita é semelhante às ilustrações de Guilding (Figura 14B), Hubendick 1967 (Figura 15) e demais trabalhos (Harrison 1983; Santos 1995, 2003; Ovando et al. 2011, 2014; Lacerda et al. 2013).

Os caracteres morfológicos geraram alguns problemas taxonômicos, como por exemplo, a descrição da espécie *Gundlachia ancyliformis* Pfeiffer, 1849, baseada em uma forma gundlaquióide, ou ainda a criação do gênero *Poeyia* por Bourguignat (1862) com a espécie-tipo *Poeyia gundlachioides*, segundo Crosse (1890 *apud* Santos 1995), representa uma das formas gundlaquióides de *G. ancyliformis*, e como esta espécie é sinônimo sênior de *Ancylus radiatus* Guilding, 1828, *Poeyia* caiu na sinonímia de *Gundlachia*. Hubendick (1964) considera *A. radiatus* (=*G. radiata*) a verdadeira espécie-tipo de *Gundlachia*, por ser o táxon mais antigo. Embora essa discussão esteja

mais no ambito do estabelecimento do gênero de *Gundlachia*, ela exemplifica como a maioria dos sinônimos de *G. radiata* foram estabelecidos, baseando-se principalmente em formas septadas da concha (Santos 1995, 2003).

Além da formação do septo, a concha dos ancilídeos sofre influência do ambiente, de forma que populações da mesma espécie podem ser descritas como espécies diferentes (Walther et al. 2006; McMahon 2004), resultando em longas listas sinonímicas (Hubendick 1967). Assim, fica claro a necessidade de estudar a variação morfológica das espécies, conchas e partes moles, para contribuir com a taxonomia e a sistemática, evitando descrições baseadas somente na forma gundlaquioide, ou em variantes morfológicas conforme era feito antigamente.

Em relação às variações morfológicas destacamos a população do rio Guandu, Rio de Janeiro (UERJ 10409, 10460) que apresentou os seguintes caracteres como autapomorfias: palpo oral inteiro; impressão muscular posterior elíptica; cúspides principais do dente central longas; glândula salivar com diâmetro irregular; bulbo bucal arredondado; 38 ácinos no ovoteste (+ que 36) e a glândula de albúmen e a nidamental com largura semelhante.

A população coletada na Hidrelétrica da Serra da Mesa, Goiás (Fiocruz s/n) apresentou os seguintes caracteres como autapomorfias: protoconcha com depressão apical rasa; glândula salivar com diâmetro irregular; 37 ácinos no ovoteste (+ que 36) e a extremidade posterior do pé afilada. Segundo a análise cladística, a população de *G. radiata* coletada na Praia do Parafuso, Camaçari, Bahia (UERJ 7475) não apresentou nenhuma autapomorfia. As demais populações estudadas apresentaram suas estruturas dentro dos intervalos já mencionados.

As autapomorfias das distintas populações de *G. radiata* foram utilizadas para compor a diagnose da espécie.

Verificou-se que tanto a forma, da abertura da concha, quanto o ápice mais próximo da linha mediana da concha de *G. radiata* e as demais espécies do gênero, diferem entre si. Enquanto a primeira tem a forma da abertura elíptica e com margens paralelas (Figura 16), as demais espécies apesar de possuírem uma forma elíptica, em geral, não apresentam margens paralelas entre si, exceto *G. bakeri*, que apresenta a forma da abertura arredondada (Figura 31A).

Gundlachia radiata difere de *G. bakeri, G. leucaspis, G. lutzi, G. ticaga e G. saulcyana e Gundlachia* n. sp. 2 por possuir uma depressão apical ampla e rasa; e uma

concha baixa, enquanto nas demais espécies a depressão apical é curta e profunda e a concha alta.

Harrison (1983) revisou a espécie e acrescentou informações sobre a concha e a rádula, com o uso do MEV. Segundo ele, o ápice é obtuso e nunca se projeta além da borda da concha, semelhante ao que foi observado nos lotes estudados (Figura 17). As linhas radiais da teleoconcha não estão presentes na maioria das populações estudadas, o que já tinha sido observado por Santos (1995). Segundo a autora, em algumas populações essas linhas poderiam estar ausentes, não sendo, portanto, um caráter relevante para a sistemática.

Em *G. radiata*, a concha gundlaquióide, conforme ilustrada na Figura 2A, é comum (Hubendick 1964; Santos 2003; Ovando et al. 2014). Entretanto, na maioria dos lotes analisados não observamos tal característica morfológica.

Gundlachia radiata apresenta uma ampla variação intra e inter-populacionais relativa à pigmentação do teto do manto (Lacerda et al. 2013), conforme observado entre as diferentes populações do Estado do Rio de Janeiro (Figura 20). Outras populações apresentam os padrões de manchas, de forma mais homogênea. Os espécimes coletados em Santa Cruz, Rio de Janeiro apresentaram as manchas mais concentradas na região anterior do teto do manto (Figura 20A).

A morfologia externa das partes moles e as impressões musculares aqui apresentadas (Figura 19) são semelhantes à descrição e ilustração feitas por Harrison (1983: fig. 3A) para espécimes coletados em Cardenas, Cuba (América Central), localidade próxima da localidade-tipo da espécie, e a diversas amostras estudadas por Santos (1995, 2003).

De acordo com a figura e descrição de Harrison (1983: fig. 8), o dente central possui duas cúspides principais assimétricas, sem uma cúspide acessória entre elas (Figura 21C), semelhante ao observado no espécime de *G. radiata* do Rio de Janeiro (Figura 21A) e diferente do dente central de *G. bakeri* (Figura 34B), que apresenta uma ou duas cúspides acessórias entre as duas principais e de *G. ticaga* (Figura 44A), que apresenta somente uma cúspide acessória entre as duas principais.

Ovando et al. (2014) apresentaram imagens de MEV da concha, rádula (Figura 21) e morfologia externa das partes moles. Os espécimes figurados da Argentina são semelhantes a todos os espécimes estudados

O sistema excretor é mais sinuoso do que o de *G. bakeri*, desde a primeira porção do rim (Figura 33E), e tem o duto renopericárdico alongado, podendo ser

visualizado no momento da dissecção, o que difere de *G. radiata.* O ventrículo é em torno de quatro vezes maior do que o átrio (Figura 22H), enquanto que em *G.bakeri*, essa relação é semelhante (Figura 33E). Essa diferença pode estar associada ao maior tamanho corporal de *G. radiata*, pois essa estrutura tem a função de auxiliar e impulsionar a eliminação dos líquidos intracorpóreos, quando através de sua contração, os excretas caem na região pericárdica que são conduzidas pelo duto renopericárdico ao rim para sua posterior eliminação.

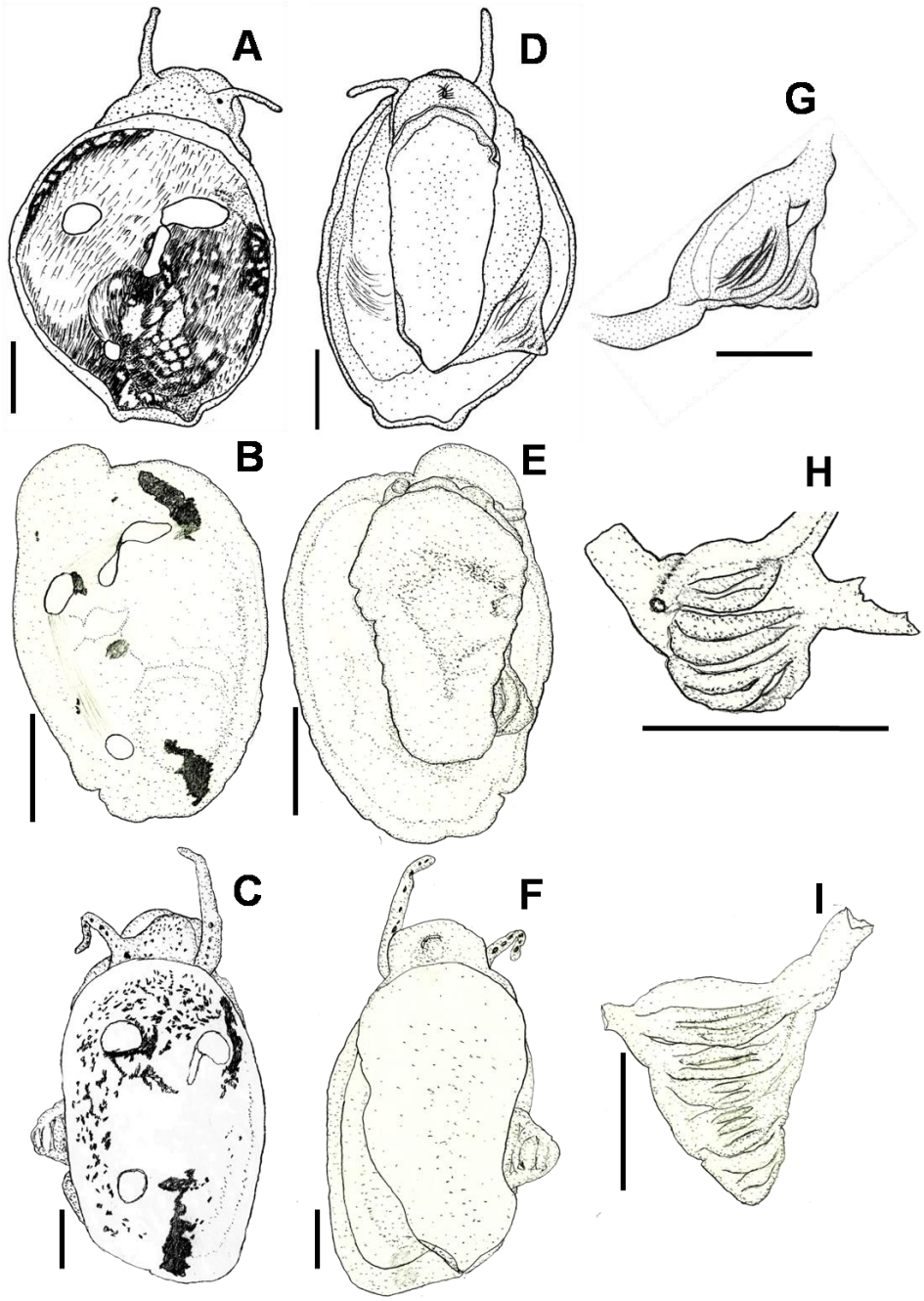
O sistema digestório apresentou o bulbo bucal em forma ovalada; o saco radular é longo, ultrapassando o bulbo bucal (Figura 22C); as demais estruturas apresentaram uma topografia semelhante à *G. bakeri*.

Ao longo desse trabalho, a maioria das espécies apresentou variações morfométricas que culminaram em diferença estatística significativa, quando submetidas aos testes estatísticos, conforme já foi aplicado por Lacerda et al. (2011) para *G. ticaga*. Apesar da morfologia das conchas, tradicionalmente, auxiliar na diferenciação das espécies de *Gundlachia* (Lanzer 1995; Santos 1995, 2003; Ovando et al. 2014), o uso de análises morfométricas não são muito aplicadas, mas tem demonstrado ser uma importante ferramenta no auxílio da identificação das espécies (Benaim e Absalão 2011; Lacerda et al. 2011). As discussões sobre as variações morfométricas das espécies de *Gundlachia* serão abordadas na seção de Morfometria.

O presente estudo acrescentou novas informações, a partir de distintas populações, ampliando as informações sobre as conchas e apresentando de forma comparativa os dados sobre a morfologia interna, que a difere das demais espécies de *Gundlachia*, apresentadas na diagnose. Além disso, os dados moleculares baseados nos genes mitocondriais confirmam a distinção de *G. radiata.* Portanto, *G. radiata* além das diferenças morfológicas, diverge geneticamente das demais espécies de *Gundlachia*, que sustenta a sua definição e distinção de outros táxons congenéricos.

A tabela 6 traz um sumário dos principais caracteres que foram comparados entre as diferentes espécies de G*undlachia*, que serão utilizados para a composição da matriz de caracteres da análise filogenética que será realizada após o término das comparações morfológicas.

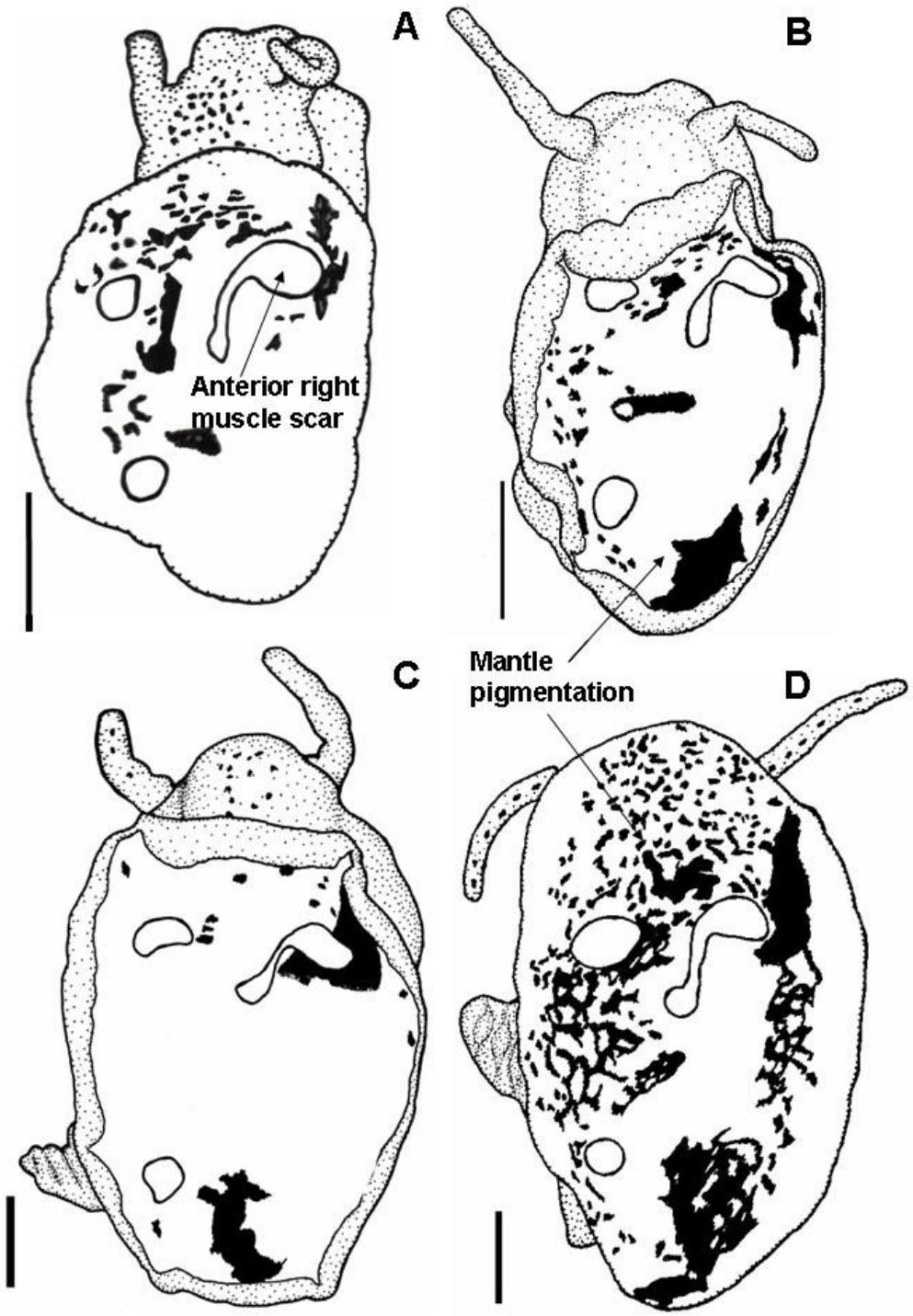
Figura 19 - Morfologia externa das partes moles de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) de distintas localidades.



Legenda: **(A-C)** Vista dorsal das partes moles, evidenciando as formas das impressões musculares (MAD elípticos, com um prolongamento interno da área adesiva; e MAE e MP arredondados), a pigmentação do corpo e os tentáculos longos. **(D-F)** Vista ventral das partes moles, evidenciando os pés alongados, com a extremidade posterior arredondada ou afilada, conforme observada no espécime de Goiás; e a forma do palpo oral, que pode ser inteiro como na maioria ou bífido. **(G-I)** Variação da forma e quantidade de lamelas nos lobos dorsais e ventrais da pseudobrânquia. **(G)** Pseudobrânquia, com o lobo dorsal com duas lamelas e ventral com cinco lamelas cada um e com largura semelhante. **(H)** com o lobo dorsal cinco lamelas cada um e com largura semelhante. Escala = 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

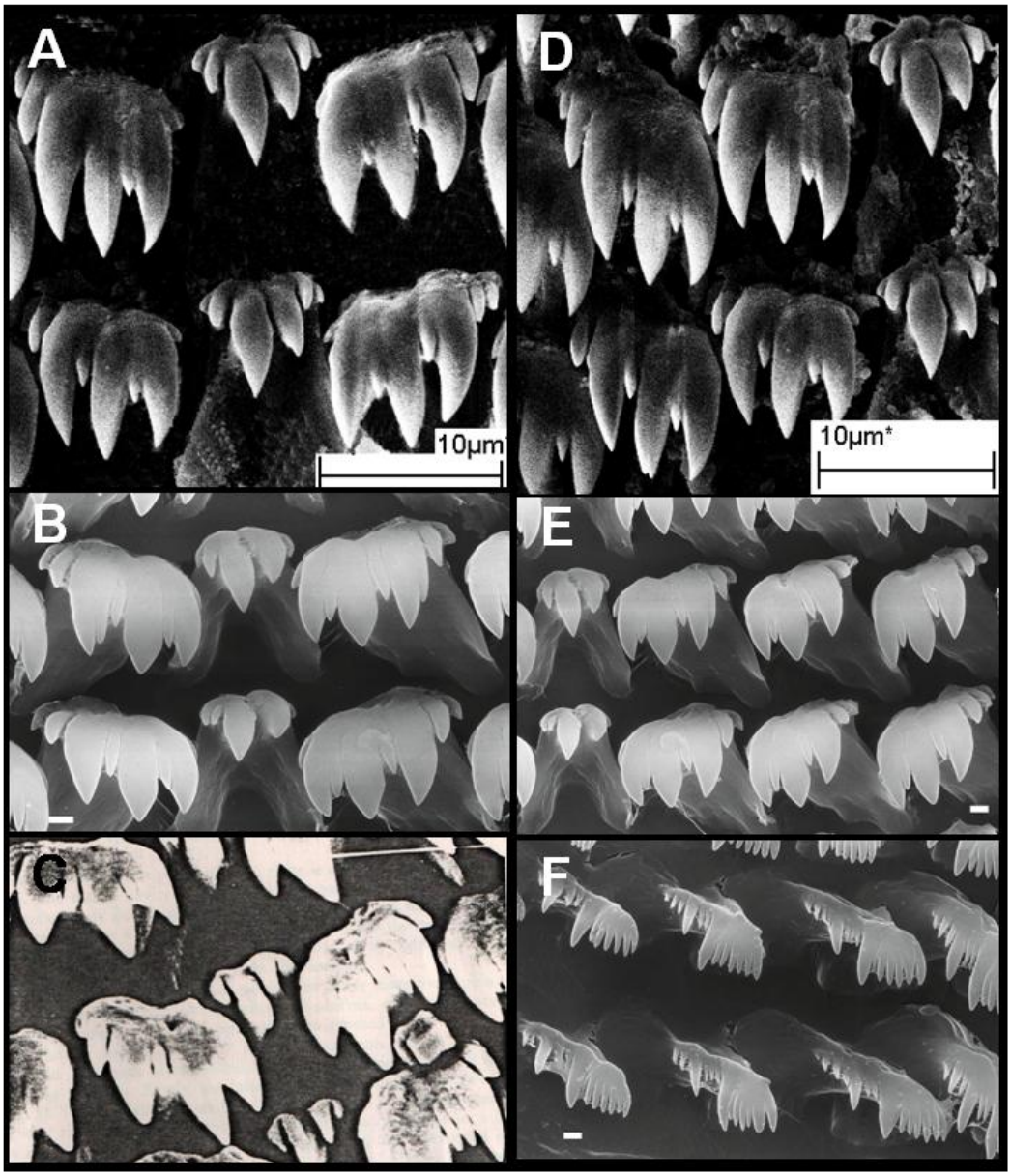
Figura 20 - Desenhos da variação da pigmentação do teto do manto de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828), do Estado do Rio de Janeiro.



Legenda: **(A)** Padrão de pigmentação do manto observado na população de Santa Cruz (UERJ 8363). **(B)** Padrão de pigmentação do manto (intermediário); **(C)** Padrão de pigmentação do manto (fraco) e **(D)** padrão de pigmentação do manto (forte). Todos os três últimos padrões foram observados na população encontrada no municipio de Nova Iguaçu (UERJ 8379). Escala= 1 mm.

Fonte: Lacerda et al. 2013.

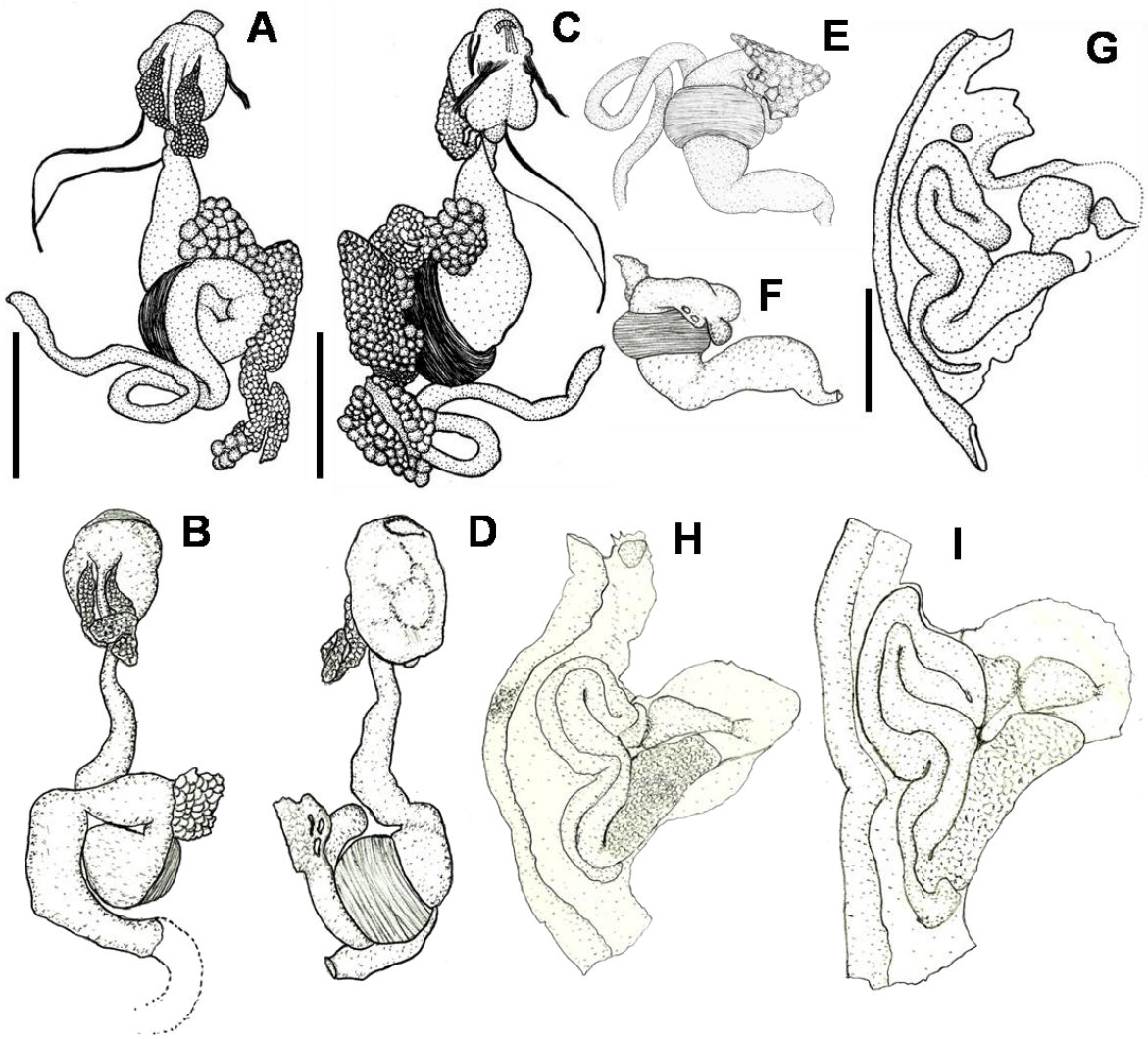
Figura 21 - Morfologia da rádula de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828).



Legenda: **(A)** Vista dorsal da região mediana da rádula, mostrando os dentes centrais e laterais. As cúspides principais são assimétricas, curtas e afiladas, sendo a esquerda o dobro da direita. A placa basal é trapezoidal e longa. **(B)** Dentes laterais apresentam as três cúspides principais com tamanhos diferentes, sendo o mesocone o mais largo e mais longo. **(C)** Os dentes marginais são multicuspidados, apresentando 11 cúspides sendo as três cúspides principais visíveis até a borda da rádula. (A, D) UERJ 10409. Escala 1µm.

Fonte: MEV de X.M.C. Ovando (B, E, F) em Ovando et al., 2014; (C) Harrison, 1983.

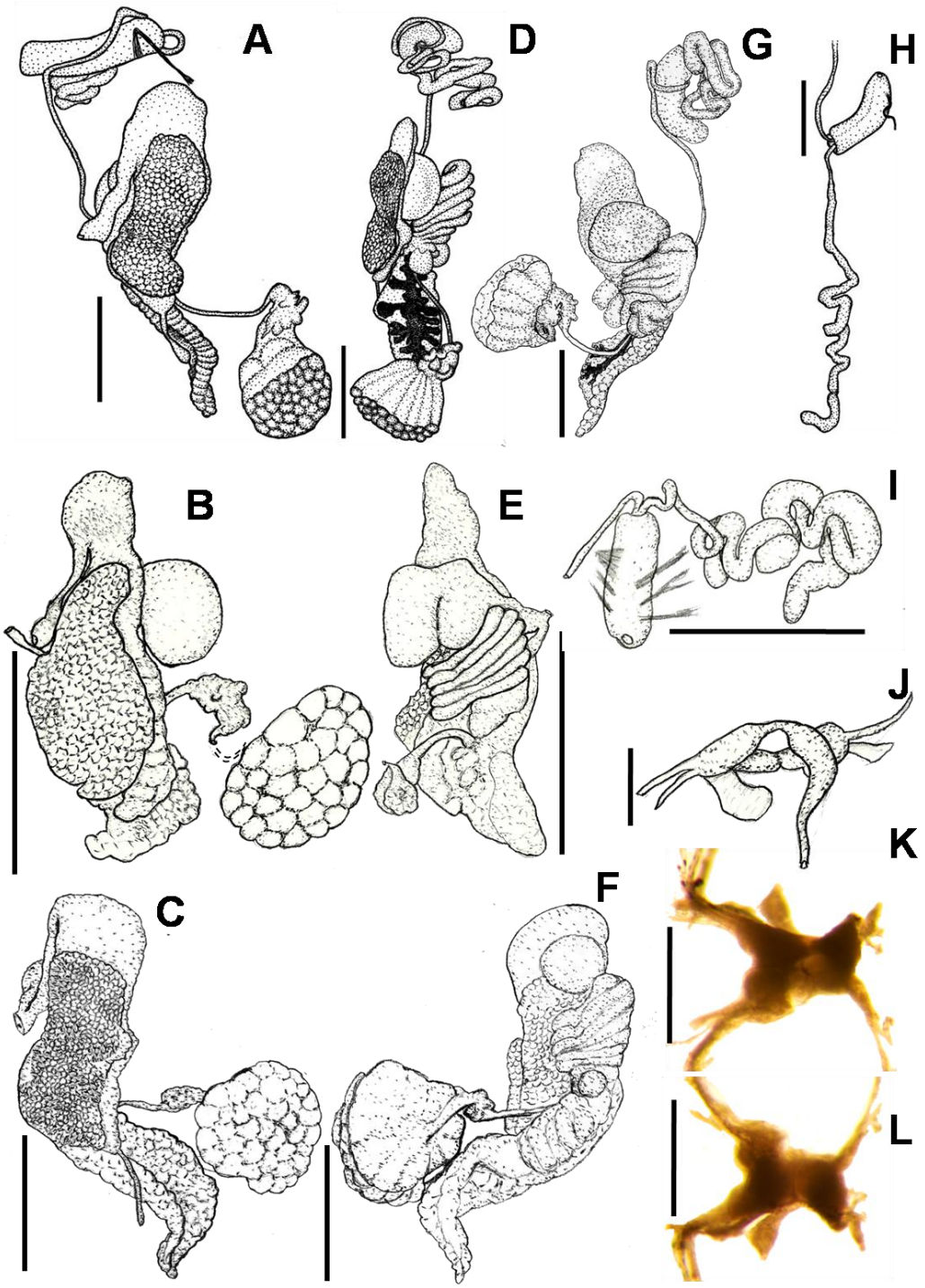
Figura 22 - Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) de distintas localidades.



Legenda: **(A-F)** Sistema digestório. **(G-I)** Sistema excretor. **(A-B)** Vista dorsal, evidenciando bulbo bucal alongado, glândula salivar longa e regular, esôfago com a largura menor do que a do bulbo, estômago e intestino. **(C)** Vista ventral, evidenciando o saco radular curto. **(D)** Vista lateral, evidenciando **(E-F)** Vista lateral do estômago, destacando a região muscular, a pilórica e o ceco curto. **(G-I)** Vista dorsal do sistema excretor, evidenciando a forma sinuosa e a variação na proporção do ventrículo/átrio. Escala= 1,0 mm. (A, C, E, G) Represa de Serra da Mesa, GO (Fiocruz s/n). (B, D, H) Camaçari, BA (UERJ 7475) e (F, I) Nova Iguaçu, RJ (UERJ 10560).

Fonte: O autor, 2015.

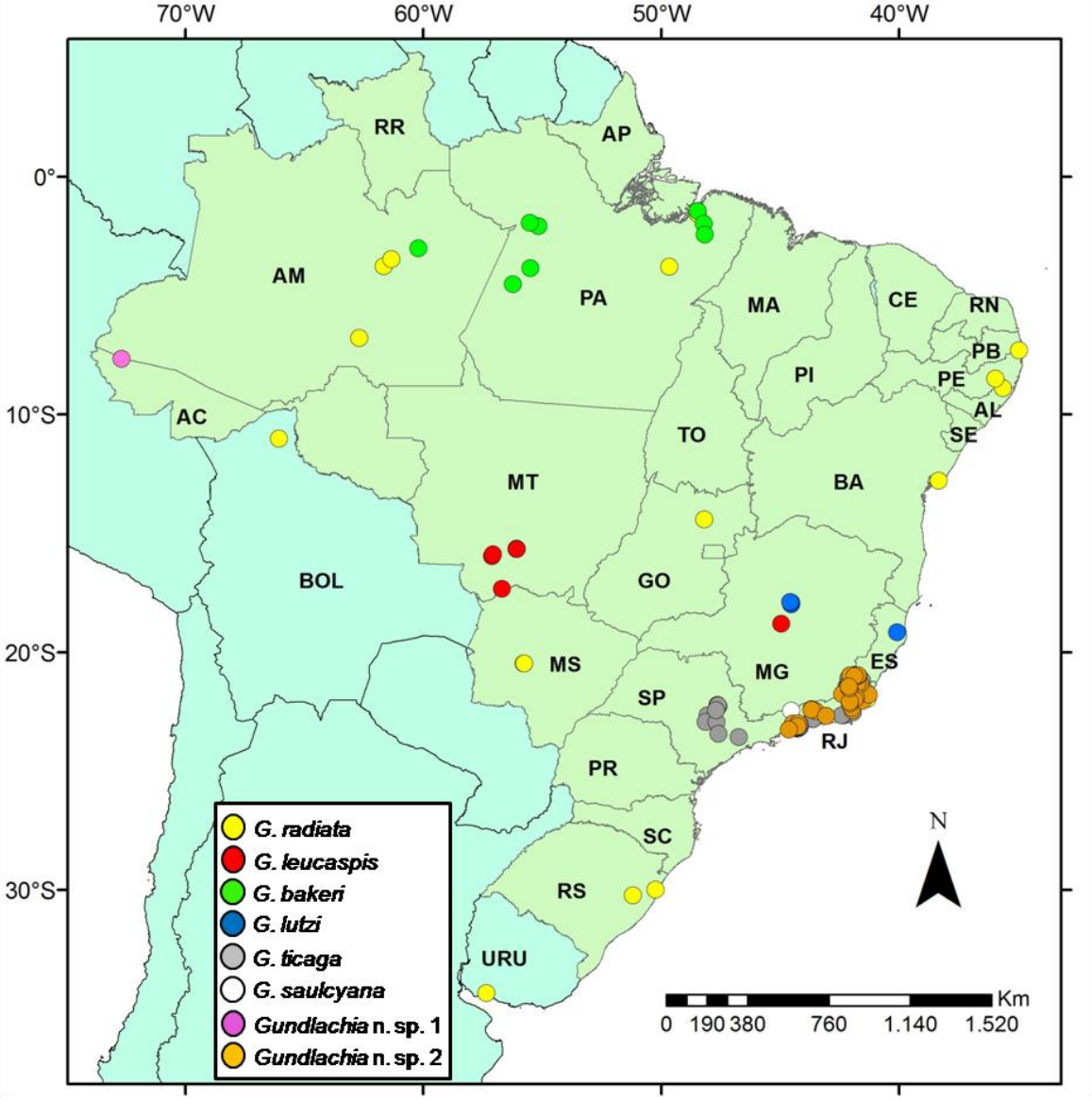
Figura 23 - Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) de distintas localidades.



Legenda: **(A-I)** Sistema reprodutor. **(J-L)** Sistema nervoso**. (A-C)** Vista dorsal, evidenciando a região anterior do útero arredondada, o seu apêndice terminal alongado e a variação do número de ácinos no ovoteste. **(D-G)** Vista dorsal, exceto a primeira lateral, que evidencia a vesícula seminal e seus divertículos, os folículos da próstata e a espermateca. **(H-I)** Complexo ejaculatório com flagelo longo, aproximadamente o triplo do comprimento do prepúcio. **(J e K)** Vista dorsal do sistema nervoso, evidenciando, a comissura cerebral fina, posicionada mais anteriormente no anel circum-esofagiano. (**L)** Vista ventral, evidenciando os gânglios e comissura pediosa curta. Escala= 1,0 mm. (A, D, G, H) Represa de Serra da Mesa, GO (Fiocruz s/n). (B, E, J) Camaçari, BA (UERJ 7475) e (C, F, K, L) Nova Iguaçu, RJ (UERJ 10560).

Fonte: O autor, 2015.

Figura 24: Mapa da distribuição geográfica das oito espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849.



Legenda: registros de ocorrência das espécies de *Gundlachia*, baseado no material examinado. Datum WGS 84.

Fonte: O autor, 2015.

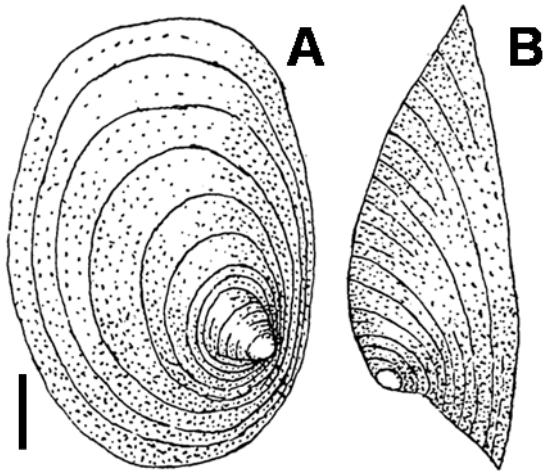
4.1.1.2 *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901)

Binômio original: *Ancylus leucaspis* Ancey, 1901

(Figuras 25-30)

Descrição original: "*Testa depressa, tenuis, griseo-albescences, ovalis, concentrice striatula, interdum passim leviter subplicatula, vertice valde excentrico, post medium et ad sinistram partem sito, limbo extero valde approximat, obtuso. Pars sinistra destincte convexo-depressa. Long. 6 $^{2/3}$, lat. 4 $^{1/3}$, alt. 2 mm".*

Figura 25 - *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901).



Legenda: Ilustração da concha retirada de Walker (1925: fig. 3, 4). **(A)** Vista dorsal, evidenciando a abertura elíptica e o ápice projetado próximo da borda da concha. **(B)** Vista lateral, destacando o ápice arredondado, recurvado para direita e linhas de crescimento concêntrico. Escala = 1 mm.
Fonte: Walker (1925: fig. 3, 4).

Lista sinonímica

Ancylus leucaspis—Ancey, 1901: 103.

Uncancylus leucaspis—Walker, 1925: 3 [nov.comb.].

G. gayana—Hubendick, 1967: 38.

? *Hebetancylus moricandi*—Lanzer, 1996 (non Orbigny, 1837).

Gundlachia leucaspis—Santos, 2003: 210 [nov.comb.].

Material Tipo: segundo Dance (1966), a coleção do coletor César-Marie-Felix Ancey foi vendida, os tipos foram principalmente para a coleção de P. Dautzenberg (Paris). Os outros lotes distribuídos para diferentes instituições: Muséum Nacional d'Histoire Naturelle, Laboratoire de Malacologie (*Journal de Conchyliologie* collection), Paris, France (Paris Mus. (J.C.)); Musé Royal de l'Afrique Centrale, Tervuren, Belgium (Tervuren Mus.); Bernice P. Bishop Museum, Honolulu, Hawaii, EUA (Bishop Museum.) e Bristh Museum (Natural History), London, England (British Mus.). Posteriormente, a coleção de P. Dautzenberg foi para o Institut Royal des Sciences Naturalles de Belgique, Bélgica (Brussels Mus.). As pesquisas nesses museus por meio dos bancos de dados eletrônicos disponíveis não foram produtivas em localizar o material-tipo desta espécie.

Localidade-tipo: Estado do Mato Grosso, nos arredores de Cuiabá, Brasil.

Etimologia: Não mencionado no texto original.

Material examinado: Brasil, *Minas Gerais*: Felixlândia (Represa de Três Marias, Balneário do Lago do Cisne), 06 animais (06 conchas e 06 partes moles), 19.VII.2013, (UERJ 10421) col. L.E.M. Lacerda. *Mato Grosso*: Cuiabá (rio Coxipó, no interior do Horto Florestal; S 15° 37' 44.5", W 56° 03' 43.6"), 44 animais (44 conchas e 44 partes moles), 23.VII.2012, (UERJ 10406); Cuiabá (rio Cuiabá, São Gonçalo), 66 animais (57 conchas e 66 partes moles), 23.VII.2012, (UERJ 10416) col. L.E.M. Lacerda, I.C. Miyahira e J.B. Carneiro; (rio Sangradouro, córrego Babaçu), 03 animais (03 conchas e 03 partes moles), 30.IX.2008, (CIAMT FAUNAQUA 1044); (rio Sangradouro, córrego Monjolinho), 04 animais (04 conchas e 04 partes moles), 30.IX.2008 col. Callil e equipe, (CIAMT FAUNAQUA 1006). *Mato Grosso do Sul*: Pantanal de Paiaguás, Rio Piquirí, 65 animais (65 conchas e 65 partes moles), 17.XI.1990, col. G. Leteriello, (UERJ 57).

Apesar de termos analisados mais de trinta lotes enviados pela Profa. Dra. Claudia Callil, da Universidade Federal de Mato Grosso e curadora da Coleção de Invertebrados Aquáticos da UFMT – CIAMT, sob forma de empréstimo, só conseguimos identificar de forma confiável, e consequentemente inserir na lista de material analisado, alguns lotes em bom estado de preservação, que continham conchas

e partes moles. Estas amostras foram coletados durante o Projeto Ecorregiões Aquáticas, desenvolvido com o apoio do CNPq/CTHidro, em 30 córregos de até terceira ordem que compõem as nascentes da Bacia do Alto rio Paraguai e seu principal afluente, Rio Cuiabá. A técnica de triagem das amostras foi utilizando peneiras seriadas, com malhas cada vez menores, associada ao uso de jato de água, segundo a Dra. Callil, em comunicação pessoal. Como o objetivo principal das amostragens, não foram os ancilídeos e sim os macroinvertebrados em geral, somente os ancilídeos menores, geralmente menores do que 1mm, ficaram íntegros ao final do processo, por terem passado direto pelas malhas. Por isso, somente alguns lotes puderam ser identificados.

Os lotes coletados no rio Cuiabá (UERJ 10416) e no rio Coxipó (UERJ 10416), foram escolhidos e tratados como os possíveis topótipos.

Diagnose: Ápice recurvado e ultrapassando a borda da concha, largura lobo ventral igual ao lobo dorsal da pseudobrânquia; região anterior do útero com três projeções arredondadas; flagelo não visualizado.

Descrição da concha de *G. leucaspis*: As 60 conchas mensuradas são relativamente pequenas (< 5mm), variando de 2,16 a 4,57 mm de comprimento. A análise descritiva básica e os índices morfométricos de *G. leucaspis* encontram-se na tabela 5. As dimensões variaram de 2,16 x 1,52 x 1,18 x 0,72 até 4,57 x 3,03 x 2,35 x 1,73 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Seus índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,68; L2/C= 0,54; A/C= 0,35; A/L1= 0,52 e L2/L1= 0,79 (Tabela 5). Segundo os índices morfométricos *Gundlachia leucaspis* possui uma concha baixa (A/C= 0,35) e estreita (A/L1= 0,52).

Os exemplares coletados no rio Coxipó (UERJ 10406) e no rio Cuiabá (UERJ 10416) utilizados no estudo morfométrico, 30 conchas de cada local, apresentaram diferença estatística significativa, segundo a Análise Discriminante (AD) (Wilks' Lambda = 0,03; df = 58; p = 0,000). Com esta análise, verificamos que apesar da diferença estatística significativa, a forma geral das conchas dos lotes analisados desta espécie é bastante semelhante, conforme veremos nas descrições e ilustrações a seguir.

Em vista dorsal, observamos que a forma da abertura da concha é elíptica (Figura 26A e B), que o ápice é projetado sobre o quadrante posterior direito e desviado

para direita, próximo à margem lateral direita da concha (Figura 26A) ou ultrapassa (Figura 26A).

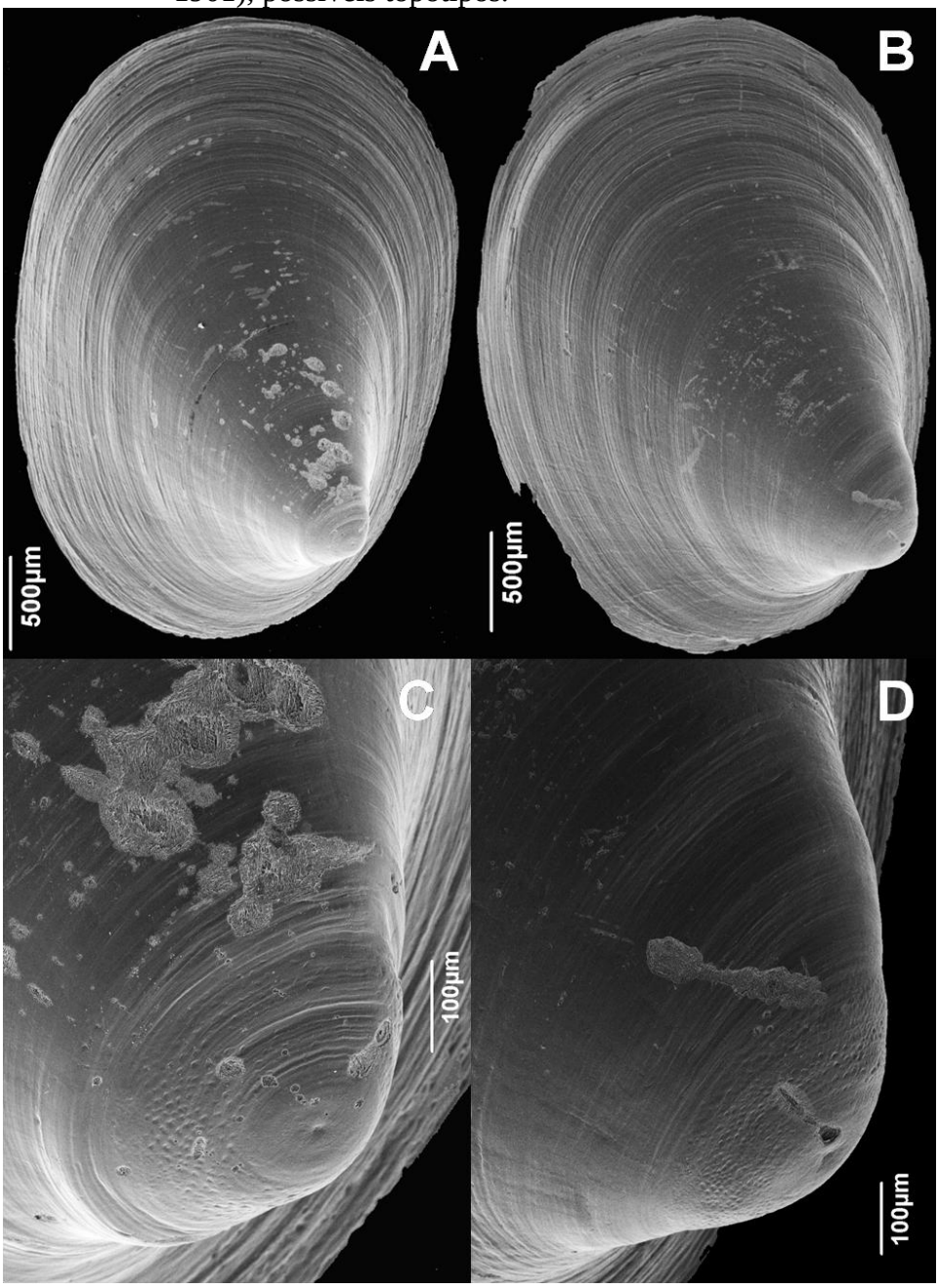
A protoconcha é arredondada e com escultura representada por por três regiões, uma depressão apical curta e profunda ocupando 5% da área da protoconcha, seguida por uma área lisa, que ocupa em torno de 45% da protoconcha, e uma área com pontuações irregulares rasas que ocupam a metade do comprimento total da protoconcha (50%) (Figura 26C e D).

A teleoconcha possui linhas de crescimento concêntricas em toda a sua superfície (Figura 26C). A coloração do perióstraco variou entre amarelo avermelhado (*Olive-Ocher,* segundo Ridgway (1912)), (Figura 27A), semelhante às seis conchas do lote (UERJ 10421), a marfim (*Olive-Buff*) (Figura 27B). O lote UERJ 10406, com 66 conchas, que representa 2/3 do lote, apresentou ambas as colorações, com predomínio da cor marfim (Figura 27A). O lote UERJ 10416, coletado no rio Cuiabá, próximo da localidade-tipo, apresentou coloração semelhante e o ápice na maioria das conchas ultrapassa a borda da concha. Os demais lotes apresentaram a coloração ambar. Oito das 66 conchas, correspondendo a 12% das conchas coletadas do lote (UERJ 10416), apresentaram diferentes estágios de formação de septo, conforme representado na figura 27B. Não observamos projeções no perióstraco, como por exemplo, pelos periostracais, em nenhuma das conchas analisadas.

Em vista lateral (Figura 27C), destacamos a região dorsal, convexa e com ondulações relacionadas às linhas de crescimento, bem evidentes. A concavidade posterior não é pronunciada e o ápice é arredondado.

O ápice bem recurvado, a protoconcha com pontuações rasas e sua depressão apical curta e profunda são caracteres que podem auxiliar na identificação de *G. leucaspis*. Apesar de não serem exclusivos, pois alguns caracteres como, por exemplo, o ápice bastante recurvado, é compartilhado com *Gundlachia* n. sp. 2, e também aparece em algumas populações de *G. ticaga*. Todavia, quando associados aos caracteres das partes moles assim como aos dados moleculares, não existe dúvidas sobre a validade dessa espécie. As comparações conquiliométricas interespecíficas serão apresentadas na seção de morfometria.

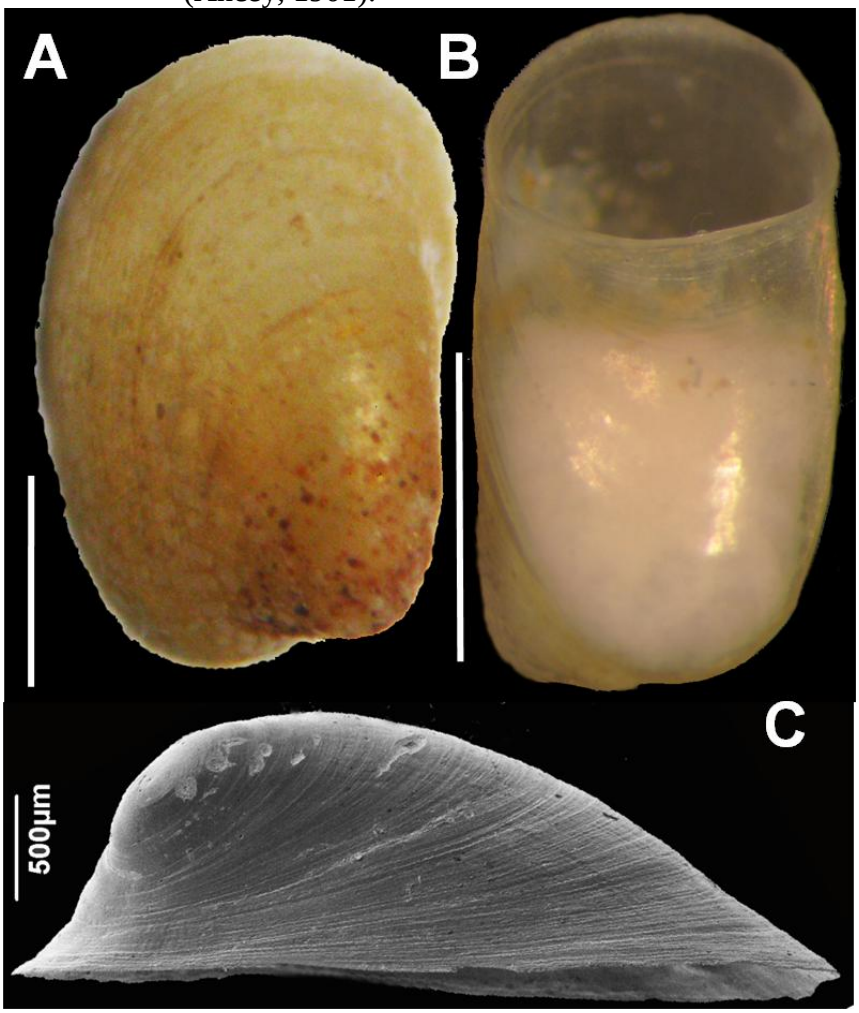
Figura 26 - Morfologia externa das conchas de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901), possíveis topótipos.



Legenda: (**A e B)** Vista dorsal da concha, coletada no rio Coxipó, ao lado do Horto Florestal (UERJ 10406) e no rio Cuiabá, MT (UERJ 10416); ambas populações apresentam o ápice próximo ou ultrapassando a borda da concha (**C e D**) detalhe da microescultura apical, apresentando um faixa de pontuações irregulares, que ocupa 50% da protoconcha, área lisa (45%) e depressão apical profunda e curta (5%) (UERJ 10406 e 10416), respectivamente.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 27 - Morfologia externa das conchas de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901).



Legenda: *Gundlachia leucaspis* – (**A)** concha em vista dorsal, representando a coloração do perióstraco amarelo avermelhado (*Oliver-Ocher*), segundo Ridgway (2005) e a forma da concha (UERJ 10421). (**B)** Concha gundlaquioide em vista ventral representando a coloração do perióstraco ambar (*Sea-foam Yellow*) e a forma da concha (UERJ 10416). (**C**) MEV em vista lateral, evidenciando a forma da concha e o ápice arredondado. Escala em A= 0,5mm; B= 1 mm.
Fonte: O autor, 2015.

Morfologia externa (Figura 28): os tentáculos são curtos na maioria dos lotes estudados (Figura 28A-C), porém o lote UERJ 10416 apresentou os tentáculos longos (Figura 28D-E). O palpo oral é bífido (Figura 28).

Gundlachia leucaspis possui três impressões musculares, sendo a anterior direita e esquerda elípticas, porém a direita tem a um estreitamento na região interna; e a posterior alongada, sendo o comprimento o dobro da largura. Contudo, observamos uma variação na forma das impressões musculares no lote UERJ 10416, o qual apresentou espécimes com o MAE e MPE arredondados (Figura 28D).

A maioria dos espécimes estudados apresentou a pigmentação no teto do manto concentrada na região anterior e no lado esquerdo (Figuras 28A e D).

Em vista ventral, observamos que a forma do pé é alongada e a extremidade posterior do pé é arredondada (Figura 28B e E).

A pseudobrânquia possui dois lobos, um lobo dorsal que tem a largura semelhante à do lobo ventral, com duas a três lamelas, enquanto o ventral variou de três a quatro lamelas (Figura 28F).

Morfologia interna (Figura 29 e 30): em relação à morfologia interna observamos a rádula (Figura 29), o restante do sistema digestório (Figura 30A-D), o sistema excretor (Figura 30E), o sistema reprodutor (Figura 30F-I) e o sistema nervoso (Figura 30J-K).

Gundlachia leucaspis apresenta as cúspides principais do dente raquidiano assimétricas, curtas e afiladas. O dente raquidiano tem quatro ou cinco cúspides no total, a placa basal tem forma trapezoidal e curta (Figura 29A); além disso, a cúspide principal esquerda possui o dobro da espessura da direita. O dente lateral apresenta as cúspides principais com largura e comprimentos distintos; o mesocone é mais largo e longo do que os demais e tem só uma cúspide acessória entre o endocone e o ectocone (Figura 29B), enquanto que o número de cúspides acessórias externas ao ectocone pode variar de duas a três. O dente marginal é multicuspidado, variando de 10 a 14 cúspides (Figura 29C). A fórmula radular da espécie é 13-1-13.

O **sistema digestório** (Figura 30A-D) apresentou o bulbo bucal com forma alongada; a glândula salivar longa e com o diâmetro constante (Figura 30A e B); o saco radular curto, pois não ultrapassa o bulbo bucal (Figura 30C); o estômago é diferenciado, semelhante aos demais Ancylinae, e formado por duas porções: uma região muscular e uma região pilórica que possuem proporções iguais no estômago; o ceco é curto, pois não ultrapassa a metade da largura da região muscular do estômago (Figura 30D).

O **sistema excretor** está localizado próximo à borda do manto, com forma geral sinuosa, em relação à borda do manto e as extremidades dessa estrutura forma a figura de um triângulo equilátero. A porção proximal desse sistema é glandular, e bem evidente, com forma sinuosa, formando flexuras em forma de V invertido, em relação à borda do manto (Figura 30E). O ventrículo, com forma arredondada, é completamente justaposto ao rim e suas dimensões são semelhantes ao do átrio que tem a forma arredondada (Figura 30E). A porção terminal do sistema excretor não é paralela à borda

do manto e ultrapassa a porção glandular. O poro excretor localiza-se na extremidade da porção terminal, o restante das estruturas possui a mesma topologia.

O **sistema reprodutor** possui a forma geral do ovoteste semi-esférica, com ácinos arredondados e de diâmetros semelhantes. O número de divertículos no ovoteste variou de 11 a 12 (Figura 30H). A vesícula seminal não foi observada. A glândula de albúmen, que tem uma textura heterogênea, tem a metade da largura da glândula nidamental, que tem a forma elíptica, tendo a região mediana mais larga do que as extremidades; a superfície dessa estrutura tem uma textura homogênea (Figura 30F) e coloração avermelhada. O útero apresenta-se modificado, com três projeções na região anterior (Figura 30F), em relação à forma arredondada, que é observada na maioria das espécies de *Gundlachia*; o apêndice terminal do útero não foi observado nas dissecções, podendo estar ausente nesta espécie. A espermateca tem forma elíptica e o seu duto tem a mesma espessura da vagina (Figura 30G). O flagelo não foi observado, podendo estar ausente nesta espécie. O prepúcio é fino, pois sua largura é em torno de 1/7 do seu comprimento (Figura 30I).

O **sistema nervoso** apresentou, em vista dorsal, a comissura cerebral visível e fina, pois a sua largura é a metade da largura do gânglio cerebral. A forma da porção intermediária do protocérebro é convexa e os nervos, tentacular, peritentacular externo e óptico, são próximos e partem da região anterior do gânglio cerebral (Figura 30J). Em vista ventral, os gânglios pediosos, são da mesma largura do que os gânglios cerebrais e estão unidos por uma comissura pediosa curta, pois os gânglios pediosos são tão próximos que não se observa a comissura (Figura 30K).

Distribuição geográfica: Há registros de ocorrência da espécie somente para Mato Grosso (Ancey 1901), Rio de Janeiro (Walker 1925; Santos 1995, 2003) e Pernambuco (Simone 2006). As nossas coletas nas principais bacias hidrográficas de Cuiabá e seus arredores, em Mato Grosso, contemplaram a localidade-tipo de *G. leucaspis* de Ancey. Foram analisados o rio Cuiabá (na altura dos municípios de Cuiabá, Várzea Grande e Santo Antônio do Leverger); o rio Coxipó, que nasce na altura da Chapada dos Guimarães e desemboca no rio Cuiabá (dentro dos municípios de Cuiabá, Coxipó do Ouro e Chapada dos Guimarães); o rio Peixe; o rio da Mutuca; e o riacho Limpo (Várzea Grande), este último sem dúvida nenhuma o rio mais impactado que coletamos em Mato Grosso. Amostramos ainda várias lagoas artificiais e naturais no entorno desses rios. Segundo nossas comparações morfológicas com os dados da

descrição original da espécie e análises comparativas com as demais espécies congenéricas consideramos *G. leucaspis* os lotes provenientes do rio Coxipó (UERJ 10406), rio Cuiabá (UERJ 10416), rio Sangradouro: córrego Babaçu (CIAMT FAUNAQUA 1044) e córrego Monjolinho (CIAMT FAUNAQUA 1006) todos pertencentes às nascentes da Bacia do Alto rio Paraguai. O registro do Balneário do Lago do Cisne, Felixlândia, Minas Gerais (UERJ 10421) pertence à bacia do médio São Francisco; embora possuem algumas diferenças morfológicas, segundo os dados moleculares os espécimes desse lote agruparam com G. *leucaspis* (Figura 70) coletados em Cuiabá. Portanto, os registros assinalados para os lotes examinados em Cuiabá e o novo registro apresentado para Minas Gerais devem ser atribuídos a espécie . O registro para Pernambuco, assinalado por Simone (2006) não foi confirmado.

Comentários: Um dos primeiros autores a contribuir com informações morfológicas sobre *G. leucaspis* foi o Dr. Bryant Walker (1925), baseados em espécimes enviados pelo Dr. Adolpho Lutz, que tinha um grande interesse em conhecer a fauna local. A descrição original não foi figurada pelo autor e, segundo Walker (1925), ele não foi capaz de determinar o que aconteceu com o tipo na dispersão da Coleção Ancey.

Walker (1925), utilizando material procedente de Niterói, Rio de Janeiro, descreveu a concha (6,75 x 4,75 x 2 mm) e enviou a rádula para o Dr. H. B. Baker da Philadelphia, que desenhou e apontou as suas principais características. Esse material de Niterói foi atribuindo a esta espécie pelo autor. Em 1995, Santos levantou a hipótese que a rádula apresentada por Walker (1925) poderia ser de *Uncancylus concentricus*, baseada no desenho, logo este material de Niterói não seria *G. leucaspis*. Baseado na ilustração da concha e rádula realizada por Walker (1925: fig. 3, 4), não deve ser atribuída a espécie., pois a forma retangular do dente raquidiano e as cúspides principais simétricas indicam que se trata, provavelmente, de um espécime de *Ferrissia* e não de *Gundlachia* que é assimétrica; a concha conforme a ilustração e descrição apresenta pontuações irregulares e linhas radiais na região anterior da teleoconcha, sugerindo a possibilidade de ser *G. ticaga*, que é a espécie com a maior amplitude de distribuição geográfica do estado do Rio de Janeiro (Thiengo et al. 2001; Lacerda 2011). As dimensões da concha dada por Ancey foi de 6 2/3, lat. 4 1/3, alt. 2 mm, revelam uma concha baixa, pela relação de A/C (0,30) e estreita pela relação da A/L (0,46), embora as conchas de Ancey, apresentem as maiores dimensões morfométricas se comparadas

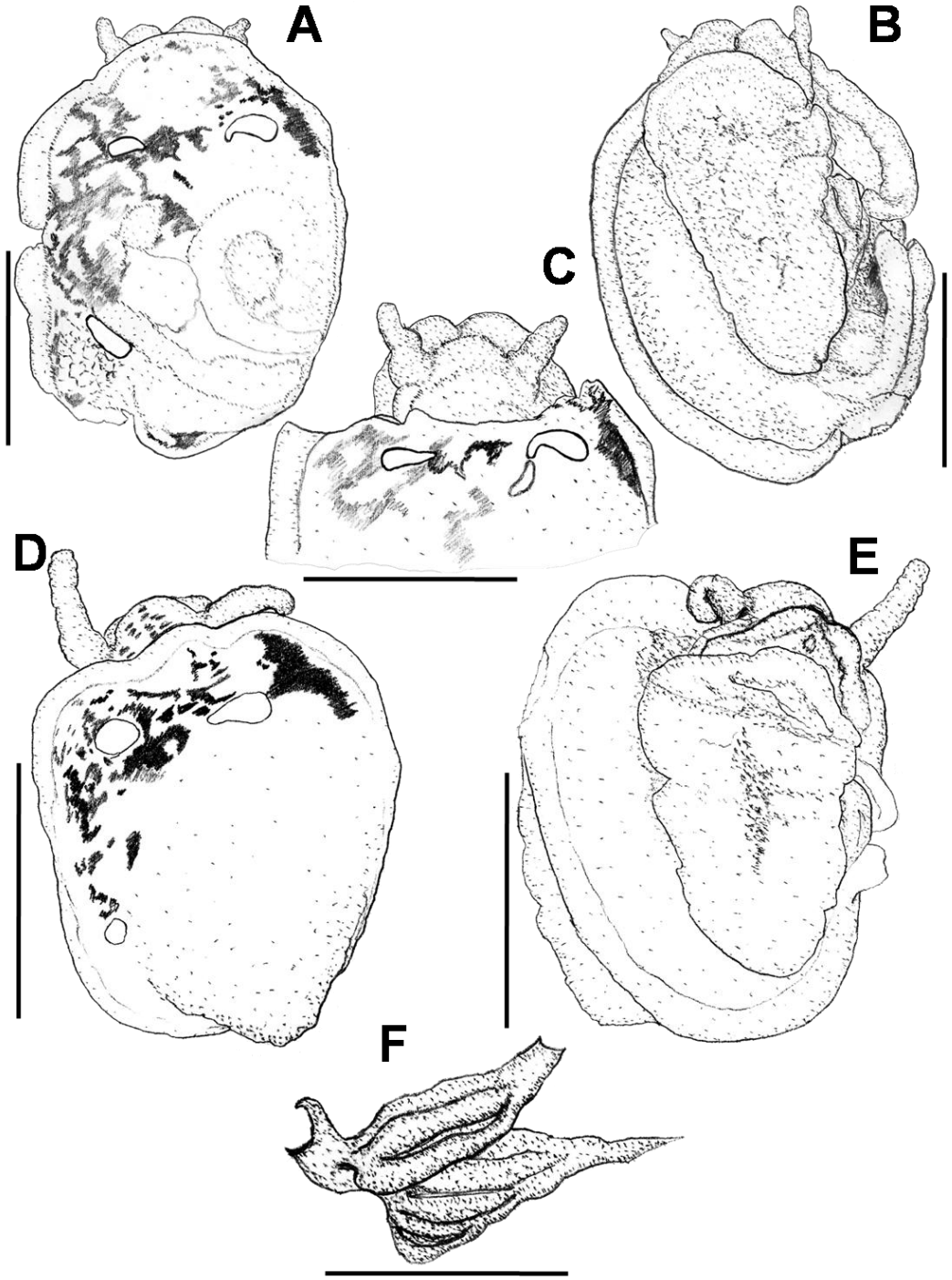
com as conchas coletadas em Mato Grosso, ambas são estreitas e relativamente altas, se comparadas com as demais espécies de *Gundlachia*.

Hubendick (1967) sinonimizou *A. leucaspis* em *G. gayana* (d'Orbigny, 1837), por incluir, em geral, todas as conchas com formas da abertura mais "arredondadas", apesar de ter incluído também espécimes com a abertura elíptica, como foi o caso dos espécimes coletados no rio Limari no Chile (USNM 599682) (Hubendick 1967: fig. 205). O *form-group G. gayana* proposto por Hubendick (1967) não foi corroborado posteriormente por diversos autores (Santos 1995; Lanzer 1996; Simone 2006), que alocaram a maioria táxons inclusos no *form-group G. gayana* de Hubendick em distintas espécies: *Anisancylus obliquus* (=*Ancylus gayanus* Orbigny, 1837; *Ancylus gayanus rudolfii* Biese, 1948; *Ancylus gayanus maximus* Biese, 1948; *Ancylus charpentierianus* Bourguignat, 1853); *Uncancylus concentricus* (=*Ancylus rushii* Pilsbry, 1897).

Lanzer (1996) sinônimizou *?Ancylus leucaspis* com *H. moricandi*, com dúvidas. Provavelmente, baseando-se na outra espécie de Ancey, *Ancylus lemoinei* Ancey, 1901, descrita para a mesma região (Mato Grosso). Atualmente, *A. lemoinei* é considerado sinônimo de *H. moricandi* (d'Orbigny, 1837) por Santos (1995, 2003) e Simone (2006). Corroboramos essa proposição, baseado nas dimensões das conchas (11,5 x 6 x 2,5 mm), que estão fora da amplitude morfométrica de *Gundlachia*, exceto *G. radiata* que pode ser incluída nessa amplitude; e também pela forma alongada da abertura da concha, conforme observado em Walker (1925: fig. 5).

Gundlachia leucaspis foi citada por Santos (2003), baseada nos seguintes caracteres: concha deprimida, ápice voltado para a direita; protoconcha com pontuações e teleoconcha com linhas de crescimento e finas linhas radiais pouco nítidas, na porção anterior da concha. Segundo a autora o tipo é tido como não encontrado, "perdido" e que para ampliarmos o conhecimento e verificarmos a validade da espécie seria necessário efetuar coletas sistemáticas em Mato Grosso (localidade-tipo). O presente estudo acrescentou novas informações, a partir de topótipos, ampliando as informações sobre as conchas e apresentando pela primeira vez dados sobre a morfologia interna, que a difere das demais espécies de *Gundlachia*, apresentadas na diagnose. Além disso, os dados moleculares baseados nos genes mitocondriais confirmam a distinção de *G. leucaspis*. Portanto, *G. leucaspis* além das diferenças morfológicas, diverge geneticamente das demais espécies de *Gundlachia*, que sustenta a sua definição e distinção de outros táxons congenéricos.

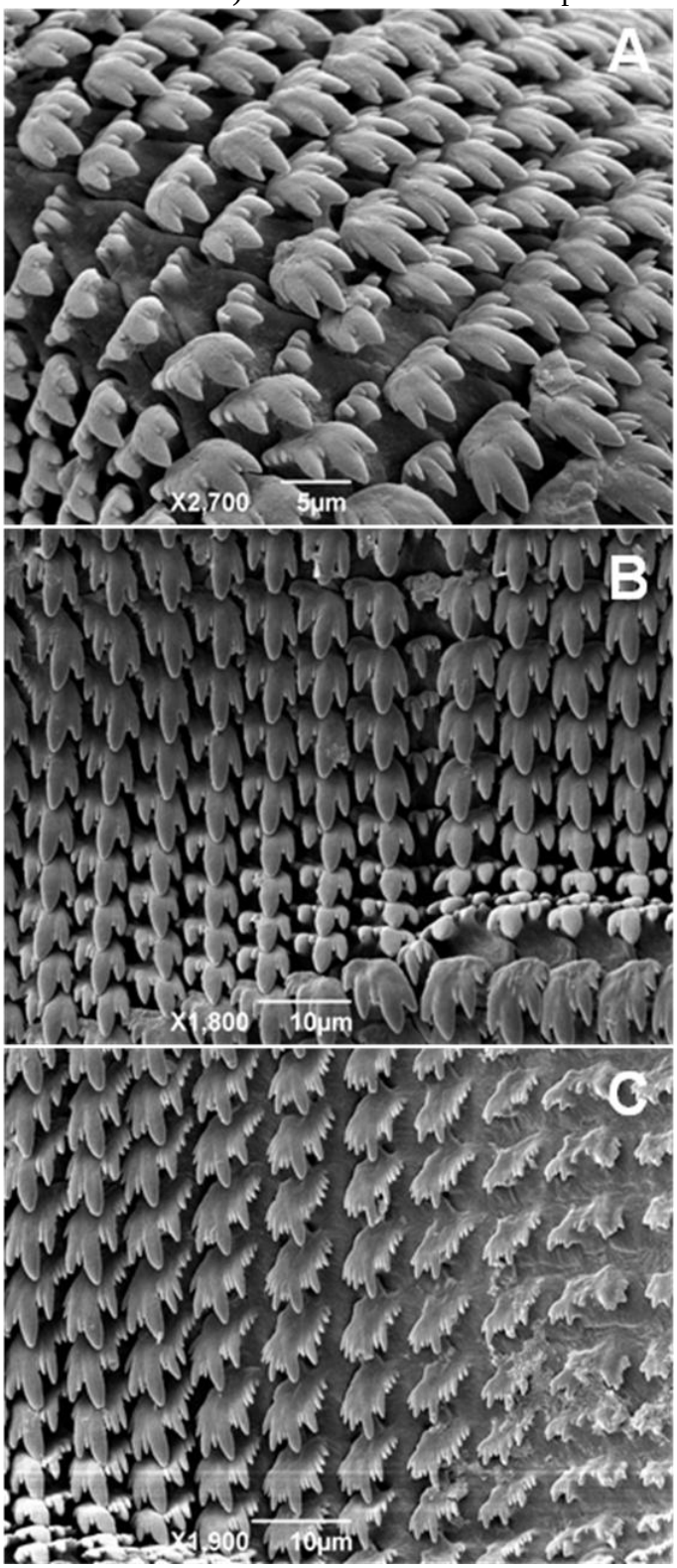
Figura 28 - Morfologia externa das partes moles de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901) coletada na localidade-tipo.



Legenda: **(A)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando as três impressões musculares (MAD e MAE elípticos e o MPE alongado) e o padrão de pigmentação, que está concentrada na região anterior esquerda. **(B)** Vista ventral da parte mole, evidenciando a forma alongada do pé e a extremidade arredondada. **(C)** Detalhe do palpo labial bífido e tentáculos curtos. **(D)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando MAE e o MPE arredondados e pigmentação concentrada na região anterior. **(E)** Vista ventral da parte mole, evidenciando os tentáculos longos. **(F)** Pseudobrânquia, com o lobo dorsal com duas lamelas e o ventral com quatro. (A-C, F) UERJ 10406; (D-E) UERJ 10416. Escala= 1 mm, exceto (**F**)= 0,5 mm.

Fonte: O autor, 2015.

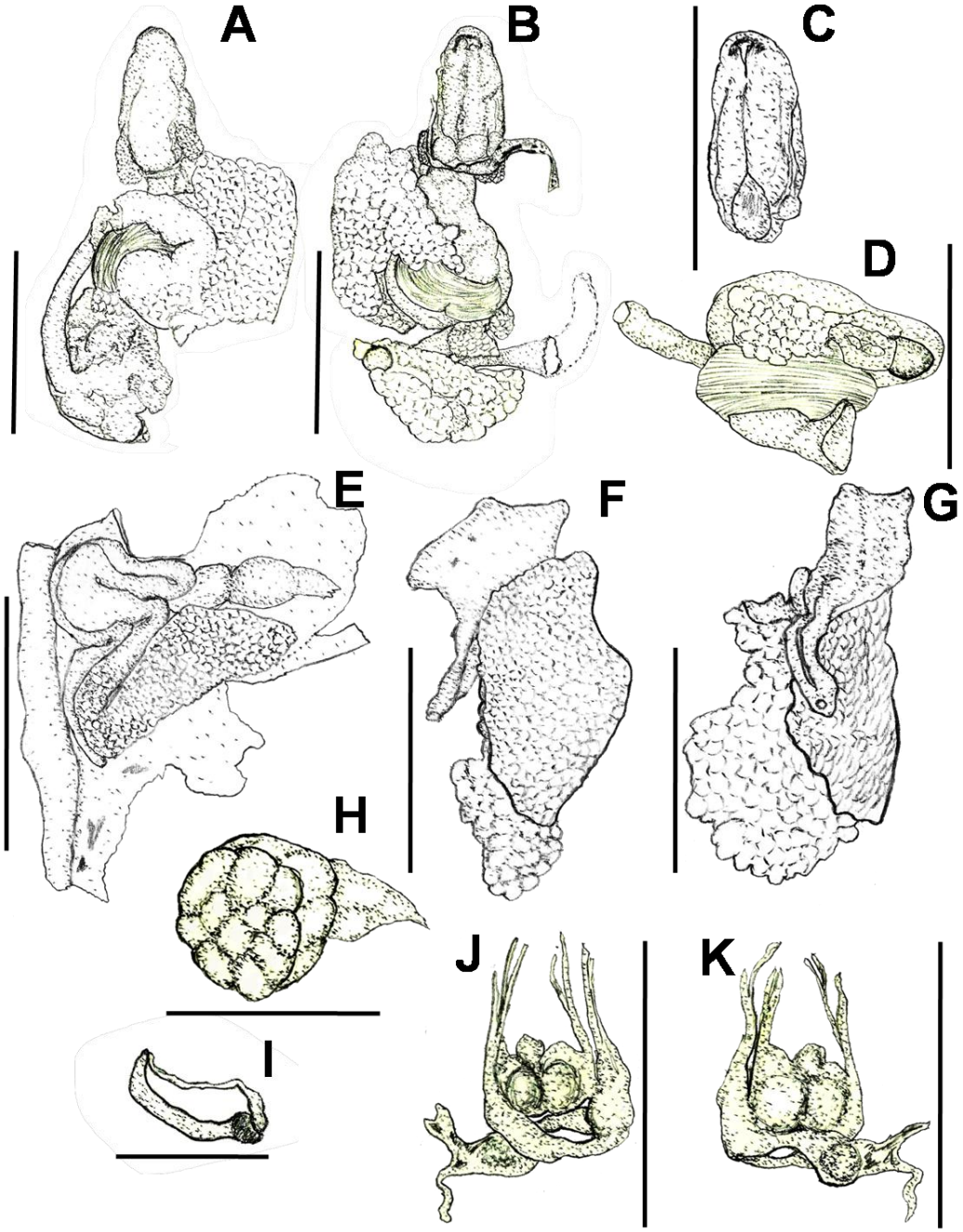
Figura 29 - Morfologia da rádula de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901) coletada na localidade-tipo.



Legenda: **(A)** Vista dorsal da região mediana da rádula, mostrando os dentes centrais e laterais. A cúspide principal esquerda do dente central e mais larga do que a direita (UERJ 10406). **(B)** Dentes laterais com uma ou duas cúspides acessórias entre as três cúspides principais (UERJ 10416). **(C)** Região de transição entre os dentes laterais e marginais com 14 cúspides (UERJ 10416).

Fonte: MEV de Amanda Garcez da Veiga para este trabalho.

Figura 30 - Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia leucaspis* (Ancey, 1901) coletada na localidade-tipo.



Legenda: **(A-D)** Sistema digestório. **(A-B)** Vista dorsal e ventral, respectivamente, evidenciando bulbo bucal, esôfago, estômago, intestino e a glândula digestiva. **(C)** Vista ventral, evidenciando o bulbo bucal alongado e odontóforo curto. **(D)** Vista lateral do estômago, evidenciando a região muscular e pilórica e o ceco curto. **(E)** Vista dorsal do sistema excretor, evidenciando a forma sinuosa e a proporção semelhante do átrio e do ventrículo. **(F-I)** Vista dorsal e lateral-direita do sistema reprodutor, respectivamente. **(F)** evidencia a glândula nidamental elíptica, com a região mediana mais alargada e a região anterior do útero modificada, com três projeções; **(G)** evidencia a vagina e o duto da espermateca de mesmo calibre. **(H)** Ovoteste, com 11 divertículos. **(I)** Complexo peniano, sem flagelo e com o prepúcio fino. **(J-K)** Sistema nervoso, evidenciando os gânglios cerebrais e a comissura cerebral fina **(J)** e comissura pediosa curta **(K)**. Escala= 0,5 mm, exceto (**A-C, E**)= 1,0 mm. UERJ 10406; exceto (J-K) UERJ 10416.

Fonte: O autor, 2015.

4.2.1.3 *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913.

Binômio original: *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913
(Figuras 31-34)

Descrição original: *"In the second or septate stage the shell is oblong, the width contained twice in the length; sides slightly convex. The obtuse, rounded summit is very close to the posterior end and overhangs the right margin. Back and left slope are strongly convex; posterior and right slopes short and steep. There are a few low, wave-like concentric wrinkles near the embryonic shell and some faint radial lines on the anterior part. The sides curve into the deck, except posteriorly where there is an angle or keel at junction of upper surface and deck. The deck or septum is convex and covers about two-thirds of the lower face. The aperture is oval, its margins elevated, blackish, and a little reflexed. Length 2.8, width 1.4, alt. 1 mm".*

Lista sinonímica:

Gudlachia bakeri—Pilsbry, 1913: 670—Ohlweiler e Lanzer, 1993: 129—Lanzer, 1996: 194—Santos, 2003: 208.

Gundlachia obliqua—Hubendick, 1967: 35.

Tipos: Holótipo ANSP 109347a, Lago artificial em um parque, Belém, Estado do Pará. Parátipo ANSP 386784 (Simone 2006, fig. 113). O holótipo depositado na *Academy of Natural Sciences of Philadelphia* (ANSP, EUA) foi primeiro examinado, por R.M. Lanzer e em seguida figurado por Ohlweiler e Lanzer (1993); posteriormente examinado por S.B. Santos em 1998 e figurado em Santos (2003: fig. 40).

Localidade-tipo: Lago artificial em um parque, Belém, Estado do Pará.

Esta espécie foi descrita originalmente por Pilsbry (1913) sob o mesmo binômio. O registro da sua localidade-tipo foi assinalada para um lago artificial entre o mercado público e a catedral. Esse lago fica, provavelmente, dentro do Bosque Rodrigues Alves, fundado em 1883, Belém, Pará, Brasil.

Etimologia: O nome da espécie foi estabelecido em homenagem ao Dr. Fred Baker que coletou os espécimes (Pilsbry, 1913).

Material examinado: Brasil, *Pará*: Belém (Lago da Iara, lago artificial dentro do Bosque Rodrigues Alves) 06 animais (06 conchas e 04 partes moles), 10.VII.2007, (UERJ 7156); 12 animais (12 conchas e 12 partes moles), 15.VII.2007, (UERJ 7161), col. L.E.M. Lacerda e I.C. Miyahira; (Bosque Rodrigues Alves) 15 animais (15 conchas e 15 partes moles), 26.V.2006, (UERJ 7447), col. S.B. Santos e E. Matos; 18 animais (18 conchas e 18 partes moles), 17.III.2013, (UERJ 10408), col. S.B. Santos e C.B. Santos.

Diagnose emendada: forma da abertura da concha arredondada; teleoconcha com linhas espirais; tentáculos longos; pigmentação do teto do manto ausente; cúspides principais do dente raquidiano truncadas; glândula salivar curta; porção proximal do sistema excretor retilínea, porção terminal do sistema excretor paralela; glândula de albúmem tem mais do que o dobro da largura da glândula nidamental.

Descrições da concha de *G. bakeri:* As 49 conchas mensuradas são relativamente pequenas (< 5mm), variando de 1,02 a 3,18 mm de comprimento. A análise descritiva básica e os índices morfométricos de *G. bakeri* encontram-se na Tabela 5.

As dimensões variaram de 1,02 x 0,65 x 0,61 x 0,36 até 3,18 x 2,61 x 2,01 x 1,18 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Seus índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,70; L2/C= 0,57; A/C= 0,35; A/L1= 0,51 e L2/L1= 0,82 (Tabela 5). Segundo os índices morfométricos *Gundlachia bakeri* possui de uma concha alta (A/C= 0,36) e estreita (A/L1= 0,51).

Os exemplares coletados na dentro do Bosque Rodrigues Alves, Belém, Pará (UERJ 7156, 7161, 7447 e 10408) utilizados no estudo morfométrico, não apresentaram diferença estatística significativa, segundo a Análise Discriminante (AD) (Wilks' Lambda = 0,458; df = 45; p = 0,232). Com esta análise multivariada verificamos a baixa variabilidade morfométrica dos lotes desta espécie.

Em vista dorsal, observamos que a forma da abertura da concha é arredondada (Figura 31A), que o ápice é projetado sobre o quadrante posterior direito e desviado para direita, sempre próximo à margem lateral direita da concha (Figura 31B).

A protoconcha é arredondada e com escultura, ela é representada por três regiões, uma com pontuações irregulares profundas que ocupam quase 3/4, variando de 67 a 72%, seguida por uma área lisa, que pode ocupar de 18 a 27% e uma depressão apical curta e profunda, que pode ocupar de 5 a 10% da protoconcha (Figura 31C e D).

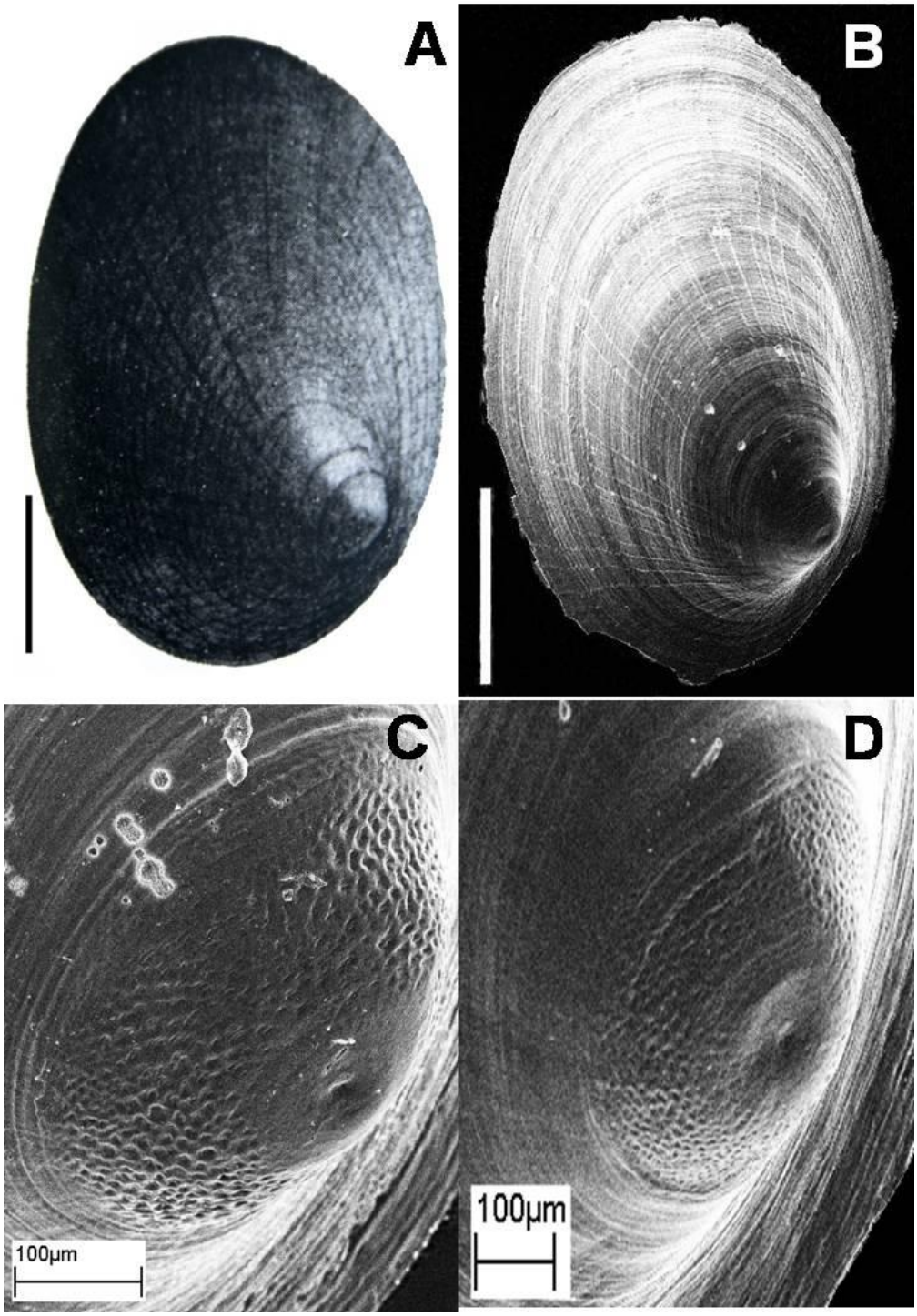
A teleoconcha possui linhas de crescimento concêntricas e linhas radiais dispostas em espiral em toda a teleoconcha (Figura 31C). A coloração do perióstraco variou entre amarelo perolado (*Ivory Yellow*) e caramelo (**Olive Yellow*). O maior lote, UERJ 10418, com 18 conchas, apresentou a coloração da concha amarelo perolado (Figura 32A). Os demais lotes apresentaram a coloração caramelo. Não observamos projeções no perióstraco, como por exemplo, pelos periostracais, em nenhuma das conchas analisadas. Apesar de não apresentar as linhas radiais em espiral, bem evidentes em vista dorsal (Figura 32B), o espécime jovem, utilizado apresenta as mesmas formas gerais da espécie.

Em vista lateral (Figura 32C), destacamos duas regiões da concha: uma dorsal, côncava e com ondulações relacionadas às linhas de crescimento, bem evidentes; e outra convexa, que pode ser observada na região posterior.

As linhas radiais dispostas em espiral na teleoconcha, a protoconcha com pontuações profundas e sua depressão apical curta e rasa são caracteres da concha exclusivos de *G. bakeri*, pois não foram observados em nenhuma outra espécie de *Gundlachia*, até o momento.

Apesar da descrição original de Pilsbry (1913) citar e utilizar formas gundlaquioides na sua descrição, não encontrei nenhuma concha com esta morfologia, no material estudado da localidade-tipo. As comparações conquiliométricas interespecíficas serão apresentadas mais adiante.

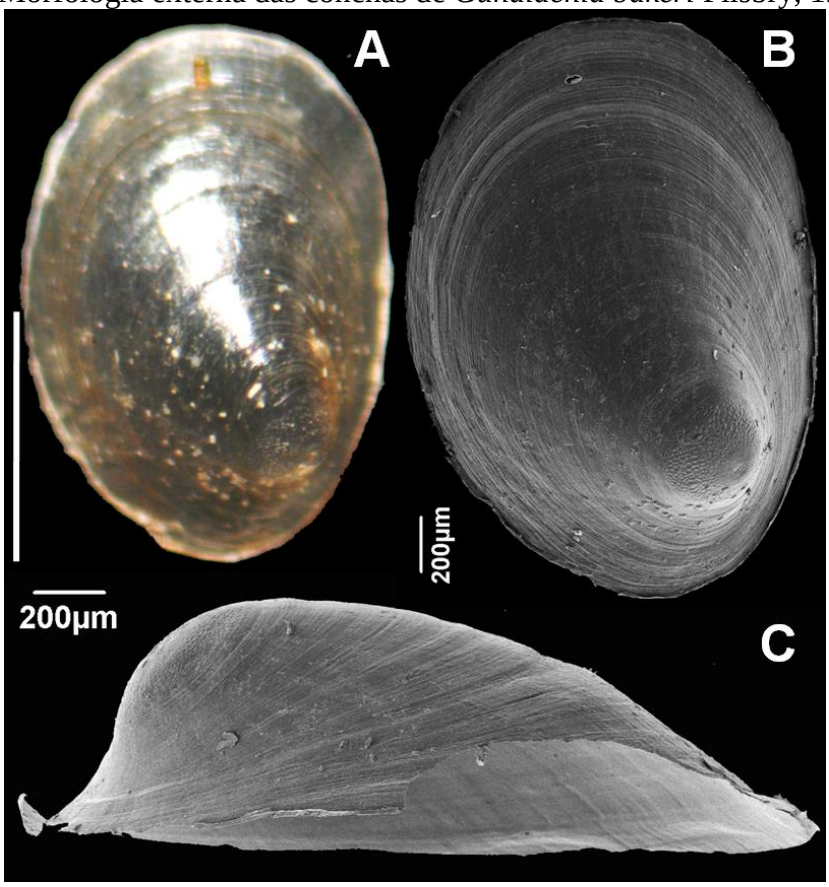
Figura 31- Morfologia externa das conchas de *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913 encontradas na localidade-tipo.



Legenda: (**A)** *Gundlachia bakeri* – Figura da descrição original de Pilsbry (1913: fig.5). Apresenta seu ápice recurvado e linhas radiais na forma de espiral; (**B)** MEV de um espécime coletado na localidade-tipo (Belém, PA) UERJ 7161; (**C**) detalhe da microescultura apical da concha com uma faixa de pontuações irregulares após a área lisa e com a depressão apical rasa e curta (UERJ 7156); (**D)** detalhe da mesma região da concha (UERJ 7161). Escala em A e B= 1 mm.

Fonte: Fotos (B-D) de Alan Moraes para este trabalho, editadas por L.E.M. Lacerda.

Figura 32 - Morfologia externa das conchas de *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913.



Legenda: *Gundlachia bakeri* (UERJ 10408) – (**A)** concha em vista dorsal, representanto a coloração do perióstraco amarelo perolado (*Ivory Yellow*), segundo Ridgway (2005). (**B)** MEV de um espécime coletado na localidade-tipo, sem as linhas radiais evidentes, exemplar jovem. (**C**) MEV em vista lateral, evidenciando a forma da concha e o ápice arredondado. Escala em A= 1 mm.
Fonte: Foto de L.E.M. Lacerda (A), e MEV de Alan Moraes (B-C) para este trabalho.

Morfologia externa: Os tentáculos são longos e possuem a base mais larga com olhos escuros localizados na base, característica compartilhada com os demais basomatóforos. O palpo oral é bífido (Figura 33).

Gundlachia bakeri possui três impressões musculares, sendo a anterior direita e esquerda elípticas e a posterior alongada transversalmente ao eixo longitudinal do corpo, aproximadamente o dobro do comprimento dos músculos anteriores (Figura 33A). Observamos variação entre as impressões musculares, enquanto o lote UERJ 7156, tem a impressão muscular posterior alongada, os espécimes dos lotes UERJ 7447 e 7161 apresentaram uma forma elíptica.

A maioria dos espécimes estudados não apresentou pigmentação no teto do manto (Figura 33A), somente os espécimes do lote UERJ 7161 apresentaram algumas manchas de pigmentação na região anterior do teto do manto.

Lanzer (1996), ao estudar cinco espécimes de *G. bakeri* da coleção do INPA (coletados em 18.VIII.1987) da Amazônia, provenientes do Igarapé dos Peruanos, ilustrou as três impressões musculares arredondadas, diferentes da observada nos espécimes da localidade-tipo, contudo a descrição da pigmentação do manto e a do ápice foi semelhante.

Em vista ventral, observamos que a forma do pé é alongada e a extremidade posterior do pé é arredondada (Figura 33B).

A pseudobrânquia possui dois lobos, um lobo dorsal que tem aproximadamente a metade da largura do lobo ventral e tem três lamelas, enquanto o ventral tem quatro lamelas (Figura 33E).

Morfologia interna: Em relação à morfologia interna observamos a rádula (Figura 33), o restante do sistema digestório (Figura 33C e D), o sistema excretor (Figura 32F), o sistema reprodutor (Figura 33G-I) e o sistema nervoso (Figura 33J-L).

Gundlachia bakeri apresenta a fórmula radular 14-1-14 (Figura 34A) e as cúspides principais do dente raquidiano assimétricas, curtas e truncadas (Figura 34B). O dente raquidiano tem seis cúspides no total, a placa basal tem forma trapezoidal e curta. O dente lateral apresenta as cúspides principais com largura e comprimentos distintos; o mesocone é mais largo do que os demais e tem de duas a três cúspides acessórias entre o endocone e o ectocone (Figura 34). O dente marginal é multicuspidado, apresentando em torno de 11 cúspides.

O **sistema digestório** apresentou o bulbo bucal com forma arredondada; a glândula salivar curta e com o diâmetro regular; o saco radular curto, pois não ultrapassa o bulbo bucal (Figura 33K); a porção mais larga do esôfago é a metade da largura do bulbo; o estômago é diferenciado, semelhante aos demais Ancylinae, e formado por duas porções: uma região muscular e uma região pilórica que possuem proporções iguais no estômago (Figura 33C e D); o ceco é curto, pois não ultrapassa a metade da largura da região muscular do estômago.

O **sistema excretor** está localizado próximo a borda do manto, apresenta uma forma geral sinuosa, em relação à borda do manto e com o formato de um triângulo equilátero. A porção proximal desse sistema é glandular, não evidente, com forma retilínea, pois após a primeira mudança de sentido, para a região anterior do corpo do animal, não há sinuosidade (Figura 33F). A ligação entre a região pericárdica, onde se localiza o coração (átrio e ventrículo), e o rim é feita pelo duto renopericárdico, que em *G. bakeri* é muito curto e difícil de ser visualizado no momento da dissecção. O

ventrículo, com forma arredondada, é completamente justaposto ao rim e suas dimensões são semelhantes ao do átrio que tem a forma triangular (Figura 33F). A porção terminal do sistema excretor é paralela, pois se encontra no mesmo sentido da borda do manto e não ultrapassa a porção glandular, o restante das estruturas possui a mesma topologia.

O **sistema reprodutor** possui a forma geral do ovoteste semi-esférica e com ácinos arredondados e de diâmetros semelhantes (Figura 33G). O número de divertículos no ovoteste variou de 10 a 20. A vesícula seminal fica na porção proximal do ovispermoduto e é formada por quatro divertículos. A glândula de albúmen, que tem uma textura heterogênea, é duas vezes mais larga do que a glândula nidamental, que tem a forma elíptica, tendo a região anterior mais estreita do que a posterior; a superfície dessa estrutura tem uma textura homogênea (Figura 33G). A espermateca foi observada, e tem forma elíptica. O útero está presente e apresenta-se arredondado na região anterior; o apêndice terminal do útero não foi observado nas dissecções, podendo estar ausente nesta espécie. Não observamos a proporção da espessura da vagina em relação a espermateca e nem a próstata, nesta espécie. O flagelo não foi observado, podendo estar ausente nesta espécie. O prepúcio é fino, pois sua largura é em torno de 1/3 do seu comprimento. (Figura 33I).

O **sistema nervoso** apresentou, em vista dorsal, a comissura cerebral visível e espessa, pois a sua largura foi maior do que a metade da largura do gânglio cerebral (Figura 33J). A forma da porção intermediária do protocérebro é convexa e os nervos, que possivelmente são, tentacular, peritentacular externo e óptico, são próximos e partem da região anterior do gânglio cerebral, que é chamada de protocérebro (Figura 33J). Em vista ventral (Figura 33K), os gânglios pediosos, são menores do que os gânglios cerebrais e estão unidos por uma comissura pediosa longa, pois os gânglios pediosos são unidos por uma comissura visível. Em vista lateral direita, foi possível observar os gânglios pediosos e cerebrais que formam o anel periesofagiano (Figura 33L).

Distribuição geográfica: Há registros de ocorrência da espécie somente para a região Amazônica. Belém, Pará (Baker 1913; Santos 2003), "localidade-tipo"; Thomé-assú, 120 km ao sul de Belém; (Haas 1949); Rio Paracuní, Rio Tarumã Mirím, afluentes do Rio Negro (Haas 1949b; Irmler 1975), Lago Tostão, entre Alenque e Óbidos, Pará (Haas 1949a,b; Lanzer 1996); rio Tapajós, Fordlândia, Pará (Haas 1949a, b; Lanzer

1996); arroios na Floresta Amazônica, com ph 4,5 (Fitkau 1981); Igarapé dos Peruanos (Lanzer 1996).

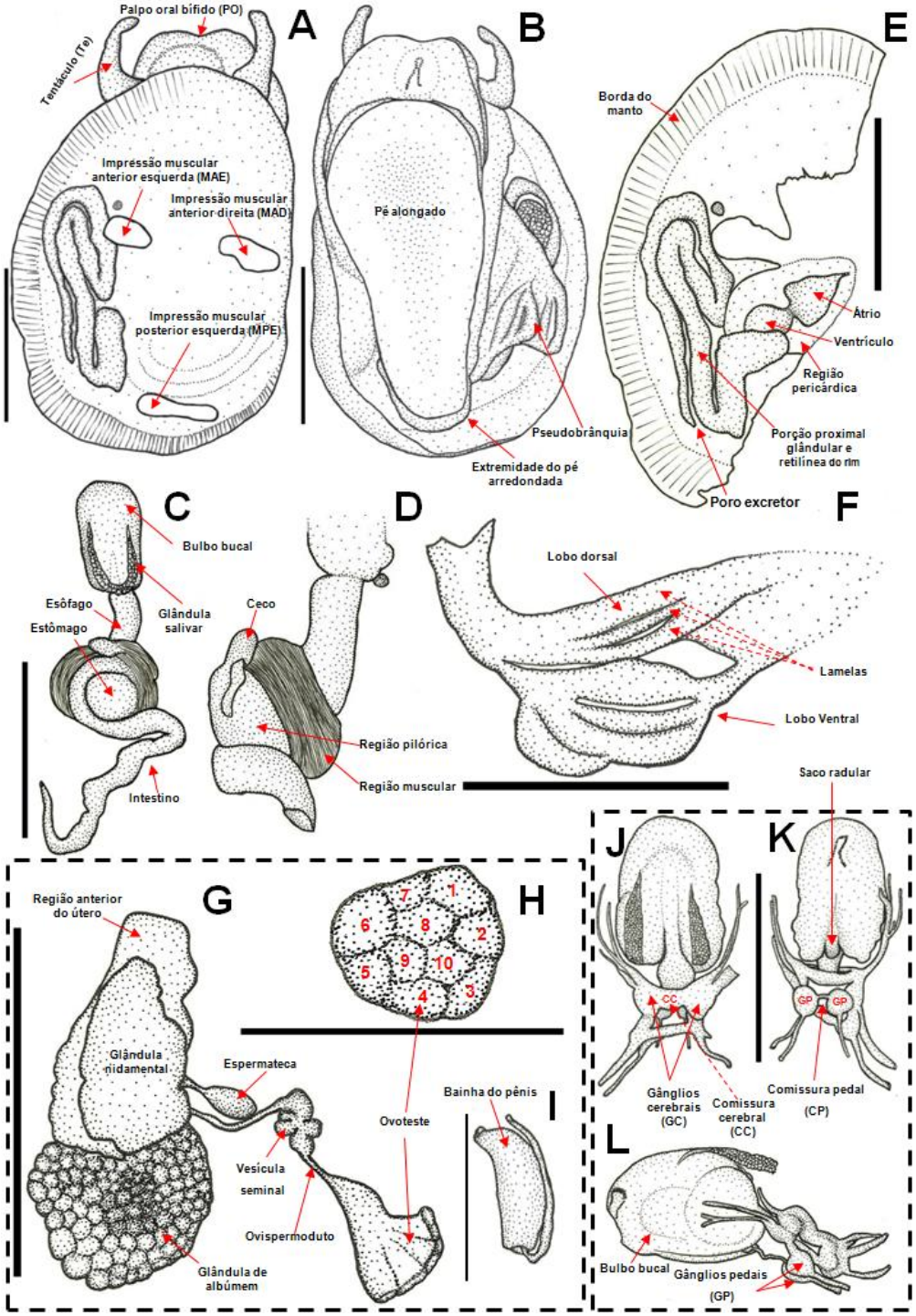
Lanzer (1996) registrou a espécie em várias localidades na região Amazônica: cujas citações não foram plotadas no mapa fornecido pela autora. Coletas mais recentes (realizadas em 2007, 2011 e 2013), na localidade-tipo confirmaram a presença da espécie. Os esforços amostrais em outras localidades nas cercanias de Belém não foram bem sucedidas para esta espécie, obtendo-se apenas *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828) e *Laevapex* sp.

Comentários: A espéciefoi descrita com base na morfologia da concha septadas (Pilsbry 1913, figs.1-3) e não septadas (Figura 31A). Em ambas formas se meciona linhas radiais na teleoconcha. O autor ainda forneceu informações sobre o ápice arredondado e projetado sobre a região posterior direita, quase alcançando a borda, conforme observamos nos espécies examinados nesse atual estudo.

Hubendick (1967: figs. 193, 194) ilustrou uma concha, identificada como (*Cotype*), que está depositada no *Naturhistoriska Riksmuseum, Stockholm* (NRS), com as seguintes dimensões morfométricas: 3,00 mm de comprimento, 2,30 mm de largura anterior, 1,70 mm de largura posterior e 0,90 mm de altura. Segundo a ilustração do autor a concha tem a forma elíptica e o ápice próximo da borda posterior direita. Apesar de destacar linhas de crescimento na teleoconcha, o autor não ressaltou linhas radiais em espiral, que é uma autapomorfia desta espécie. A forma da concha é bastante semelhante as conchas analisadas. A protoconcha é arredondada, contudo informações adicionais não poderam ser inferidas a partir dessa ilustração.

Gundlachia bakeri foi revalidada por Ohlweiler e Lanzer (1993), após examinar o holótipo (ANSP 109347a); ressaltaram que o equívoco de Hubendick (1967) por ter colocado *G. bakeri* como sinônimo de *G. obliquus* (= *A. obliquus*), pode ter sido pela presença de linhas radiais na teleoconcha. As linhas em *G. bakeri* são mais tênues e em leve espiral (Figura 31) e em *A. obliquus* fortes e retilíneas (Ohlweiler e Lanzer 1993: figs. 2,8,12). Lanzer (1996) acrescentou informações sobre a morfologia externa (impressões musculares e pigmentação do manto). O presente estudo fornece, pela primeira vez, dados sobre a morfologia interna para essa espécie, além da variação morfométrica e dados sobre a biologia molecular, que será discutido de forma comparativa mais adiante.

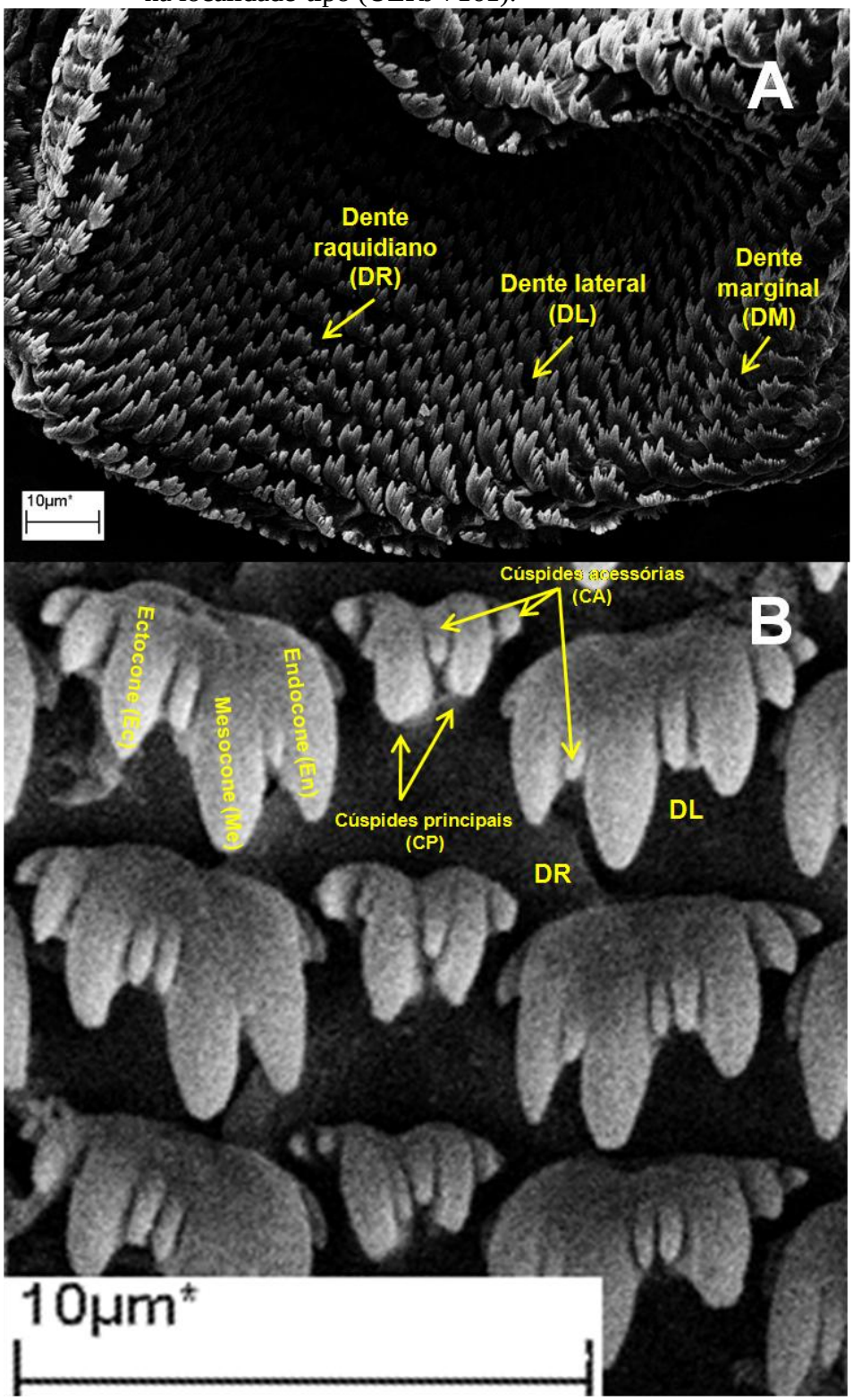
Figura 33 - Morfologia externa e interna (sistema excretor, digestório, reprodutivo e nervoso) das partes moles de *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913 coletada na localidade-tipo (UERJ 7156).



Legenda: **(A-B)** Vista dorsal e ventral da parte mole, respectivamente. **(C)** Sistema excretor. **(D)** Vista dorsal do sistema digestório, sem a glândula digestiva. **(E)** Vista lateral do estômago. **(F)** Pseudobrânquia, com o lobo dorsal com três lamelas e o ventral com quatro. **(G)** Vista dorsal do sistema reprodutor. **(H)** Ovoteste, com dez divertículos. **(I)** Complexo peniano, com o prepúcio largo. **(J-L)** Sistema nervoso com bulbo bucal, em vistas, dorsal, ventral e lateral, respectivamente. Escala= 1 mm, exceto (**H**)= 0,5 mm.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 34 - Morfologia da rádula de *Gundlachia bakeri* Pilsbry, 1913 coletada na localidade-tipo (UERJ 7161).



Legenda: **(A)** Vista dorsal da região anterior da rádula, mostrando os dentes centrais, laterais e marginais. Aumento de 1000x. **(B)** Detalhe dos dentes centrais (assimétricos e com uma ou duas cúspides acessórias entre as duas cúspides principais) e os dentes laterais, assimétricos e com uma ou duas cúspides acessórias entre o endocone e o ectocone.

Fonte: Foto de Alan Moraes para este trabalho, editada por L.E.M. Lacerda.

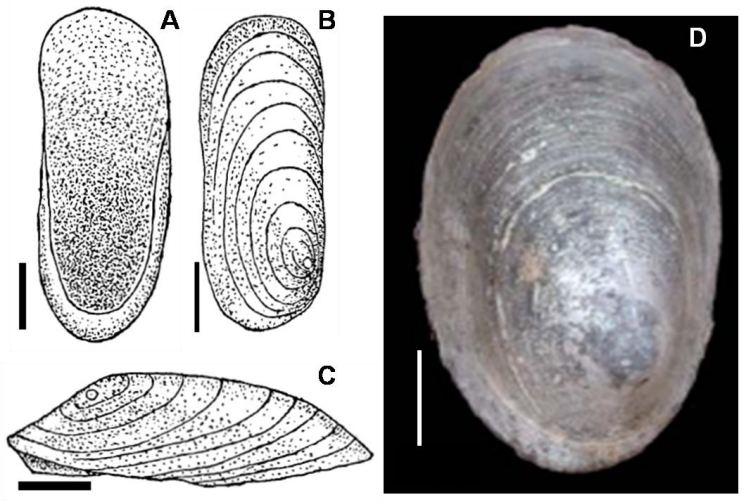
4.2.1.4 *Gundlachia lutzi* Walker, 1925

Binômio original: *Gundlachia lutzi* Walker, 1925

(Figuras 35-40)

Descrição original: "*Shell light horn color, long and narrow, the lateral margins nearly parallel, slightly expanding anteriorly, the left being straight and the right slightly incurved in the middle; the anterior and posterior margins regularly rounded; the apex is depressed, not projecting above the anterior slope; bluntly rounded, excentric and situated at about the posterior fourth and half way between the median line and the right margin, eroded, so that the apical sculpture is not visible; lines of growth strong and regular; anterior slope regularly, but not strongly curved, from the apex to the anterior margin; posterior slope from the base of the apex to the line of the septumis short, straight and oblique; the dorsum roundly arched, the right lateral slope being nearly perpendicular and the left very convex; the septum, apparently immature, is very short, barely half a millemeter in width, and rapidly narrows until it joins the lateral margins at about the anterior third, the edge is sharp, not at all thickened, and the margin is very concave"* (Walker 1925).

Figura 35 - *Gundlachia lutzi* Walker, 1925, ilustração original da concha e do tipo.



Legenda: (A) Vista ventral, observa-se que a concha está no processo inicial de formação de septo. (B) Vista dorsal, (C) Vista lateral e (D) Vista dorsal do tipo depositado no USNM (Washington) 102025. Escala = 1 mm.

Fonte: (A-C) Walker, 1925: figs. 7, 8, 9 ; Simone, 2006.

Tipos: holótipo USNM 102025 (Washington) (Simone 2006: 113) (Figura 35).

A descrição original de Walker (1925) baseou-se em uma concha semi-septada, com a abertura da concha alongada e estreita (Figura 35A), ápice projetado no quadrante posterior direito e localizado próximo da margem, embora Walker tenha relatado que se localiza entre a linha mediana da concha e a margem direita; a coloração da concha é marfim (*Olive-Buff*). Segundo o autor junto com *G. lutzi* foram encontradas formas não septadas (Walker 1925: figs 9-11), que apresentam a abertura da concha elíptica e com as margens curvas, diferindo da concha septada que tem a forma da abertura alongada e margens paralelas entre si. Além disso, o ápice foi descrito como obtuso, mas é arredondado, projetado próximo à margem direita da concha, conforme observado na figura (Figura 35D) e com com pontuações, que não foram observadas na concha septada por estar erodida (Walker 1925; Lanzer 1996; Santos 2003) e só descrita pois não dá para ser observada na ilustração original (Walker 1925: fig. 11) e nem no tipo fotografado (Figura 35D). As dimensões das duas conchas mensuradas pelo próprio autor foram 5,00 x 2,00 x 1,45 x 1,00 a septada, e 4,50 x 2,75 x 2,25 x 1,00 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente; exceto as larguras posteriores que foram extrapoladas das demais.

É importante ressaltar que o autor descreveu a única concha com a forma septada dentre várias outras com a forma da concha sem septo. Essa concha de *G. lutzi* foi comparada com as conchas de *Gundlachia nordenskioldi* Pilsbry (1903) (= *Hebetancylus nordenskioldi*), no mesmo estágio de desenvolvimento e apresentou-se mais estreita, com o ápice mais deprimido e as margens distintas. Já a concha não septada foi comparada com um típico *moricandi* (hoje alocada no gênero *Hebetancylus*) do Rio Grande do Sul, segundo o autor, que diferiu por apresentar o comprimento da concha com muito menor, a abertura mais "oval" (=elíptica) e o ápice mais descentralizado e "proeminente" (=projetado e desviado). Essas últimas características associada ao ápice com pontuações devem ter induzido o autor a alocar a espécie em *Gundlachia* corretamente. Contudo, a microescultura apical e a anatomia interna ainda não era conhecida para essa espécie, até o presente estudo.

Localidade-tipo: Lassance, Minas Gerais, Brasil.

Etimologia: Em homenagem ao Dr. Adolpho Lutz, que coletou e enviou o material para ser identificado. O próprio Walker relatou que teve um enorme prazer em

prestar essa homenagem ao Dr. Lutz por sua importante contribuição a fauna de ancilídeos do Brasil.

Lista sinonímica:

Gundlachia lutzi Walker, 1925: 5—Lanzer, 1996: 194—Santos, 2003: 208.
Gundlachia ticaga—Marcus e Marcus, 1962: 220.
Hebetancylus moricandi: Hubendick, 1967: 34.

Material examinado: Brasil, *Minas Gerais*: Lassance (foz do córrego Ribeirão) 11 animais (08 conchas e 11 partes moles), 14.XII.2007, (UERJ 7279); (Rio das Velhas) 06 animais (06 conchas e 06 partes moles), 12.XII.2007, (UERJ 7273); (Rio São Gonçalo) 06 animais (06 conchas e 04 partes moles), 12.XII.2007, (UERJ 7262) col. L.E.M. Lacerda; I.C. Miyahira e S.B. Santos. (Rio São Gonçalo) 81 animais (81 conchas e 81 partes moles), 21.XII.2013, (UERJ 10418) col. L.E.M. Lacerda; I.C.B. Gonçalves e R.F. Ximenes. *Espírito Santo*: Sooretama (Reserva Biológica de Sooretama, córrego Quirininho) 02 animais (01 concha e 02 partes moles), 30.X.2011, (UERJ 7448) col. F. Noel.

Diagnose emendada: Concha com o ápice recurvado localizado próximo à margem direita da concha, impressão muscular anterior direita alongada; sem divertículos na vesícula seminal; vagina com o dobro da espessura da espermateca; próstata sem folículos evidentes e flagelo ausente.

Complemento da descrição e amplitude de variação da concha de *G. lutzi:* As 48 conchas mensuradas são relativamente pequenas (< 5mm), variando de 1,68 a 5,09 mm de comprimento. A análise descritiva básica e os índices morfométricos de *G. lutzi* encontram-se na Tabela 5.

As dimensões variaram de 1,68 x 1,22 x 0,96 x 0,58 até 5,09 x 3,84 x 3,14 x 3,01 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Seus índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,70; L2/C= 0,58; A/C= 0,38; A/L1= 0,54 e L2/L1= 0,83 (Tabela 5). Segundo os índices morfométricos *G. lutzi* possui de uma concha baixa (A/C= 0,38) e estreita (A/L1= 0,54).

Os exemplares coletados do Córrego São Gonçalo das Tabocas (UERJ 7262, 10418), do rio das Velhas (UERJ 7273, 7279) e do córrego Quiririnho (UERJ 7448)

utilizados no estudo morfométrico, apresentaram diferença estatística significativa, segundo a Análise Discriminante (AD) (Wilks' Lambda = 0,47; df = 45; p = 0,005). Com esta análise multivariada verificamos que apesar da diferença estatística significativa, a forma geral da concha dos lotes analisados desta espécie são bastante semelhantes, conforme veremos a seguir.

Em vista dorsal, observamos que a forma da abertura da concha é elíptica (Figura 35AB e 36), que o ápice é projetado sobre o quadrante posterior direito e desviado para direita, próximo à margem direita da concha (Figura 35A).

A protoconcha é arredondada, com uma depressão apical curta e profunda (Figura 35C), que ocupa os primeiros 5% da protoconcha, seguida por uma área lisa, que ocupa 15% da protoconcha e, uma área com pontuações irregulares profundas que ocupam quase 80% da protoconcha. Apesar da maioria dos lotes apresentarem uma depressão apical curta, o lote 7262 tem uma depressão apical ampla (Figura 36).

A teleoconcha possui linhas de crescimento concêntricas em toda a sua superfície (Figura 35 e 36). A coloração da concha variou de amarelo claro (*Marguerite Yellow*), na maioria dos lotes estudados, como observado em 2/3 das 90 conchas do lote UERJ 10418, até marfim (*Olive-Buff*).

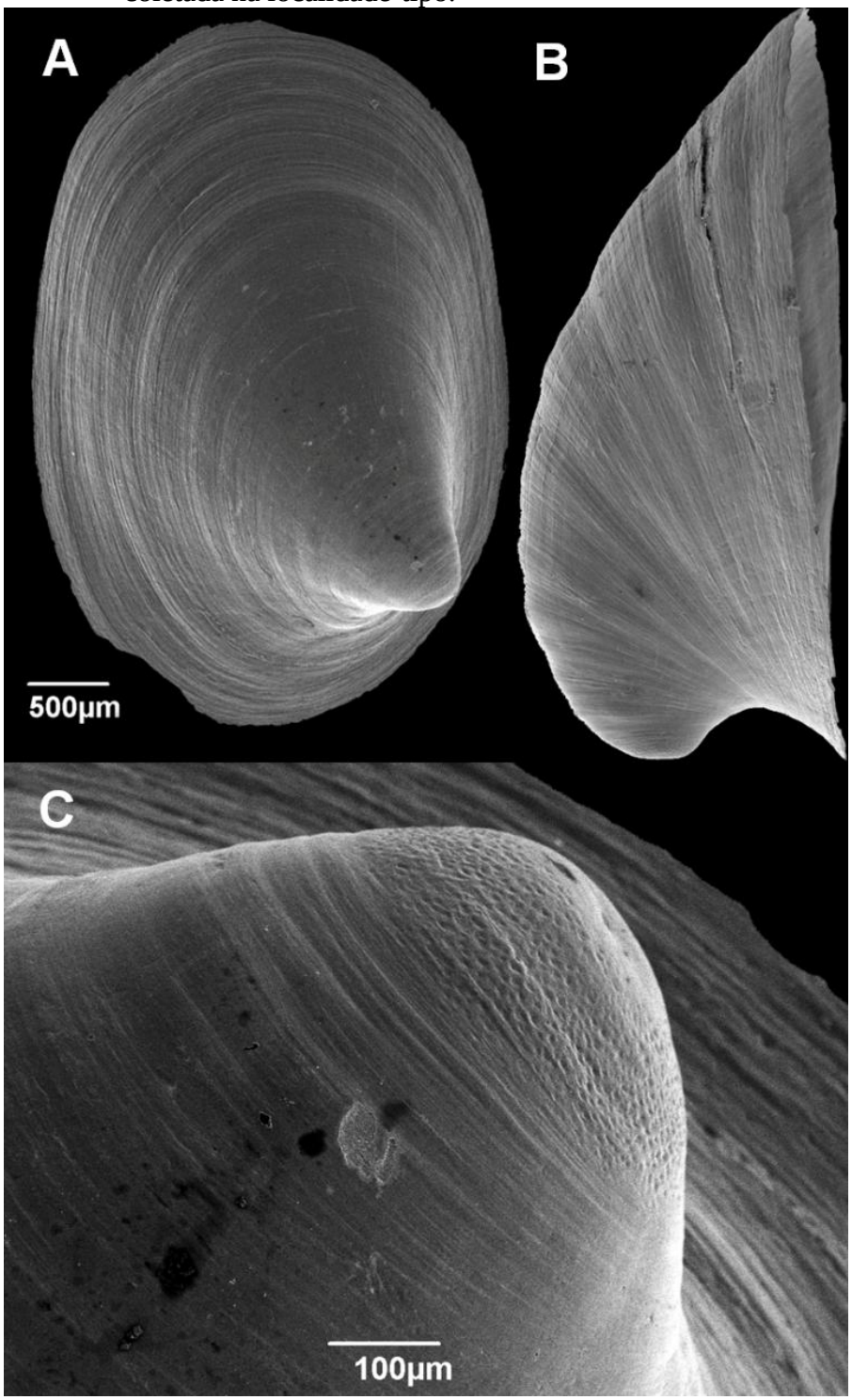
Em vista lateral (Figura 35C), destacamos a região anterior, convexa e com ondulações relacionadas às linhas de crescimento, bem evidentes; e outra posterior, côncavo. Comparativamente, o ápice de *G. lutzi* se projeta mais para trás do que o de *G. leucaspis* (Figura 27C) e de *G. bakeri* (Figura 32C) sobre à margem posterior.

Apesar das conchas ilustradas por Walker (1925) apresentarem diferentes estágios de formação de septo, nossas coletas realizadas em distintos anos, na localidade tipo, não revelaram nenhuma concha septada.

O ápice bem recurvado, a protoconcha com pontuações profundas que ocupam em torno de 80% da protoconcha e sua depressão apical curta e profunda são os caracteres da concha que podem auxiliar na identificação de *G. lutzi*, apesar de não serem exclusivos, pois alguns caracteres como, por exemplo, o ápice bastante recurvado é compartilhado com *Gundlachia* n. sp. 2 e *G. leucaspis*.

As comparações conquiliométricas interespecíficas serão apresentadas na seção de morfometria.

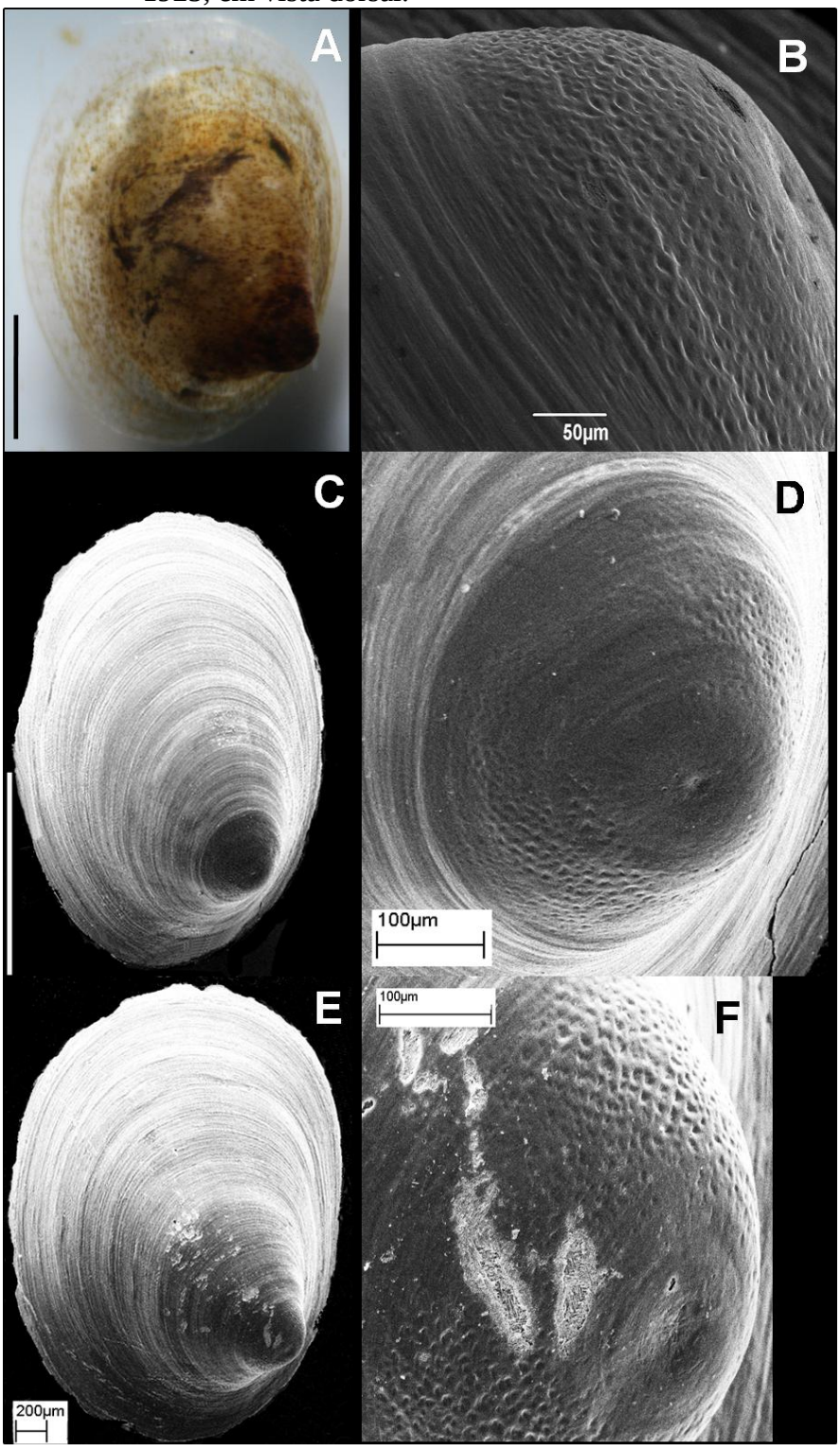
Figura 36- Morfologia externa da concha de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925, coletada na localidade-tipo.



Legenda: **(A-C)** Espécime do rio São Gonçalo, Lassance, MG (UERJ 10418), lote utilizado na biologia molecular. **(A)** Vista dorsal, abertura da concha elíptica e ápice projetado próximo à margem direita da concha. **(B)** Vista lateral, ápice arredondado e **(C)** Vista dorsal, detalhe da microescultura apical, com faixa de pontuações irregulares (que ocupam quase 80% da protoconcha), seguida pela área lisa (15%) e depressão apical rasa e curta (5%). Escala = (B) 500 µm.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 37 - Morfologia externa da concha de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925, em vista dorsal.



Legenda: **(A e B)** Espécimes do rio São Gonçalo, Lassance, MG (UERJ 10418); **(A)** coloração amarelo-claro (*Marguerite Yellow*) do perióstraco; **(B)** ápice com pontuações irregulares. **(C e D)** Espécime do rio das Velhas, Lassance, MG (UERJ 7273). **(E e F)** Espécime do rio São Gonçalo, Lassance, MG (UERJ 7262). **(A, C e E)** Abertura da concha elíptica e ápice projetado próximo à margem direita da concha. **(B, D e F)** Detalhe da microescultura apical, com faixa de pontuações irregulares (que ocupam quase 80% da protoconcha), seguida pela área lisa (15%) e depressão apical rasa e curta (5%), exceto **(F)** larga. Escala = **(A, C)** 1mm.

Fonte: O autor, 2015.

Morfologia externa: os tentáculos são curtos na maioria dos lotes estudados (Figura 38). O palpo oral é bífido (Figura 38A-C).

Gundlachia lutzi possui três impressões musculares, sendo as três alongadas (Figura 39A). A MAD apresenta um estreitamento na região interna. A MAD e a MAE possuem a largura duas vezes maior do que o comprimento, enquanto que o MP tem o comprimento três vezes maior. Observamos uma variação na forma das impressões musculares nos exemplares do lote UERJ 10418, o qual apresentou espécimes com a MAE com a forma elíptica (Figura 39D). A área adesiva é bem evidente entre as duas impressões musculares anteriores (Figura 39A e D).

A maioria dos espécimes estudados apresentou a pigmentação no teto do manto concentrada na região anterior, e uma pequena mancha na região posterior (Figura 39A), porém alguns espécimes apresentaram um padrão forte de pigmentação (Figura 39D).

Em vista ventral, observamos que a forma do pé é alongada e a extremidade posterior do pé é afilada (Figura 39B).

A pseudobrânquia possui dois lobos, um lobo dorsal que tem a metade da largura do lobo ventral, com duas lamelas, enquanto o lobo ventral tem três lamelas (Figura 39E).

Morfologia interna: em relação à morfologia interna observamos a rádula (Figura 40), o restante do sistema digestório (Figura 40A-C), o sistema excretor (Figura 40D), o sistema reprodutor (Figura 40E-H) e o sistema nervoso (Figura 40I-J).

Gundlachia lutzi apresenta as cúspides principais do dente raquidiano assimétricas, curtas e truncadas. O dente raquidiano tem seis a sete cúspides no total, a placa basal tem forma trapezoidal e curta (Figura 39A); a cúspide principal esquerda possui o dobro da espessura e do comprimento da direita, com duas cúspides acessórias do seu lado e mais duas ou três cúspides do lado da "principal" direita. A primeira cúspide acessória alcança o mesmo comprimento da cúspide principal direita (Figura 39A). O dente lateral apresenta as cúspides principais com largura e comprimentos distintos; o mesocone é mais largo e longo do que os demais e tem só uma cúspide acessória entre o endocone e o ectocone (Figura 39B), enquanto que o número de cúspides acessórias externas ao ectocone pode variar de duas, nos dentes mais próximos do central a três nos mais afastados (Figura 39B). O dente marginal é multicuspidado, com 12 a 13 cúspides (Figura 39C). A fórmula radular da espécie é 14-1-14.

O **sistema digestório** (Figura 40A-C) apresentou o bulbo bucal com forma alongada; a glândula salivar longa e com o diâmetro constante (Figura 40A e B); o saco radular longo, podendo alcançar até a metade do comprimento do bulbo bucal (Figura 40B); o estômago é diferenciado, semelhante aos demais Ancylinae, e formado por duas porções: uma região muscular e uma região pilórica que possuem proporções iguais no estômago (Figura 40C); o ceco é curto, pois não alcança nem 1/4 da largura da região muscular do estômago (Figura 40B).

O **sistema excretor** está localizado próximo à borda do manto e apresenta uma forma geral sinuosa, em relação à borda do manto. A junção imaginária das extremidades dessa estrutura forma a figura de um triângulo isósceles. A porção proximal desse sistema é glandular, e bem evidente, com forma sinuosa, uma vez que após a primeira mudança de sentido, para a região anterior do corpo do animal, há sinuosidade (Figura 40D), que define tal caráter. O ventrículo, com forma triangular, é completamente justaposto ao rim e suas dimensões são semelhantes à do átrio que tem a forma arredondada (Figura 40D). A porção terminal do sistema excretor não é paralela a borda do manto e ultrapassa a porção glandular O poro excretor localiza-se na extremidade da porção terminal, o restante das estruturas possui a mesma topologia.

O **sistema reprodutor** possui a forma geral do ovoteste semi-esférica, com ácinos arredondados e de diâmetros semelhantes (Figura 40E). O número de divertículos no ovoteste variou de 13 a 20 (Figura 40F). A largura da vesícula seminal alcança o dobro da largura do ovispermoduto e está localizada próximo ao ovoteste, mas não apresenta divertículos (Figura 40G). A glândula de albúmen apresenta textura heterogênea, com largura semelhante a da glândula nidamental; esta tem a forma elíptica, tendo a região mediana quase da mesma largura do que as extremidades, com textura homogênea na superfície (Figura 40E) e aspecto glandular. O útero apresenta-se arredondado na região anterior (Figura 40F); o apêndice terminal do útero não foi observado nas dissecções, podendo estar ausente nesta espécie. A espermateca tem forma elíptica e o seu duto tem a metade da espessura da vagina (Figura 40G). A próstata não possui folículos evidentes. O flagelo não foi observado, portanto ausente nesta espécie. O prepúcio é grosso, pois sua largura é em torno da metade do seu comprimento (Figura 40H).

O **sistema nervoso** apresentou, em vista dorsal, a comissura cerebral visível e fina, pois a sua largura é entorno de 1/5 a largura do gânglio cerebral. A forma da porção intermediária do protocérebro é convexa e os nervos são tentacular,

peritentacular externo e óptico são próximos e partem da região anterior do gânglio cerebral (Figura 40I). Em vista ventral, os gânglios pediosos, são da mesma largura do que os gânglios cerebrais e estão unidos por uma comissura pediosa curta, pois os gânglios pediosos são tão próximos que não se observa a comissura (Figura 40J).

Distribuição geográfica: há registro de ocorrência da espécie somente para a localidade tipo no município de Lassance, (MG). Com o registro de ocorrência para a Rebio Sooretama (ES) ampliamos a distribuição da espécie. A espécie foi coletada nesta localidade no Córrego Quirininho. Já em Lassance, amostramos diversos corpos hídricos e registramos a ocorrência de *G. lutzi* no córrego São Gonçalo das Tabocas, que passa próximo, em torno de 1,5 Km, do centro de Lassance, e em dois trechos do rio das Velhas, um próximo da foz do riacho Ribeirão, local mais afastado do centro, em torno de 14 km do centro de Lassance e o outro em um local conhecido como Recanto da Escaramuça, em torno de 5 Km do centro. Em todos esses locais os espécimes foram coletados sobre pedras ou folhas submersas. Esses rios, em geral, encontram-se em bom estado de conservação, principalmente o trecho do rio das Velhas na região que tem o suporte do Projeto Manuelzão da Universidade Federal de Minas Gerais. Contudo, em alguns trechos o córrego São Gonçalo das Tabocas, inclusive no local de coleta do lote UERJ 10418, está cercado por pastagens e sem vegetação ripária, que está acarretando no assoreamento do mesmo, necessitando de recuperação ambiental urgente.

Os dados disponíveis apontam um possível endemismo de *G. lutzi* embora uma ampliação de áreas de coleta seja necessária para confirmação.

Comentários: Walker (1925) descreveu ancilídeos não septados encontrados juntos com a única concha utilizada na descrição de *G. lutzi*, que tinham as conchas ovais, translúcidas, sem linhas radiais; ápice obtuso, excêntrico, aparentemente pontuado. Marcus e Marcus (1962) sugeriram sua sinonímia com *G. ticaga* e Hubendick (1967) a considerou sinônimo de *H. moricandi*, junto com *G. nordenskioldi*, por apresentarem a forma da concha septada. Não concordamos com as sugestões desses autores diante das informações morfológicas e moleculares já apresentadas. As 48 conchas mensuradas provenientes da localidades tipo apresentam índices morfométricos dentro do intervalo observado para a espécie, embora sejam menores que as utilizadas na descrição da espécie.

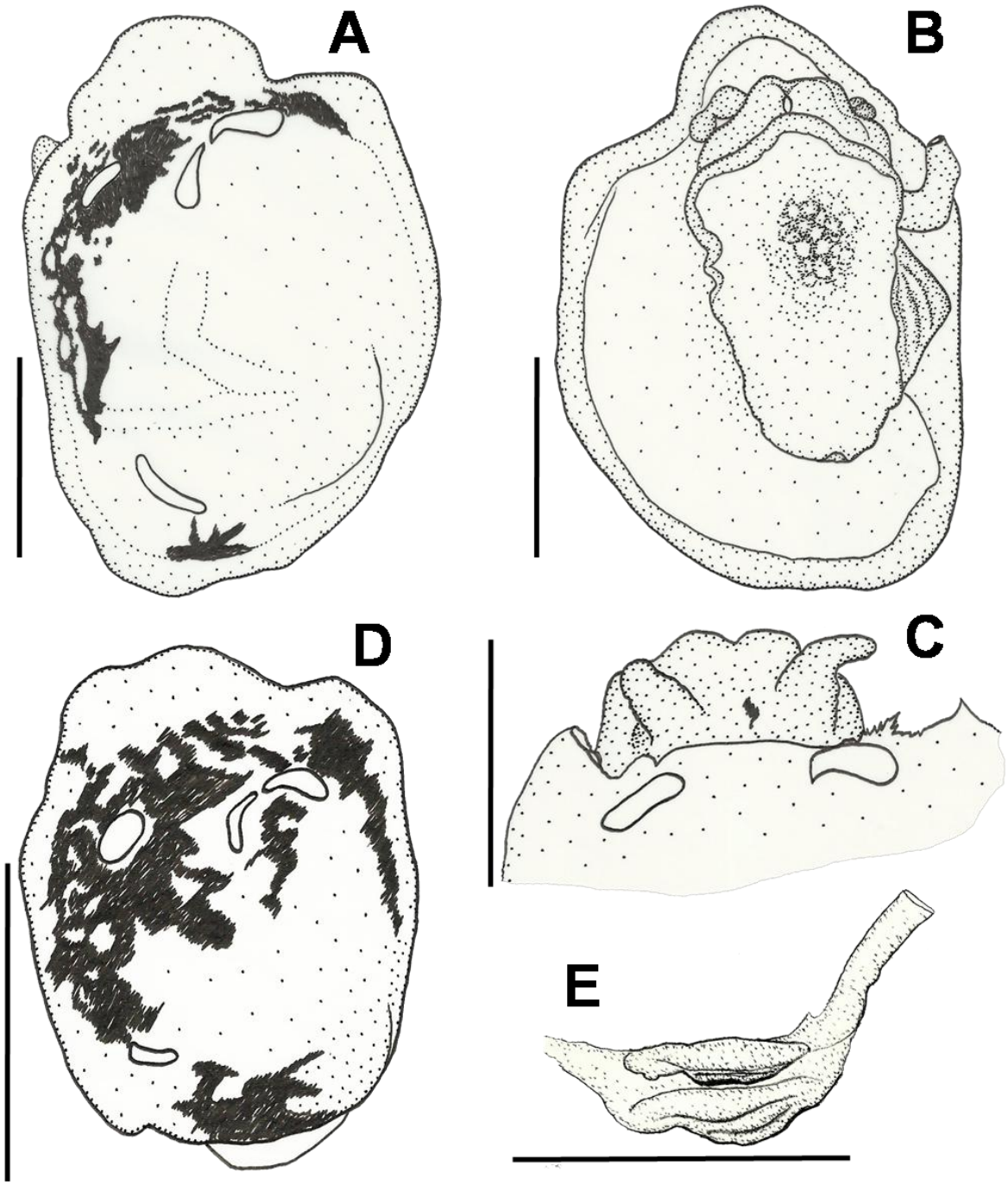
Além disso, a forma geral do tipo observada em vista dorsal (USNM 102025) é semelhante aos lotes examinados da localidade tipo (Tabela 5). Lanzer (1996) reconhece a validade de *G. lutzi*, mas destaca a necessidade de confirmar a identificação dos ancilídeos coletados junto à concha septada descrita por Walker (1925). Essas conchas, segundo Marcus e Marcus (1962) estão de acordo com os índices morfométricos apresentados por ele para *G. ticaga*, que variou de 6,5 a 0,85 mm de comprimento.

Segundo Santos (2003) *Gundlachia lutzi* é uma espécie válida e necessitava somente de coletas na localidade tipo para estudos detalhados.

Os dados inéditos sobre a morfologia externa e interna das partes moles foram usados para a redescrição deste táxon. A impressão muscular anterior direita alongada; a ausência de divertículos na vesícula seminal; a vagina com o dobro da espessura da espermateca; a próstata sem folículos evidentes e a ausência de flagelo foram apontados como autapomorfias pela análise cladística. Além disso, a rádula apresenta uma série de caracteres que até o momento só observamos nesta espécie, como por exemplo, o número de cúspides no dente central e as suas formas.

Portanto, baseados em dados morfológicos e moleculares, já apresentados, consideramos *G. lutzi* uma espécie distinta e válida.

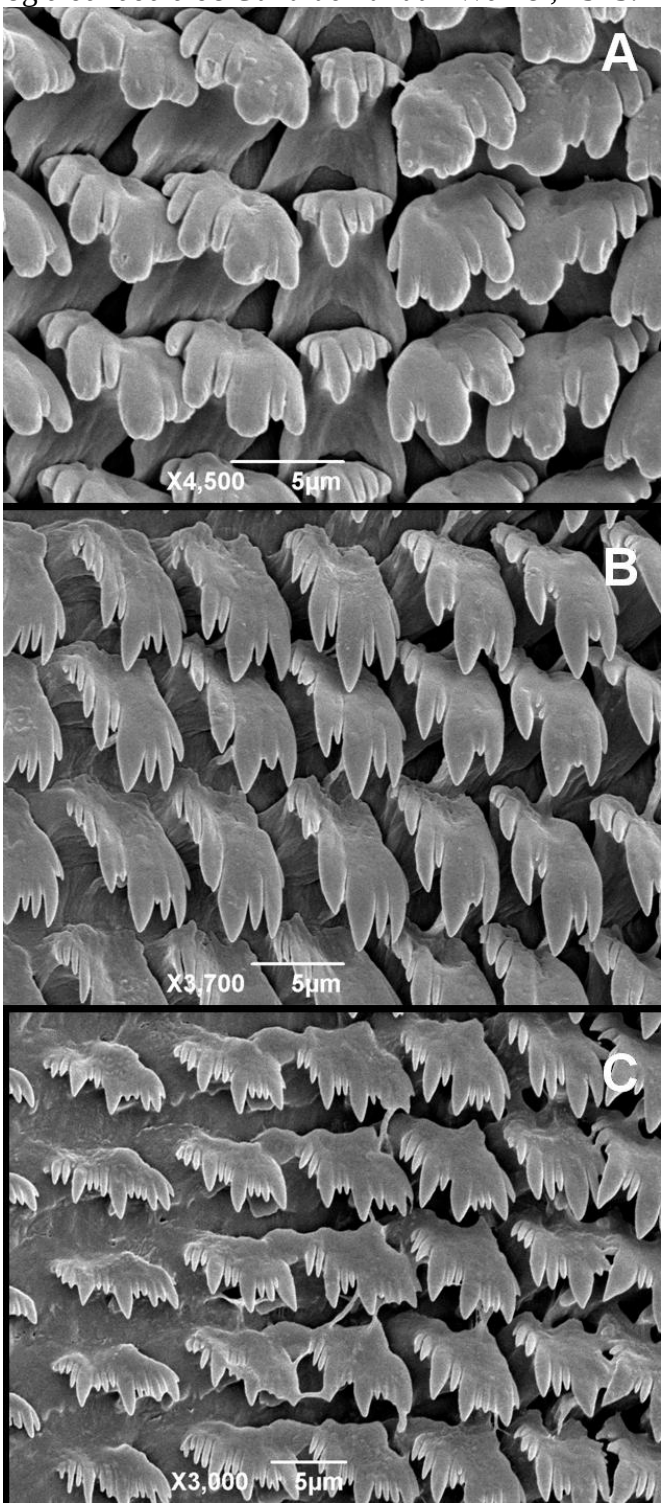
Figura 38 - Morfologia externa da parte mole de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925.



Legenda: **(A)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando as três impressões musculares (MAD elíptico e MAE e o MPE alongados) e pigmentação concentrada na região anterior esquerda. **(B)** Vista ventral da parte mole, evidenciando a forma alongada do pé e a extremidade afilada. **(C)** Detalhe do palpo labial bífido e tentáculos curtos. **(D)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando a variação do MAE, que pode ser elíptico e da pigmentação que pode ser mais esparsa sobre o teto do manto. **(E)** Pseudobrânquia, com o lobo dorsal menor do que o ventral e com duas lamelas e o ventral com três. UERJ 10418. Escala= 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

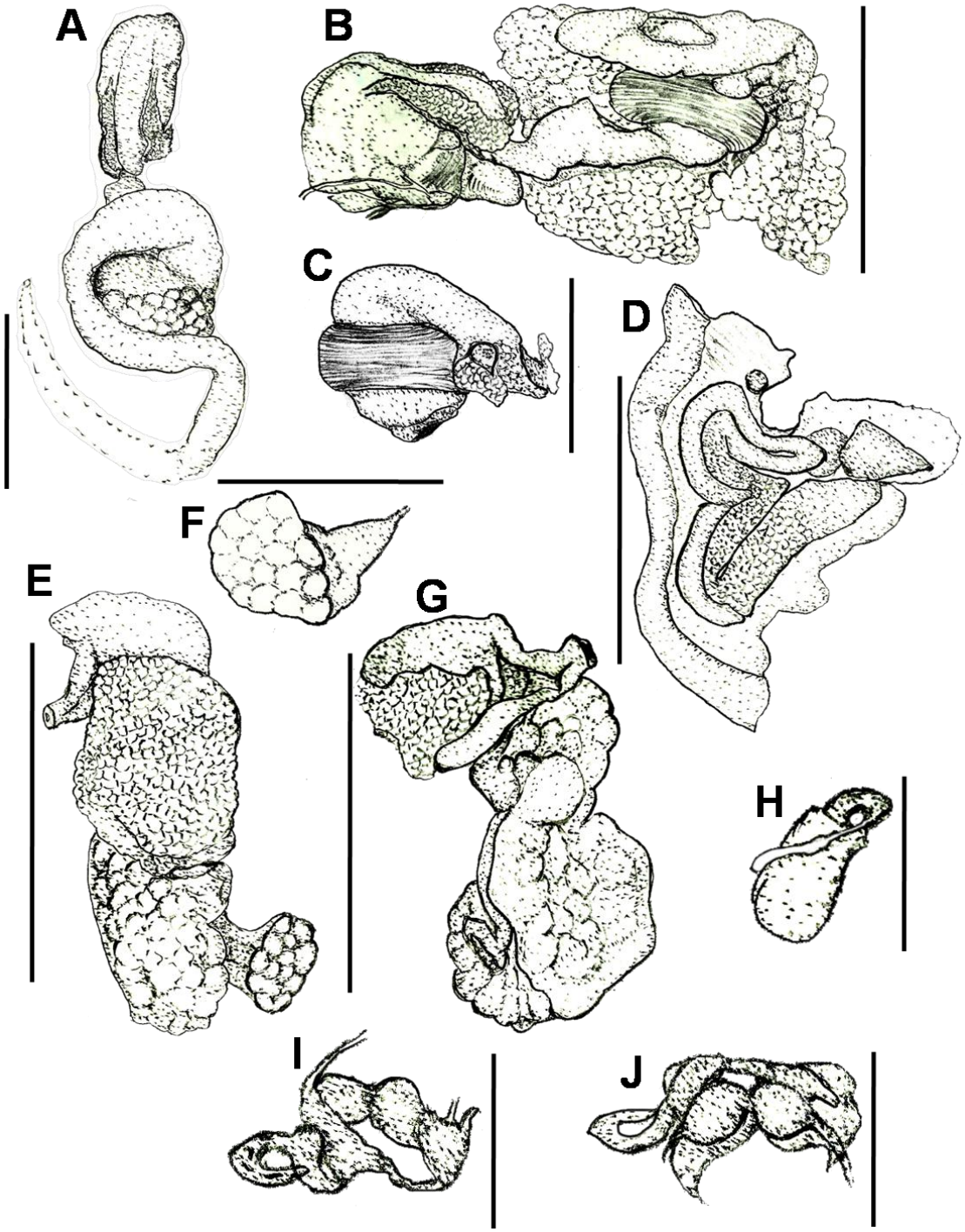
Figura 39 - Morfologia da rádula de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925.



Legenda: Espécime coletado na localidade-tipo (UERJ 10418). **(A)** Vista dorsal da região anterior da rádula, mostrando os dentes centrais e laterais. Os dentes centrais são assimétricos e com duas cúspides acessórias de cada lado das duas cúspides principais. **(B)** Detalhe dos dentes laterais na região de transição com os marginais; assimétricos e com uma ou duas cúspides acessórias entre o endocone e o ectocone. **(C)** Dentes marginais multicuspidados.

Fonte: MEV de L.E.M. Lacerda.

Figura 40 - Morfologia interna da parte mole de *Gundlachia lutzi* Walker, 1925.



Legenda: **(A-C)** Sistema digestório. **(A-B)** Vista dorsal e ventral, respectivamente, evidenciando bulbo bucal, odontóforo, esôfago, estômago, ceco, intestino e a glândula digestiva. **(C)** Vista lateral do estômago, evidenciando a região muscular e pilórica e o ceco curto. **(D)** Vista dorsal do sistema excretor, evidenciando a forma sinuosa e a proporção semelhante do átrio e do ventrículo. **(E-G)** Vista dorsal e lateral-direita do sistema reprodutor, respectivamente. **(E)** evidencia a glândula nidamental elíptica, com a região mediana quase da mesma largura do que as extremidades e a região anterior do útero arredondada; **(F)** Ovoteste, com 20 divertículos. **(G)** evidencia a que a espessura da vagina é o dobro da espermateca. **(I)** Complexo peniano, sem flagelo e com o prepúcio grosso, sendo o comprimento o dobro da largura. **(I-J)** Sistema nervoso, evidenciando os gânglios cerebrais e a comissura cerebral fina **(J)** e comissura pediosa curta **(K)**. Escala= 1,0 mm, exceto (**C, F, H-J**)= 0,5 mm. UERJ 10418.

Fonte: O autor, 2015.

4.2.1.5 *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962)

Binômio original: *Uncancylus ticagus* Marcus e Marcus, 1962

(Figuras 41-45)

Descrição original: *"Lenght of shell up to 6,5 mm; cephalic lobes distinct; tentacles long. Shell oval, translucent, nacreous; apex between secondand last third and mid-line and right margin, minutely pitted, with flattened top. Posterior shell muscle to the left. Mantle with 3 fields of dark pigment cells. Pallial cavity and its aperture large. Infrapallial lobe with retractor and small dorsal and big branchial appendage; anus between them. Concentration of ganglia varies individually. Bow of separete mandibular lamellae surrounding antero-dorsal plate. Radula with tricuspid laterals and asymmetrical principal cusps of central. Ejaculatory duct terminates with small penial papilla. Duct of bursa immediately inside female aperture. Together with the holotype, a 4,5 mm long snail in alcohol, further preparations are kept in the Department of Zoology, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of the University of São Paulo"* (Marcus e Marcus, 1962).

Lista sinonímica:

Uncancylus ticagus Marcus e Marcus, 1962: 217.

Gundlachia obliqua: Hubendick, 1967: 3.

Anisancylus ticagus: Hubendick, 1967: 34.

Uncancylus ticacus: Fernandez, 1981: 107. (grafia incorreta).

Gundlachia ticaga: Ohlweiler e Lanzer, 1993: 129 [n. comb.]—Lanzer, 1996: 192—Thiengo et al. 2001: 178—Thiengo et al. 2002: 43—Thiengo et al. 2004: 99—Santos, 2003: 210—Gutiérrez Gregoric et al. 2006: 54—Rumi et al. 2006: 207—Rumi et al. 2008: 83—Núñez et al. 2010: 52—Lacerda et al. 2011: 334. Simone et al. 2012: 21— Ovando et al. 2014: 11.

Material tipo: Síntipos MZSP 64118; MZSP 43745 (Simone 2006: 113).

Após ciência do encontro do material tipo (Simone 2006; Dornellas e Simone, 2011), fomos ao MZSP para examinar o material em agosto de 2011 e tivemos acesso ao lote MZSP 64118, que continha duas conchas e duas partes moles. A etiqueta escrita de próprio punho e com a letra do Dr. Marcus (Figura 41A) não nos deixou dúvida que

se tratava realmente do material utilizado na descrição original de Marcus e Marcus (1962) sob o binômio *Uncancylus ticagus*. O outro lote (MZSP 43745), não foi localizado.

As dimensões das duas conchas mensuradas foram 5,55 x 3,77 x 3,36 x 1,68, a maior, e 4,54 x 3,12 x 2,64 x 1,13 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Marcus e Marcus (1962: figs. 1,2) apresentaram duas conchas, uma maior e ampla e outra um pouco menor e mais estreita. Isso associado a etiqueta, não nos deixa dúvidas que esse material foi utilizado diretamente na descrição e diagnose da espécie.

A concha maior apresenta a abertura elíptica, com o ápice projetado no quadrante posterior externo e posicionado entre a borda direita e a linha mediana da concha (Figura 41B). A presença de linhas radiais na região anterior da teleoconcha é bem evidente, no entanto na menor este carater está ausente. Em ambas as conchas, as linhas de crescimento concêntrico são bem evidentes. No ápice arredondado, no aumento de 100x, deu para observar as pontuações irregulares que quase alcançam a depressão apical. Em vista lateral, fica nítido que a concha maior utilizada na diagnose, é semi-septada (Figura 41C), uma vez que apresenta um fechamento na abertura da concha, na metade da altura.

Em relação às partes moles, o exemplar maior apresentou uma forma gundlachioide, refletindo a modificação observada na concha. Além de tentáculos longos, em torno de 1 1/2 a distância interocular e pigmentação sobre a cabeça. No segundo exemplar foi possível ver ainda as pigmentações esparsas sobre o teto do manto, apresentando três manchas mais fortes, sendo duas na região anterior e uma na posterior (Figura 43A); palpo bífido e o pé alongado, com a extremidade posterior afilada (Figura 43B). A morfologia interna não foi examinada por falta de autorização.

Diante disto, por ocasião da redescrição formal da espécie, indicaremos o maior espécime contido no lote MZSP 64118, mantido em frasco separado claramente indentificado como "*Type specimem*" (Figura 41A), como lectótipo de *G. ticaga* e os demais como paralectótipos.

Localidade-tipo: Brasil. São Paulo, Cidade Universitária, Instituto de Biociências, 23°33’50”S 46°43’47”W (em aquário). Descrita originalmente dos aquários do Departamento de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brasil.

Etimologia: não foi mencionado no texto original. Segundo Ovando et al. (2014), o Dr. Ernest Marcus tinha o hábito de criar nomes sem uma lógica.

Material examinado: Brasil, *Rio de Janeiro*: Rio das Ostras (Rio das Ostras) 03 animais, 20.IX.1999 (FIOCRUZ s/nº); (Silva Jardim) 01 animal, 20.IX.1999 (FIOCRUZ s/nº) e (Serra d'Água) 01 animal. Bom Jesus de Itabapoana (Carubuçu) 01 animal, 11.VII.2005 (FIOCRUZ s/nº). Varre-sai (Varre-sai) 02 animais, 09.VII.2004 (FIOCRUZ s/nº). Natividade (Querendo) 06 animais, 09.VIII.2004 (FIOCRUZ s/nº). Itaperuna (Raposo) 01 animal, 22.IX.2003 (FIOCRUZ s/nº), (Boaventura) 01 animal, 15.V.2004 (FIOCRUZ s/nº). Miracema (Miracema) 08 animais, 24.VI.2003 (FIOCRUZ s/nº); (Venda das Flores) 01 animal, 22.IX.2003. Porciúncula (Porciúncula) 06 animais, 22.IX.2003 (FIOCRUZ s/nº). São José de Ubá (São José de Ubá) 01 animal, 02.XII.2003 (FIOCRUZ s/nº). Santo Antônio de Pádua (Parasquina) 01 animal, 24.VI.2003 (FIOCRUZ s/nº). Aperibé (Aperibé) 12 animais, 08.XI.2004 (FIOCRUZ s/nº). Itaperuna (Boaventura) 06 animais, 17.V.2004. Vassouras (Vassouras) 04 animais, 04.VI.1998 (FIOCRUZ s/nº); (Paracambi) 05 animais,17.IV.2000. col. Thiengo, S.C. e equipe. Angra dos Reis (Ilha Grande, Parnaioca) 11 animais, 10.XII.2005 (UERJ 7035); (Ilha Grande, Provetá), 27 animais, 02.V.2006 (UERJ 7055), 36 animais, 03.V.2006 (UERJ 7056); (Ilha Grande, Praia do Sul), 04 animais, 11.XI.2006 (UERJ 7057), 26 animais, 11.XI.2006 (UERJ 7058), 07 animais, 12.XI.2006 (UERJ 7059), 14 animais, 02.III.2006 (UERJ 7060); (Ilha Grande, Vila do Abraão), 05 animais, 25.III.2006 (UERJ 7049), 22 animais, 25.III.2006 (UERJ 7050), 22 animais, 28.X.2005 (UERJ 7054), (Praia do Perequê) 13 animais, 15.I.2006 (UERJ 7044), col. L.E.M. Lacerda, I.C. Miyahira e S.B. Santos. Mangaratiba (Cantagalo, rio Jacaré), 02 animais, 01.XI.2011 (UERJ s/n), col. L.E.M. Lacerda, I.C. Miyahira e I.C.B. Gonçalves. *São Paulo*: São Paulo (Sintipo, material utilizado na descrição original), 02 animais, V.1961 (MZSP 64118); 35 conchas, V.1961 (MZSP 43745), col. E. Marcus e E. Marcus. Piracicaba (Pantanal do Tanquãn), 02 animais, 13.IX.2014 (UERJ 10688); Piramboia (rio dos Peixes, afluente do rio Tietê), 02 animais, 13.IX.2014 (UERJ 10691). Corumbataí (rio Corumbataí), 09 animais, 14.IX.2014 (UERJ 10692). Rio Claro (rio Corumbataí, afluente do rio Piracicaba), 05 animais, 14.IX.2014 (UERJ 10695). Corumbataí (Ribeirão afluente do rio Corumbataí), 21 animais, 14.IX.2014 (UERJ 10697). Analândia (rio Corumbataí, afluente do rio Piracicaba), 01 animal, 14.IX.2014 (UERJ 10698). Ipeúna (rio Passa Cinco), 05 animais, 14.IX.2014 (UERJ

10699), col. I.C. Miyahira; J.B. Carneiro; I.C.B. Gonçalves e S.B. Santos. Iperó (Flona Ipanema, Represa Hedberg, rio Ipanema), 02 animais, 26.IX.2014 (UERJ 10703), col. L.E.M. Lacerda; I.C. Miyahira; I.C.B. Gonçalves; M. Pena e S.B. Santos.

Diagnose emendada: concha com o ápice posicionado entre a linha mediana e a borda direita da concha, impressão muscular anterior esquerda é elíptica, levemente maior que a direita e em forma de gota; glândula salivar curta; apêndice terminal do útero curto e com a extremidade afilada; cúspides principais do dente central assimétricas, esquerda mais longa que a direita, entre elas há uma cúspide acessória pequena; de 12 a 15 ácinos no ovoteste; a glândula de albúmen é o dobro da largura da glândula nidamental e flagelo longo, com o dobro do comprimento do prepúcio.

Descrição da concha de *G. ticaga:* as 262 conchas mensuradas são relativamente pequenas (< 6mm), variando de 1,25 a 5,70 mm de comprimento. A análise descritiva básica e os índices morfométricos de *G. ticaga* encontram-se na Tabela 5.

As dimensões variaram de 1,00 x 0,51 x 0,47 x 0,15 até 5,70 x 4,20 x 3,30 x 1,50 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Seus índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,65; L2/C= 0,54; A/C= 0,31; A/L1= 0,47 e L2/L1= 0,82 (Tabela 5). Segundo os índices morfométricos *Gundlachia ticaga* possui uma concha baixa (A/C= 0,31) e estreita (A/L1= 0,47).

Lacerda et al. (2011) observaram variação intra e interpopulacional para quatro populações distintas de *G. ticaga* ocorrentes na Ilha Grande, Rio de Janeiro, com parte desse conjunto de dados morfométricos (183 conchas), mostrando que existe variação não apenas na morfometria mas também na escultura.

Para verificar a variação intraespecífica das conchas de *G. ticaga*, agora com uma amplitude espacial mais ampla, inclusive de bacias hidrográficas distintas, utilizamos os três municípios com o maior número de conchas mensuradas (Angra dos Reis = 183 conchas; Aperibé = 12 conchas e Corumbataí = 18 conchas). As populações não apresentaram diferença estatística significativa, segundo a Análise Discriminante (AD) (Wilks' Lambda = 0,542; df = 2; p = 0,000). Com esta análise, verificamos que a forma geral das conchas dos lotes analisados desta espécie é bastante semelhante morfometricamente, apesar das variações intra e interpopulacionais apontadas por

Lacerda et al. (2011) para os lotes provenientes da Ilha Grande. Dentre as espécies de *Gundlachia*, esta é a que mais apresenta variação na escultura da teleoconcha, conforme veremos nas descrições e ilustrações a seguir.

Em vista dorsal, observamos que a forma da abertura da concha é elíptica (Figura 41B), que o ápice é projetado sobre o quadrante posterior direito e desviado para direita, posicionando-se entre a linha mediana e a margem lateral direita da concha (Figura 41B).

A protoconcha é arredondada e com escultura representada por uma depressão apical curta e rasa ocupando 10% da área da protoconcha, seguida por uma área lisa, que ocupa em torno de 20% da protoconcha, e uma área com pontuações irregulares profundas que ocupam em torno de 70% dela (Figura 41C-E).

A teleoconcha possui linhas de crescimento concêntricas em toda a sua superfície (Figura 41, 42), podendo apresentar também linhas radiais (Figura 41D), como as da Vila do Abraão e de Provetá, localidades na Ilha Grande, Angra dos Reis, mesorregião Sul, Rio de Janeiro (Lacerda et al. 2011). O holótipo apresenta linhas radiais na região anterior da teleoconcha (Figura 41A). Além disso, em vista lateral é possível verificar que o animal, provavelmente, passou por algum estresse hídrico pois sofreu um processo de septação (Figura 41A e B). Um dos síntipos (4,5 mm) utilizados na descrição original da espécie, não apresenta sinais de formação de septo (Figura 42A). Salvo algumas variações na coloração e a presença ou não de linhas radiais na teleoconcha, em geral a morfologia das conchas é bastante semelhante em todas as populações comparadas.

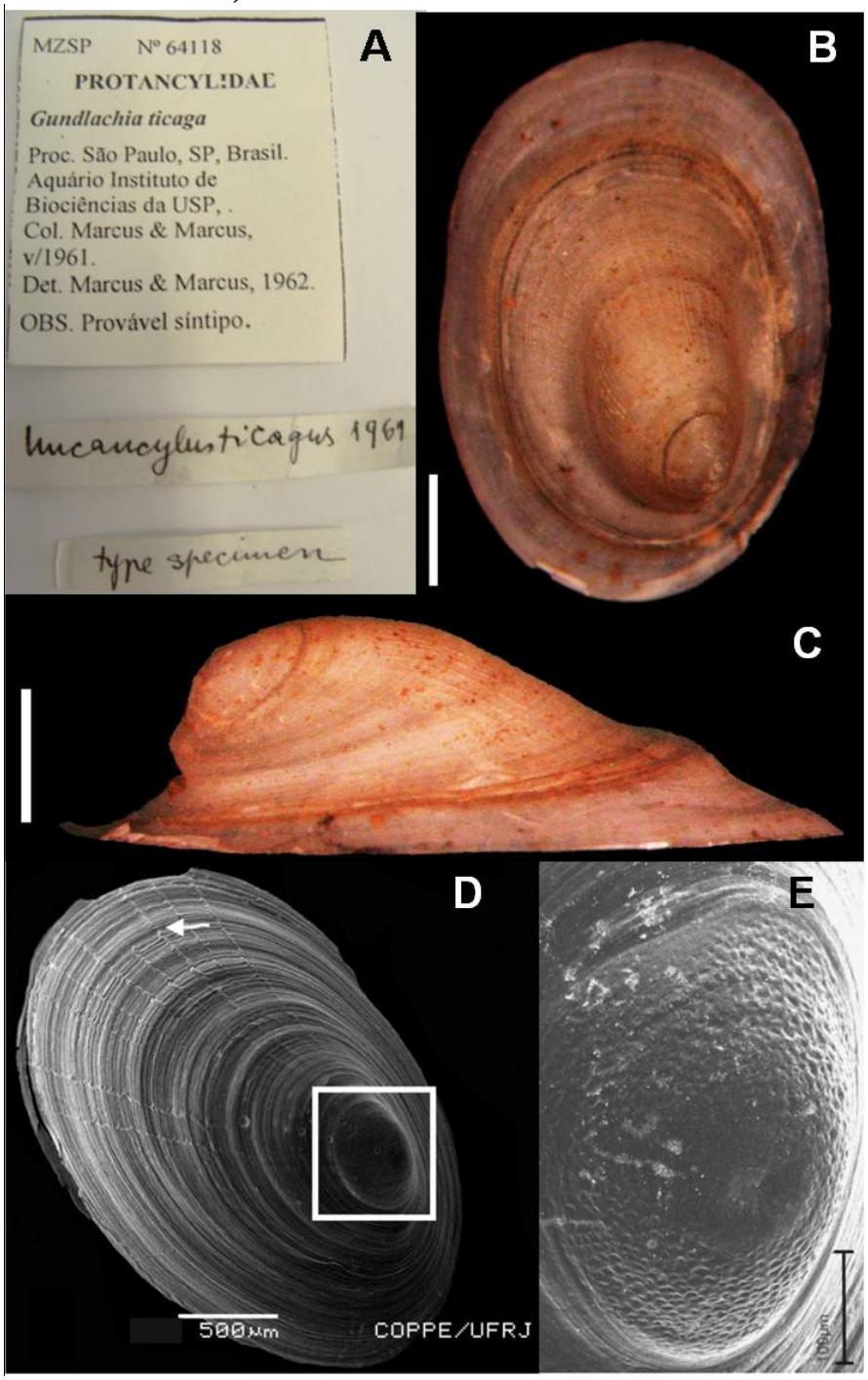
Em relação à coloração do perióstraco, talvez tenha sido a espécie que mais apresentou variação, conforme observado na figura 42. O holótipo (6,5 mm) e o lote (UERJ 7044) da Ilha Grande apresentaram a coloração amarelo avermelhado (*Oliver-Ocher*), enquanto a segunda concha citada na descrição apresentou a coloração ambar (*Sea-foam Yellow*), assim como os lotes coletados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e em Mangaratiba (Figura 42C e D). O lote (UERJ 10697) coletado no ribeirão afluente do rio Corumbataí, em São Paulo, apresentou dois tipos de coloração, caramelo (**Oliver Yellow*), na maioria das conchas do lote e só uma concha com a coloração marrom escuro (*Ecru Olive*). Os demais lotes apresentaram a coloração ambar. Não observamos projeções no perióstraco, como por exemplo, pelos periostracais, em nenhuma das conchas analisadas.

Em vista lateral (Figura 41C), destacamos duas regiões da concha: uma dorsal, côncava e com ondulações relacionadas às linhas de crescimento, bem evidentes; e outra convexa, que pode ser observada na região posterior. É importante destacar que a convexidade posterior no holótipo foi prejudicada, pela formação de uma quilha, vestígio da formação inicial do septo basal; após a colocação de "água no aquário", provavelmente, voltou ao seu crescimento natural.

O ápice arredondado posicionado entre a linha mediana e a margem direita da concha; a protoconcha com pontuações profundas, que ocupam a metade dela; a depressão apical curta e rasa e a presença ou não de linhas radiais na região anterior da teleoconcha são caracteres da concha que podem auxiliar na identificação de *G. ticaga*. Apesar de não serem exclusivos, pois alguns caracteres como, por exemplo, o ápice bastante recurvado é compartilhado com *Gundlachia* n. sp. 2, e também com *G. leucaspis*, apesar de ser mais recurvado e conter pontuações mais tênues (rasas) na protoconcha, nesta última. Todavia, quando associados aos caracteres das partes moles assim como aos dados moleculares, não existe dúvidas sobre a validade dessa espécie.

As comparações conquiliométricas interespecíficas serão apresentadas na seção de morfometria.

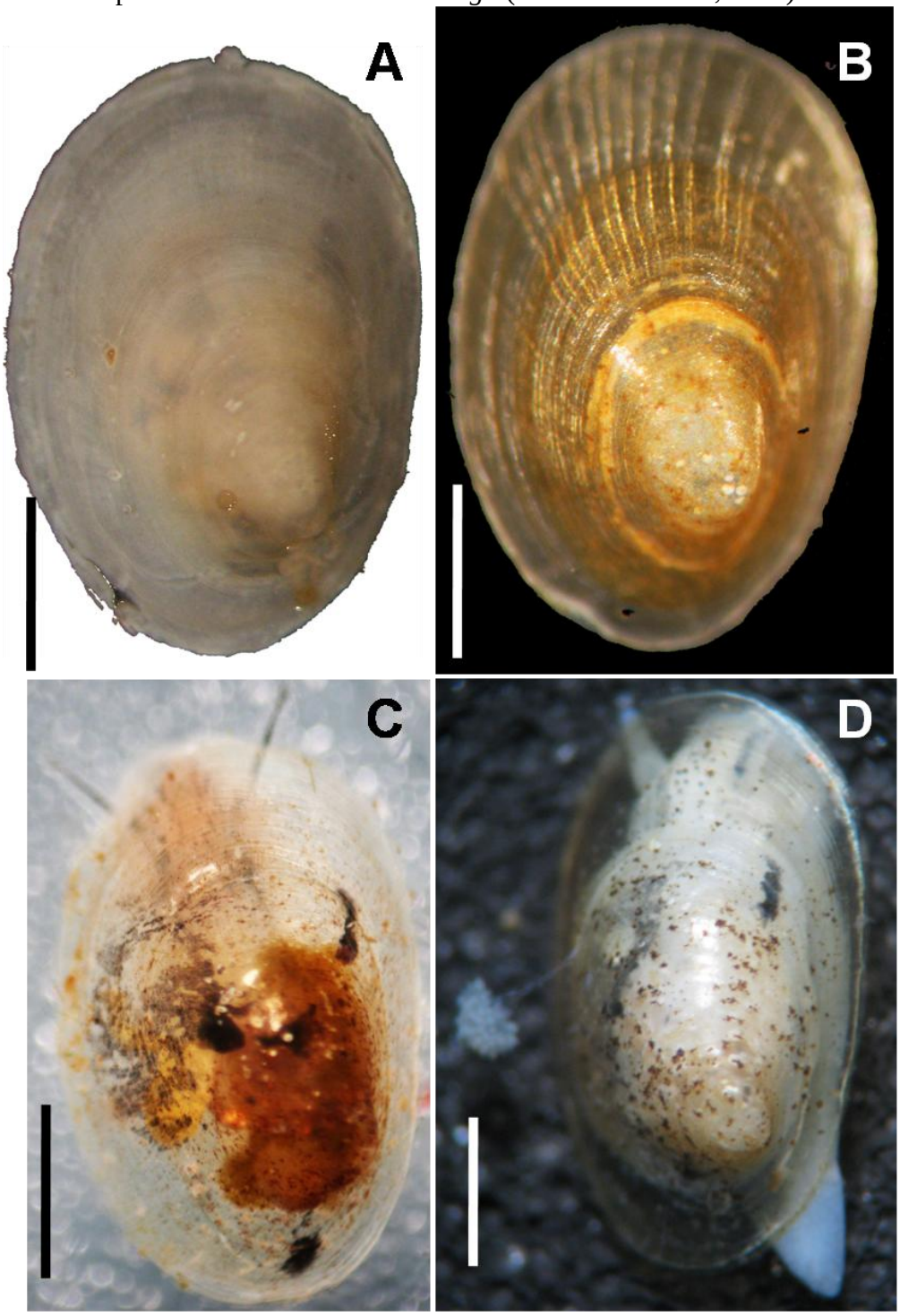
Figura 41 - Morfologia da concha de *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).



Legenda: **(A)** Foto da etiqueta original utilizada para identificação de *G. ticaga* feita à mão pelo próprio autor. **(B-C)** Vista dorsal e lateral, respectivamente, do holótipo (MZSP 64118) de *G. ticaga*, evidenciando a abertura da concha elíptica, as linhas radiais na região anterior da teleoconcha e a forma geral da concha semi-septada. **(D)** Vista dorsal de uma concha não septada, com o ápice arredondado e linhas radiais evidentes na região anterior da teleoconcha (seta). **(E)** Detalhe da microescultura apical com faixa de pontuações irregulares (que ocupam quase 70% da protoconcha), seguida pela área lisa (20%) e depressão apical curta e rasa (10%). Escala = 1mm.

Fonte: Fotos do tipo de L.E.M. Lacerda; Fotos de MEV retiradas de Lacerda et al., 2011.

Figura 42 - Morfologia da concha e alguns exemplos da variação da coloração do periostraco de *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).



Legenda: **(A)** concha em vista dorsal, representando a coloração do perióstraco ambar (*Sea-foam Yellow*) e a forma da concha não septada do síntipo (MZSP 64118). **(B)** Concha em vista dosal representando a coloração do perióstraco amarelo avermelhado (*Oliver-Ocher*) com linhas radiais na região anterior da teleoconcha (UERJ 7044). **(C)** Espécime vivo em vista dorsal, evidenciando a cor ambar do perióstraco e alguns aspectos da morfologia externa, como a pigmentação e os tentáculos longos, coletados no JBRJ. **(D)** Espécime recém fixado em vista dorsal, evidenciando a cor ambar do perióstraco e alguns aspectos da morfologia externa, como a extremidade afilada do pé e os tentáculos longos, coletado em Mangaratiba. Escala = 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

Morfologia externa (Figura 43): os tentáculos são longos (Figura 43), podendo alcançar 1 1/2 a distância interocular. O palpo oral é bífido (Figura 43).

Gundlachia ticaga possui três impressões musculares, sendo a anterior direita e esquerda elípticas, porém a direita tem uma área adesiva alongada próximo da região interna, enquanto a esquerda é ligeiramente maior (1/5) e em forma de gota; e a posterior arredondada.

Na maioria dos espécimes estudados a pigmentação no teto do manto apresenta-se concentrada no lado anterior esquerdo, sobre o sistema excretor (Figuras 43A e D) e geralmente com três manchas mais fortes, sendo duas na região anterior próximas aos músculos adutores e uma posterior e central, conforme observado no espécime fotografado vivo (Figura 42C) ou nos já fixados (Figura 43A-C). Além do manto a pigmentação pode estar presente na cabeça e nos tentáculos (Figura 42D), mas pode variar bastante entre as diferentes populações, indo de fracas até densas manchas, apesar de sempre concentradas na região anterior.

Em vista ventral, observamos que a forma do pé é alongada, podendo o comprimento ser até quatro vezes maior do que a largura (Figura 43D), e a extremidade posterior do pé é afilada (Figura 43B e D).

A pseudobrânquia possui dois lobos, um lobo dorsal que tem a largura semelhante à do lobo ventral, com três a quatro lamelas, enquanto o ventral variou de quatro a seis lamelas (Figura 43E).

Morfologia interna (Figuras 44 e 45)**:** em relação à morfologia interna observamos a rádula (Figura 44), o restante do sistema digestório (Figura 45A-D), o sistema excretor (Figura 45E), o sistema reprodutor (Figura 45F-I) e o sistema nervoso (Figura 45A-B).

Gundlachia ticaga apresenta as duas cúspides principais do dente raquidiano assimétricas, curtas, apesar de próximas da metade da placa basal e afiladas; entre elas há uma cúspide acessória pequena. O dente raquidiano tem de cinco a seis cúspides no total, a placa basal tem forma trapezoidal e curta, tendo a largura da base igual a altura (Figura 44A); além disso, a cúspide principal esquerda possui a mesma da espessura da direita e é em torno de 1/6 mais longa (Figura 44A). O dente lateral apresenta as cúspides principais com largura e comprimentos distintos; o mesocone é mais largo do que os demais, apesar de ser menor do que o ectocone e tem de uma a duas cúspides acessórias entre o endocone e o mesocone e uma cúspide acessória entre o endo e o

ectocone (Figura 44B), enquanto que o número de cúspides acessórias externas ao ectocone pode variar de duas a três, tendo a mais próxima do ectocone o dobro do comprimento das demais cúspides. O dente marginal apesar de ser multicuspidado, variando de oito a nove cúspides por dente (Figura 44C). A fórmula radular da espécie apresentada é 16-1-16, contudo pode variar 17-1-17 a 20-1-20, conforme registrado por Santos (1995).

O **sistema digestório** (Figura 45A-C) apresentou o bulbo bucal com a forma arredondada (Figura 45A e B); a glândula salivar curta, ocupando aproximadamente 2/3 do comprimento do bulbo e com o diâmetro constante (Figura 45C); o saco radular longo, pois ultrapassa o bulbo bucal (Figura 45C) alcançando até 1/5 do seu comprimento; o estômago é diferenciado, semelhante aos demais Ancylinae, e formado por duas porções: uma região muscular e uma região pilórica que possuem proporções iguais no estômago; o ceco é curto, pois não ultrapassa a metade da largura da região muscular do estômago (Figura 45B e D). Todas essas estruturas do sistema digestório apresentaram as mesmas proporções e formas utilizadas na descrição original de Marcus e Marcus (1962: fig. 14).

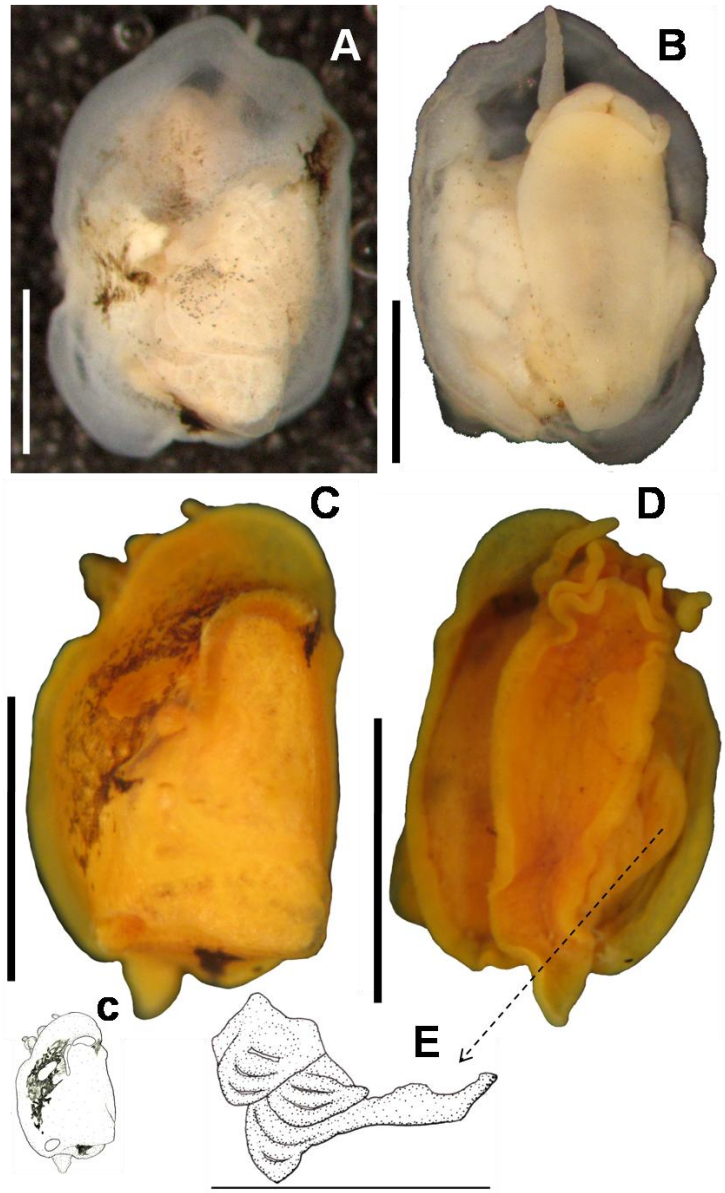
O **sistema excretor** está localizado mais afastado da borda do manto, do que as demais espécies de *Gundlachia*; com forma geral sinuosa, em relação à borda do manto. A junção imaginária das extremidades dessa estrutura forma a figura de um triângulo isósceles. A porção proximal desse sistema é glandular, e bem evidente, com forma sinuosa, formando flexuras em forma de V invertido, em relação à borda do manto (Figura 45E). O ventrículo, com forma triangular possui as dimensões semelhantes ao do átrio, que tem a forma arredondada (Figura 45E). A porção terminal do sistema excretor não é paralela à borda do manto e ultrapassa a porção glandular. O poro excretor localiza-se na extremidade da porção terminal, o restante das estruturas possui a mesma topologia.

O **sistema reprodutor** (Figura 45F-I) possui ovoteste de forma semi-esférica, com ácinos arredondados com diâmetros diferentes. O número de divertículos no ovoteste variou de 12 a 15. A vesícula seminal possui de quatro a cinco projeções arredondadas. A glândula de albúmen possui textura heterogênea, com o dobro da largura da glândula nidamental; esta é alongada, com comprimento três vezes maior do que a largura; a superfície dessa estrutura tem uma textura homogênea (Figura 45F e H). O útero mostra a região anterior arredondada (Figura 45F); o apêndice terminal do útero é curto, pois alcança somente a metade da largura da glândula nidamental e tem a

extremidade afilada, não ultrapassando a largura do ovispermoduto. A espermateca tem forma elíptica, com o comprimento o dobro da largura; seu duto tem a mesma espessura da vagina (Figura 45H). O complexo ejaculatório possui flagelo longo, com aproximadamente o dobro do comprimento do prepúcio. O prepúcio é grosso, sua largura é 1/4 do seu comprimento (Figura 45I).

O **sistema nervoso** apresentou, em vista dorsal, a comissura cerebral visível e espessa, pois a sua largura da comissura é igual a largura do gânglio cerebral (Figura 45A). A forma da porção intermediária do protocérebro é convexa e os nervos, tentacular, peritentacular externo e óptico são próximos e partem da região anterior do gânglio cerebral (Figura 45A). Em vista ventral, os gânglios pediosos são da mesma largura do que os gânglios cerebrais e estão unidos por uma comissura pediosa curta, pois os gânglios pediosos são tão próximos que não se observa a comissura (Figura 45B).

Figura 43- Morfologia externa de *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).



Legenda: **(A)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando as três impressões musculares (MAD e MAE elípticos e o MPE arredondado) e o padrão de pigmentação, que está concentrada na região anterior esquerda. **(B)** Vista ventral da parte mole, evidenciando a forma alongada do pé e a extremidade arredondada. **(C)** Detalhe do palpo labial bífido e tentáculos curtos. **(D)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando MAE e o MPE arredondados e pigmentação concentrada na região anterior. **(E)** Vista ventral da parte mole, evidenciando os tentáculos longos. **(F)** Pseudobrânquia, com o lobo dorsal com duas lamelas e o ventral com quatro. **(A-B)** MZSP 64118 (Lectótipo); **(C-E)** UERJ 7044. Escala= 1 mm.
Fonte: Fotos e ilustrações do autor, 2015.

Distribuição geográfica: Espécie amplamente distribuída, com registros da região centro-oeste do Brasil até a Argentina (Santos 2003; Thiengo et al. 2005; Lacerda et al. 2011; Ovando et al. 2014). No Brasil, existem registros nas bacias do Tocantins, Paraná e Atlântico Leste. A área de ocorrência da espécie inclui os seguintes estados:

MA, GO, BA, MT, MG, RJ, SP, RS (Lanzer 1996; Santos 2003; Thiengo et al. 2005; Santos et al. 2009, 2010; Lacerda et al. 2011; Simone et al. 2012; Cantanhede et al. 2014; Kotzian e Amaral 2014). Em Unidades de Conservação a espécie foi registrada para o Parque Estadual da Pedra Branca (PEPB) por Santos et al. (2003), Reserva Biológica da Praia do Sul (RBPS) por Santos et al. (2009), ambos no estado do Rio de Janeiro, Brasil e Parque Nacional Iguazú (PNI) por Gregoric et al. (2006) para o nordeste da Argentina. O maior número de registros de ocorrência da espécie se dá no estado do Rio de Janeiro, provavelmente reflexo do maior esforço de amostragem.

Lanzer (1996) fez o primeiro registro de ocorrência da espécie para as províncias de Corrientes e Missiones, na Argentina e Gregoric et al. (2006) confirmaram o registro para a província de Missiones. Recentemente, Rumi et al. (2008) também mencionaram que *G. ticaga* apresentou uma "distribuição restrita" na Argentina, mas sem fornecer a sua exata área de distribuição. Segundo a Dra. Rosana Lanzer (2009, comunicação pessoal), com base em suas coletas, em Caxias do Sul, no Estado do Rio Grande do Sul (Caxias do Sul), *G. ticaga* apresentou baixa abundância relativa, frente a outros ancilídeos, como *F. gentilis* e *B. ingae*. Segundo ela, isso pode representar o limite de sua distribuição mais ao sul. No sudeste, *G. ticaga* é a espécie de ancilídeo com a mais ampla distribuição e abundância relativa (Lacerda 2011).

Santos et al. (2009) registraram a ocorrência de dois espécimes de *U. concentricus* junto com 57 espécimes de *G. ticaga* na Reserva Biológica da Praia do Sul, reafirmando a maior abundância relativa de *G. ticaga* em uma região insular do Sudeste. A distribuição simpátrica dessas espécies foi registrada por Thiengo et al. (2005) na represa da Usina Hidrelétrica de Serra da Mesa, região Centro-oeste.

Kotzian e Amaral (2014) registraram *G. ticaga* na região da Caatinga, no Estado da Bahia nas localidades de Aiquara, Tanhaçu e Brumado. Os autores ressaltaram que essa espécie foi encontrada mais em riachos assoreados.

Cantanhede et al. (2014) registraram essa espécie, pela primeira vez, em três municípios da baixada maranhense, no Estado do Maranhão (Cajapió, São Bento e São Vicente Férrer), os dois últimos municípios tiveram também o primeiro registro para *G. radiata*.

Ovando et al. (2014) revisando os ancilídeos da Argentina registraram *G. ticaga* para dez localidades em seis estados (Salta, Jujuy, Corrientes, Chaco, Missiones e Buenos Aires).

Comentários: conforme apresentado nas descrições, o lectótipo de *G. ticaga* provavelmente passou por algum estresse hídrico, pois sua concha está parcialmente septada, conforme observado (Figura 41A e B). O ápice mais agudo e proeminente foi um dos motivos que levaram Marcus e Marcus (1962) a alocar a espécie no gênero *Uncancylus*. Além desse carácter os autores basearam a comparação da rádula de *G. ticaga* com os desenhos das rádulas feitas por Baker (*in* Walker, 1925) para *Uncancylus leucaspis* (=*G. leucaspis*) (Walker, 1925) e *U. calverti* (=*U. concentricus*) (Pilsbry, 1920). Portanto, Marcus e Marcus (1962) cometeram esse equívoco, por estarem utilizando uma concha semi-septada e por comparar a rádula com *U. leucaspis*, que posteriormente foi alocada por Santos (2003), em *Gundlachia* por vários motivos, dentre eles o ápice arredondado e com pontuações irregulares, diferente do gênero *Uncancylus* que apresenta o ápice agudo e recurvado para trás (Santos, 1995, 2003; Ovando et al. 2014).

Gundlachia ticaga foi citada por Hubendick (1967) como sinônimo de *G. obligua* (=*A. obliquus*), baseado na forma da concha. Porém, conforme apontado por Ohlweiler e Lanzer (1993) *G. ticaga* não apresenta estrias radiais na protoconcha, que é um dos caracteres diagnósticos de *A. obliquus*, além do ápice recurvado para trás (Ovando et al. 2014: fig. 2).

O lobo dorsal da pseudobrânquia varia de três a quatro pregas e é quase sempre do mesmo tamanho do lobo ventral, que varia de quatro a seis pregas (Figura 43E). Esta estrutura difere de *Gundlachia* n. sp. 2 que apresenta o lobo dorsal bastante reduzido e, em geral, um menor número de pregas (Figura 56F). Esta diferença pode dar a *G. ticaga* uma certa vantagem adaptativa nos ambientes com baixa oxigenação, uma vez que esta estrutura auxilia as trocas gasosas (McMahon e Whitehead 1987), o que seria corroborado pela sua maior abundância relativa nos diferentes lotes observados ao longo deste trabalho, aparecendo em ambientes impactados conforme registrado por Santos (2003). Contudo, outras hipóteses podem explicar esta maior distribuição da espécie, como, por exemplo, questões históricas, que devem ser investigadas com uso de métodos da Biogeografia Histórica.

A impressão muscular direita lembra a forma de uma gota d'água (Lanzer 1996; Santos 2003). As formas das impressões musculares são diferentes entre as quatro espécies: *G. bakeri*, *G. radiata*, *G. ticaga* e *Gundlachia* n. sp. 2, conforme sumariza a tabela 3.

O sistema excretor de *G. ticaga* parece ser mais sinuoso (Figura 45E) do que *Gundlachia* n. sp. 2 (Figura 58D).

A vesícula seminal possui de quatro a cinco projeções arredondadas (Marcus & Marcus 1962: fig. 15), diferente do número de folículos observados *Gundlachia* n. sp. 2, que apresenta seis (Figura 58H).

O sistema reprodutor apresenta a glândula de albúmen de *G. ticaga* (Figura 45F) maior se comparada com *Gundlachia* n. sp. 2 (Figura 58E) e afilado na extremidade. Ovoteste possui 13 folículos (Figura 45G), porém a descrição original de Marcus e Marcus (1962) aponta 15 folículos. O apêndice terminal do útero é curto e possui a extremidade afilada (Figura 45E); já em *Gundlachia* n. sp. 2 é longo (Figura 58E).

Segundo Santos (1995: fig. 81), *G. ticaga* possui a vesícula seminal como um alargamento do canal hermafrodita, com quatro a cinco projeções saculiformes, e a próstata apresenta quatro folículos; o mesmo número foi observado nos exemplares de Provetá, Ilha Grande, Angra dos Reis.

Gundlachia ticaga difere de *G. leucaspis* em relação a largura do prepúcio enquanto a primeira apresentou o prepúcio espesso, com a relação de largura/comprimento de 1/4; a segunda apresentou o prepúcio fino com relação de 1/7.

Conforme vimos para distintas estruturas (ex. proporção da largura da glândula de albúmen pela nidamental, ou o comprimento do apêndice terminal do útero tendo como referência a largura da glândula nidamental), essas proporções devem ser usadas como os principais descritores das formas, pois assim como utilizamos as relações morfométricas como as melhores descritoras das conchas, conforme visto por Lacerda et al. (2011) esse princípio deve ser aplicado para as partes moles.

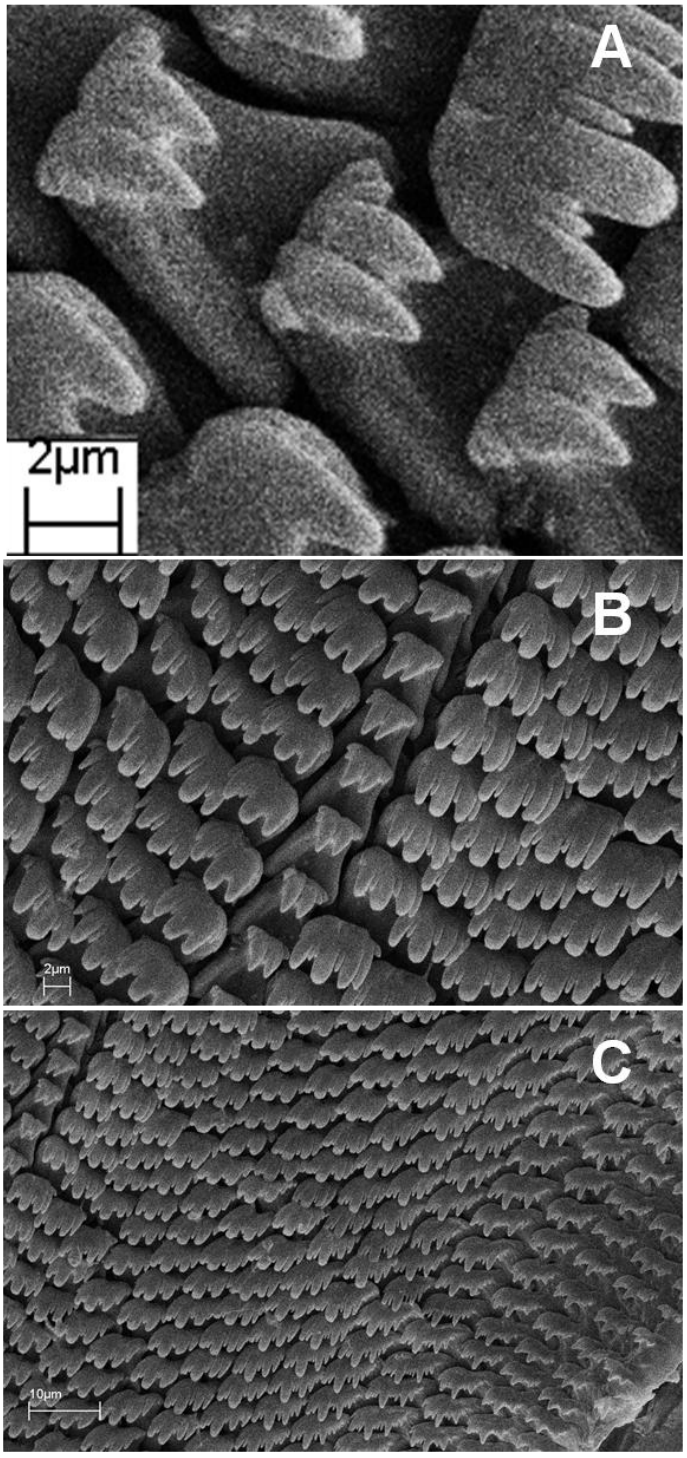
Kotzian e Amaral (2014) destacaram alguns aspectos da morfologia externa da concha e partes moles de *G. ticaga* da região da Caatinga, Nordeste do Brasil, os quais se enquadram nos caracteres aqui discutidos para *G. ticaga*.

Ovando et al. (2014) apresentaram informações sobre morfologia das conchas e partes moles de *G. ticaga* ocorrentes na Argentina. Todavia, algumas diferenças foram observadas. A cúspide principal esquerda do dente central tem o dobro da espessura e do comprimento da cúspide direita (Ovando et al. 2014: fig 4h), além disso, não possui a cúspide intermediária observada no lote UERJ 7044 (Figura 44A), que está presente também na rádula apresentada por Simone et al. (2012: fig. 2b), na caracterização morfológica de *G. ticaga*, proveniente do Lago Monte Alegre de Ribeirão Preto, São Paulo. Em relação às conchas, apesar da forma da abertura ser quase arredondada e o

ápice ultrapassar a borda da concha (Ovando et al. 2014: fig. 8) os demais caracteres são semelhantes. Inclusive a amplitude morfométrica média das seis conchas mensuradas é C= 4,15, L=2,83 e A=1,45.

Portanto, *G. ticaga* deve permanecer como uma espécie válida, baseada em dados morfológicos e moleculares, conforme foi apresentado.

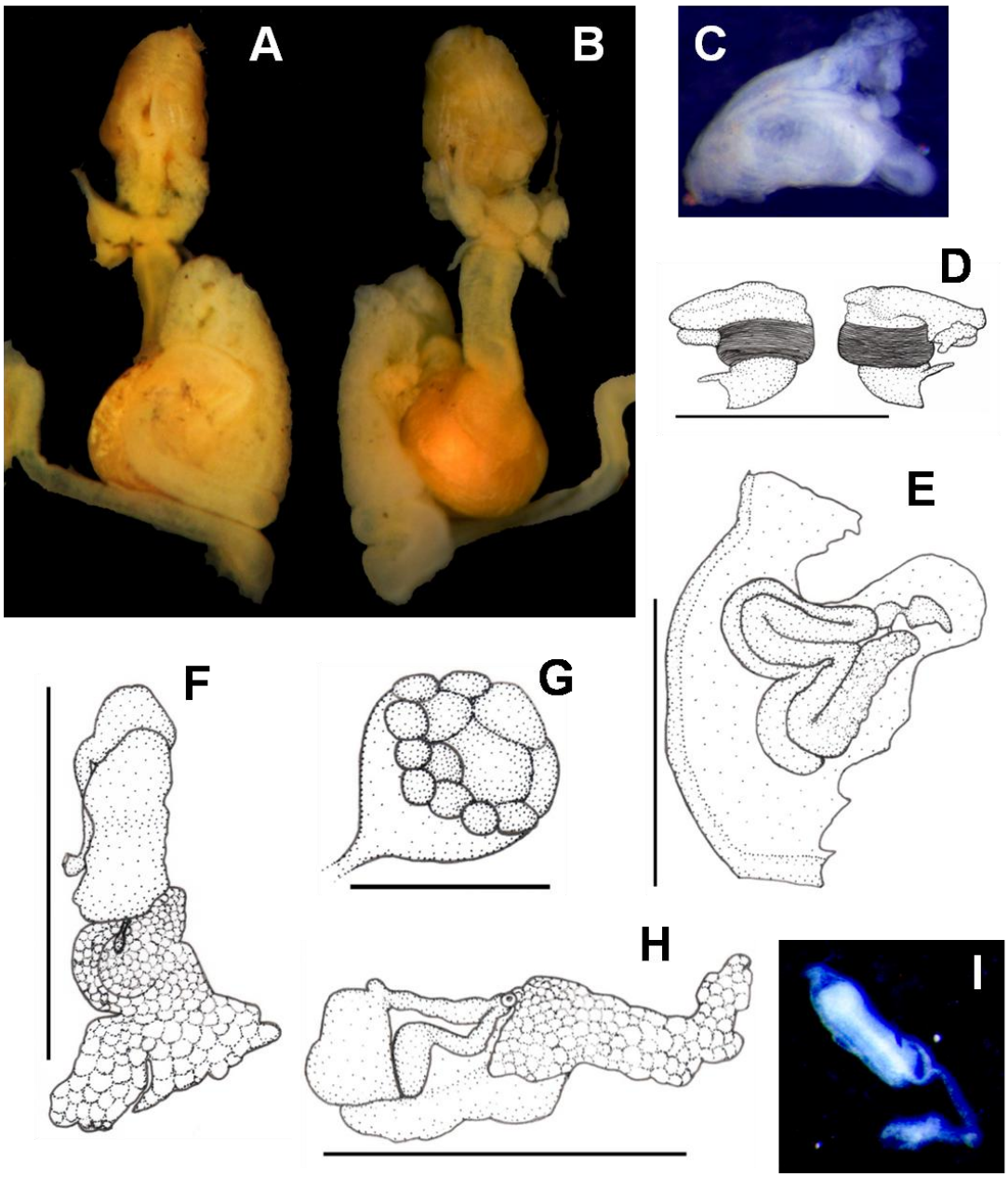
Figura 44 - Morfologia da rádula de *Gundlachia ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).



Legenda: **(A)** Vista dorsal do dente raquidiano, evidenciando as duas cúspides principais assimétricas, curtas e afiladas. Entre as cúspides principais há uma cúspide acessória e mais uma ou duas de cada lado. **(B)** Vista dorsal da região mediana da rádula, mostrando os dentes centrais e laterais. Nos dentes laterais observa-se a mesocone mais largo, o endocone mais longo e uma cúspide ou duas cúspides acessórias entre o endo e o ectocone. **(C)** Vista dorsal de meia fileira da rádula, evidenciando os dentes marginais que variaram de oito a nove cúspides por dente (UERJ 7044).

Fonte: Fotos de MEV de Alan Moraes para este trabalho, 2015.

Figura 45 - Morfologia interna das partes moles de *G. ticaga* (Marcus e Marcus, 1962).



Legenda: **(A)** Vista dorsal evidenciando bulbo bucal arrddondado, esôfago com a metade da largura do bulbo, estômago, intestino e a glândula digestiva. Além disso, evidencia a comissura e os gânglios cerebrais. **(B)** Vista ventral, evidenciando bulbo bucal, esôfago, as duas regiões com a mesma largura do estômago. Além dos gânglios pediosos e da comissura pediosa curta. **(C)** Vista lateral esquerda, evidenciando o bulbo bucal arredondado e saco radular longo. **(D)** Vista lateral direita e esquerda do estômago, evidenciando a região muscular e pilórica e o ceco curto. **(E)** Vista dorsal do sistema excretor, evidenciando a forma sinuosa e a proporção semelhante do átrio e do ventrículo. **(F** e **H)** Vista dorsal e lateral-direita do sistema reprodutor, respectivamente. **(F)** evidencia a glândula nidamental alongada; a região anterior do útero arredondada e seu apêndice terminal curto e afilado na extremidade. **(G)** Ovoteste, com 13 ácinos. **(H)** evidencia a vagina e o duto da espermateca de mesmo calibre. **(I)** Complexo peniano, com flagelo longo e com o prepúcio grosso**.** Escala= 1,0 mm. UERJ 7044; exceto (C-I) UERJ 10697.

Fonte: O autor, 2015.

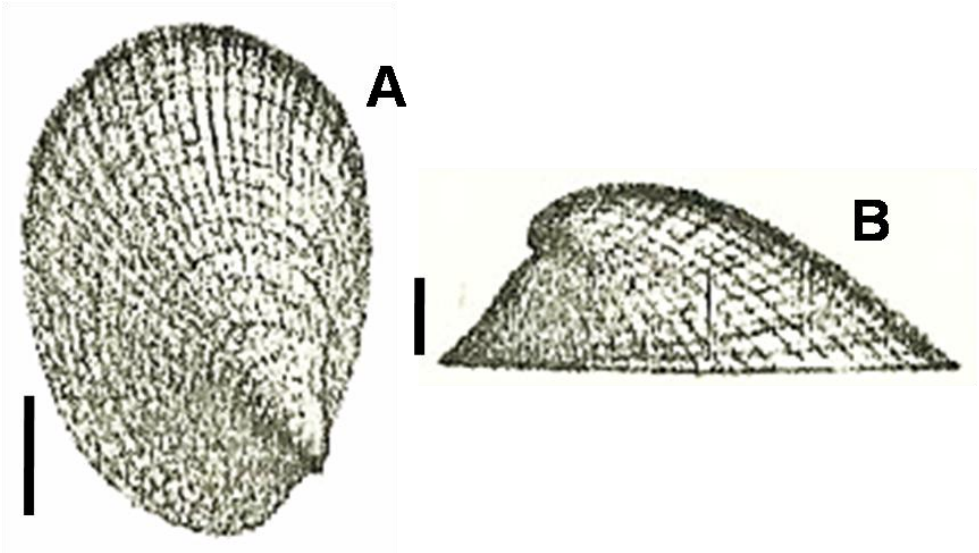
4.2.1.6 *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853)

Binômio original: *Ancylus saulcyanus* Bourguignat, 1853
(Figuras 46-49)

Descrição original: "*Anc. testa antice convexa, postice paululum concava; apice parvulo, postico, sat obtuso, dextrorsus dejecto, saepe decorticato; depressione apicali rotundada, in verticis extremitate sita. Testa parva, fragili, cornea, concentrice striatula, ac argutissime radiatula, praesertim ad aperturam; apertura ovata. Long. 4-4 ¼ Mill., lat 3, alt.2*."

Segundo as ilustrações feitas por Bourguignat (1853: figs. 26-33), apresenta abertura da concha elíptica, com a região anterior mais larga do que a posterior; o ápice tem a forma arredondada, posicionada no quadrante posterior direito, ultrapassando a borda da concha e na teleoconcha observa-se linhas radiais em toda a superfície da concha (Figura. 46).

Figura 46 - *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853), ilustração original da concha.



Legenda: (A) Vista dorsal, observa-se o ápice, recurvado para direita e linhas radiais na teleoconcha. (B) Vista lateral, destacando o ápice arredondado, a região anterior convexa e a posterior concava. Escala = 1 mm.
Fonte: Bourguignat , 1853: figs. 30, 32.

Lista sinonímica

Ancylus Saulcyanus—Bourguignat, 1853: 173—Adams e Adams, 1855: 266—Clessin, 1882: 71.

A.[nisancylus] saulcyanus — Hubendick, 1964: 17.

Ancylus saulcyanus: Hubendick—1967: 28—Lanzer, 1996: 188.

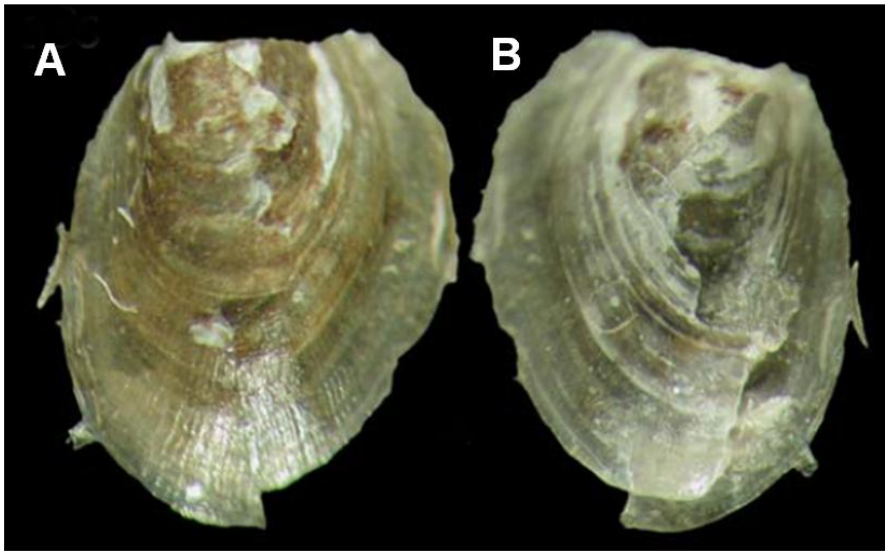
Marcancylus saulcyanus: Santos, 1995: 95.

Gundlachia saulcyana: Santos, 2003: 209—Simone: 2006: 113.

Material tipo: holótipo – British Museum (Londres) 1982180. (Simone 2006: 113).

Embora o holótipo esteja quebrado (Figura 47 A e B), verificamos que existem linhas radiais na região anterior da teleoconcha.

Figura 47- Holótipo de *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853).



Legenda: (A e B) Vista dorsal e ventral, observa-se que a concha está quebrada. Concha com 3 mm.
Fonte: Holótipo (BM 1982180) retirado de Simone (2006: fig. 336).

Localidade-tipo: arredores de Porto-Cabello (sic), Venezuela.

Etimologia: não foi determinada pelo autor.

Material examinado: Brasil, *Rio de Janeiro*: Penedo (Serrinha) 21 animais (21 conchas e 21 partes moles), X.1991, (UERJ 46), col. S. Thiengo.

Esse material foi identificado por Santos (1995) como *Marcancylus saulcyanus*, por ter características morfológicas da microescultura do ápice da concha semelhante à descrição original de Bourguignat (1853). Além disso, apresentou vários caracteres da morfologia interna semelhantes aos espécimes estudados por Hubendick (1964, 1967) da Venezuela. As informações sobre esta espécie, contidas principalmente nessas três fontes, foram utilizadas para compor a matriz de caracteres da análise cladística.

Diagnose emendada: concha com a região anterior larga, tentáculos longos e vesícula seminal sem divertículos.

Descrição das conchas: as 21 conchas mensuradas são relativamente pequenas (< 5mm), variando de 1,68 a 3,08 mm de comprimento. A análise descritiva básica e os índices morfométricos de *G. saulcyana* encontram-se na Tabela 5.

As dimensões variaram de 1,68 x 1,14 x 0,75 x 0,54 até 3,08 x 2,10 x 1,78 x 1,18 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Os índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,69; L2/C= 0,39; A/C= 0,37; A/L1= 0,56 e L2/L1= 0,77 (Tabela 5). Segundo os índices morfométricos *G. saulcyana* possui de uma concha alta (A/C= 0,37) e larga (A/L1= 0,56).

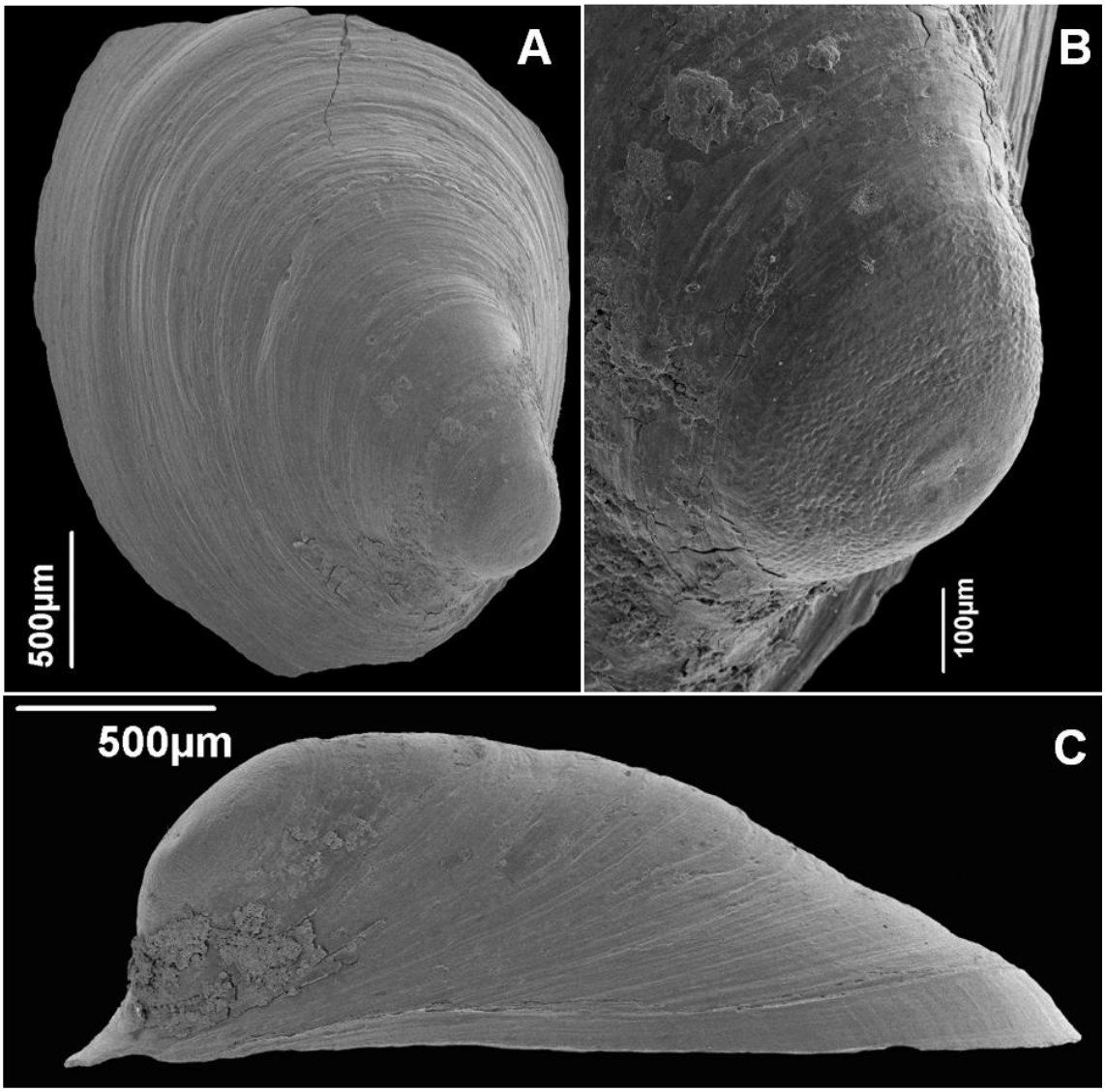
Em vista dorsal, observamos que a forma da abertura da concha é elíptica (Figura 48A), todas as conchas apresentam o ápice próximo da borda da concha, conforme observado na descrição original da espécie e nas ilustrações fornecidas por Hubendick (1967: fig. 152, 153).

A protoconcha é arredondada, com uma depressão apical curta e profunda (Figura 48B), que ocupa os primeiros 5% da protoconcha, seguida por uma área lisa, que ocupa 10% da protoconcha e, uma área com pontuações irregulares profundas que ocupam 85% da protoconcha. A forma arredondada dos exemplares examinados difere ligeiramente da ilustração original (Bourguignat, 1853), em que parece um pouco mais afilada (Figura 48A).

A teleoconcha possui linhas de crescimento concêntricas em toda a sua superfície (Figura 48). O lote estudado apresentou a coloração da concha marrom escuro (*Ecru Olive*), segundo Ridgway (1912).

Em vista lateral (Figura 48C), destacamos a região anterior, convexa e com ondulações relacionadas às linhas de crescimento; e outra posterior, côncava.

Figura 48 - Morfologia da concha de *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853), coletada em Penedo, Rio de Janeiro.



Legenda: **(A)** Vista dorsal, abertura da concha elíptica e ápice projetado além da margem direita da concha. **(B)** Vista dorsal, detalhe da microescultura apical, com faixa de pontuações irregulares (que ocupam 85% da protoconcha), seguida pela área lisa (10%) e depressão apical curta e profunda, que ocupa (5%) da protoconcha. **(C)** Vista lateral, evidenciando o ápice arredondado, a região anterior convexa e com ondulações e a posterior côncava.

Fonte: MEV de Alan Moraes para este trabalho, 2015.

Morfologia externa: os tentáculos são longos e o palpo oral é bífido (Figura 49A).

Gundlachia saulcyana possui três impressões musculares, sendo a MAD e MAE elípticas e a MPE alongada, tendo a largura três vezes maior do que o comprimento (Figura 49A), a área adesiva é alongada e localizada entre as duas impressões musculares anteriores.

A pigmentação no teto do manto apresenta poucas manchas na região anterior, além de algumas manchas na cabeça. Observa-se, em vista dorsal, a extremidade posterior do pé afilado e ultrapassando a borda do manto (Figura 49A).

A pseudobrânquia possui dois lobos que segundo Santos (1995) apresenta o lobo ventral mais desenvolvido e com três ou quatro lamelas.

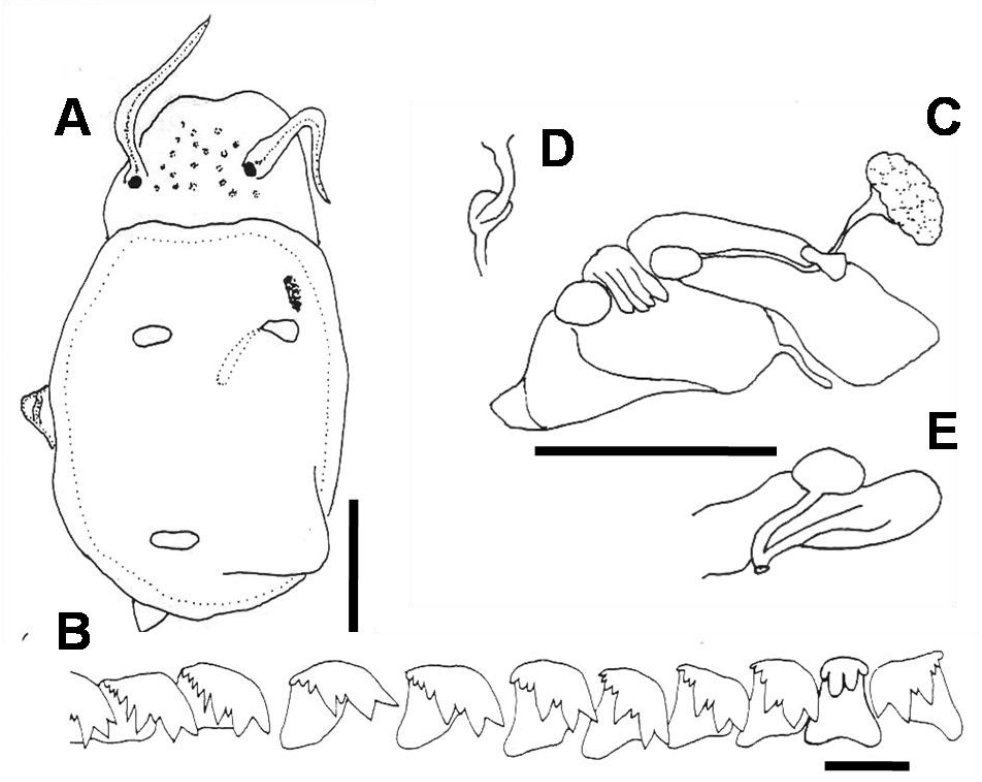
Morfologia interna: em relação à morfologia interna observamos a rádula (Figura 49) e o sistema reprodutor (Figura 49C-E).

Gundlachia saulcyana apresenta as cúspides principais do dente raquidiano assimétricas, curtas e truncadas. O dente raquidiano tem quatro cúspides no total, a placa basal tem forma trapezoidal e curta (Figura 49B); a cúspide principal esquerda é em torno de 1/3 mais comprida e de mesma espessura da direita, com uma cúspide acessória de cada lado. O dente lateral apresenta as cúspides principais com largura e comprimentos distintos; o mesocone é mais largo e longo do que os demais e tem só uma cúspide acessória entre o endocone e o ectocone (Figura 49B), enquanto que o número de cúspides acessórias externas ao ectocone pode variar de três, nos dentes mais próximos do central a quatro nos mais afastados (Figura 49B). O dente marginal é multicuspidado, com 11 cúspides, segundo Santos (1995). A fórmula radular da espécie variou de 15-1-15 a 16-1-16.

O **sistema reprodutor** possui a forma geral do ovoteste semi-esférica, com ácinos arredondados e de diâmetros semelhantes (Figura 49C). O ovoteste apresentou 14 divertículos (Figura 49C), mas pode variar de 14 a 20, segundo Santos (1995). A vesícula seminal está localizada próximo ao ovoteste, é achatada, com formato triangular e não apresenta divertículos (Figura 49D). A glândula nidamental tem a forma alongada, tendo a região mediana quase da mesma largura do que as extremidades. O útero apresenta-se arredondado na região anterior (Figura 49E); o apêndice terminal do útero é longo e com a extremidade afilada (Figura 49C). A

espermateca tem forma arredondada e o seu duto tem a mesma espessura da vagina (Figura 49E).

Figura 49 - Morfologia externa e interna da parte mole de *Gundlachia saulcyana* (Bourguignat, 1853), coletada em Penedo, Rio de Janeiro.



Legenda: **(A)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando as três impressões musculares (MAD e MAE elípticos e o MPE alongado); pigmentação com poucas manchas na região anterior; tentáculos longos; balpo bífido e extremidade posterior alongada. **(B)** Vista dorsal de meia fileira da rádula, mostrando os dentes centrais, laterais e marginais. Os dentes centrais são assimétricos, com uma cúspides acessórias de cada lado das duas cúspides principais, curtas e truncadas. O dente lateral apresenta o mesocone mais largo, longo e com uma cúspide acessória entre o endocone e o ectocone; dentes marginais com nove cúspides. **(C)** Sistema reprodutor, evidenciando ovoteste com 14 ácinos; vesícula seminal triangular e sem divertículos; próstata com quatro folículos e apêndice terminal do útero longo e fino. **(D)** Detalhe da vesícula seminal sem folículos. **(E)** Destaca a espermateca arredondada e o seu duto da mesma espessura da vagina. Escala = 1mm.
Fonte: Ilustrações retiradas de Santos, 1995: figs. 80, 82a,b e 84.

Distribuição geográfica: Venezuela: Arredores de Porto-Cabello, Caripe (Estado Monagas) e no rio San Juan (próximo de "San Juan de los Morros", Estado Guarido) e Brasil: Bahia (Uruçuca e Itabuna) e Rio de Janeiro (Penedo).

Hubendick (1964, 1967) registrou espécimes em Caripe (Estado Monagas) e no rio San Juan (próximo de "San Juan de los Morros", Estado Guarido) ambos na Venezuela. Ao consideramos que os dois registros dados por Hubendick são de fato *G.*

saulcyana, ampliamos a distribuição geográfica desta espécie para outras bacias hidrográficas na Venezuela, pois a localidade de "San Juan de los Morros" dista em torno de 160 km da localidade-tipo e o rio San Juan percorre uma distância de aproximadamente 30 Km até desaguar no reservatório de Camatagua, a oeste da região da localidade-tipo. O outro registro fica ainda mais a oeste distando aproximadamente 500 km de Porto Cabello. Portanto, as formas atribuídas a *G. saulcyana* ocorrem em bacias distintas na Venezuela; o registro assinalado por Santos (1995, 2003) para o município de Penedo, Rio de Janeiro, Brasil (UERJ 46) embora atribuídos a essa espécie, necessitam confirmação.

Comentários: as ilustrações feitas por Bourguignat (1853: figs. 26-33), observamos que em vista lateral, existem projeções do perióstraco (Figura 45B) que lembram os pelos periostracais observadas em *U. concentricus* (Santos, 2003: 52d).

Hubendick (1964: figs. 44-46, 49-53 e 55) ilustrou a morfologia externa, em vista dorsal e lateral direita, e o sistema reprodutor de espécimes atribuídos por ele a *A. saulcyanus*, coletados na Venezuela (Caripe, Estado Monagas), alocando no gênero *Anisancylus*. Esta atitude foi tomada, provavelmente, baseada na descrição da morfologia do ápice da concha para o gênero *Anisancylus* dada por Pilsbry (1924), que se caracteriza por ser fortemente inclinada para direita e para trás. O equívoco de Hubendick (1964) foi utilizar a concha de *A. obliquus* (= *Ancylus gayanus*, fig. 42) e a parte mole de *G. saulcyana* (*Ancylus saulcyanus*). *Anisancylus obliquus* foi sinonimizada por Ohweiler e Lanzer (1993) e se trata de uma espécie válida de *Anisancylus*, a qual se diferencia de *Gundlachia* por ter o ápice voltado para trás, além de outras diferenças morfológicas atribuídas, mais tarde, por Santos (1995). Portanto, a sinonímia de Hubendick (1964) para *Anisancylus* não é valida.

Pouco tempo depois, Hubendick (1967) alocou *G. saulcyana* na lista sinonímica de *G. radiata*. Ele utilizou para isso conchas de *saulcyanus* depositados no GNM, coletadas no rio San Juan, próximo de "San Juan de los Morros", Guarido, Venezuela (que dista em torno de 160 km da localidade-tipo). Essa sinonímia, provavelmente foi baseada em dois principais fatos: o primeiro está pautado na decisão de Hubendick (1967) de colocar todos os táxons nominais que eram alocados nos gêneros *Anisancylus*, *Hebetancylus* e *Uncancylus* dentro de *Gundlachia*, por considerar que se tratava de diferenças interespecíficas (Santos 1995). O segundo fato está baseado na análise das ilustrações de Hubendick (1967: fig. 152 e 153), onde se observa que há um desvio do

ápice para direita, mas não para trás reforçando que não se trata de uma espécie do gênero *Anisancylus*. Entretanto, há linhas radiais na região anterior da teleoconcha, que pode tê-lo influenciado na decisão de alocá-la como sinônimo de *G. radiata*.

Conforme já citado, Santos (1995) discordou das proposições de Hubendick (1964, 1967) evidenciando as diferenças morfológicas observadas entre os gêneros *Gundlachia* e *Anisancylus*, como por exemplo, a forma da concha (ápice), as áreas adesivas (alongada e em forma de "V") e o sistema reprodutor (vesícula seminal, forma foliculosa ou sacular; e número de folículos no ovoteste). Nesse trabalho, Santos criou um novo gênero *Marcancylus nomem nudum*, onde alocou *G. saulcyana*, baseada principalmente em caracteres relacionados ao sistema reprodutor dado a sua importância taxonômica, a saber: flagelo curto e vesícula seminal situado no terço intermediário do ovispermoduto (Santos, 1995: fig. 82). Todavia, a ilustração apresentada para a posição da vesícula seminal pode ser interpretada como posicionada na porção proximal, conforme a figura 82b sugere. Apesar de Santos (1995) não figurar o flagelo para essa espécie, podemos verificar que o flagelo é em torno de três vezes o comprimento do prepúcio, segundo a ilustração de Hubendick (1967: fig. 55), considerado longo neste trabalho.

Segundo Santos (2003), alguns exemplares coletados por ela no Estado da Bahia (UERJ 14, 15, 16) se enquadraram na descrição fornecida por Hubendick (1964, 1967). É importante ressaltar que entre a Bahia (Brasil) e Porto-Cabelo (Venezuela) existe uma grande lacuna geográfica, sendo necessária mais informações.

Reanalisamos o lote estudado por Santos em 1995 (UERJ 46), ampliando as informações morfológicas sobre a concha com imagens de MEV e utilizamos as informações sobre a morfologia externa e interna das partes moles fornecidas por Hubendick (1964, 1967) para compararmos com as demais espécies de *Gundlachia*.

Portanto, baseados em dados morfológicos apresentados, consideramos *G. saulcyana* uma espécie válida.

4.2.1.7 *Gundlachia* n. sp. 1

(Figuras 50-54)

Material tipo: a serem definidos na publicação.

Localidade-tipo: rio Juruá, Cruzeiro do Sul, Acre.

Material examinado: Brasil, *Acre*: Cruzeiro do Sul (Rio Juruá, 7.646952°S, -72.674954°O), 80 animais (80 conchas e 80 partes moles), 11.VII.2013, (UERJ 10407), col. S.B. Santos, M.A. Fernandez e S. Thiengo.

Diagnose: impressão muscular anterior esquerda arredondada; de 18 a 21 lamelas no lobo ventral da pseudobrânquia; placa basal do dente raquidiano longa; largura diferente das três cúspides principais do dente lateral, tendo o mesocone com o dobro da largura dos demais; ventrículo tem o triplo da largura do átrio e a porção terminal do sistema excretor é paralela a borda do manto.

Descrição da concha de *Gundlachia* n. sp. 1: As 29 conchas mensuradas são relativamente grandes (< 5mm), apesar de algumas, quatro conchas, terem ultrapassado essa dimensão, variando de 1,31 a 8,44 mm de comprimento. A análise descritiva básica e os índices morfométricos de *Gundlachia* n. sp. 1 encontram-se na Tabela 5.

As dimensões variaram de 1,31 x 0,92 x 0,75 x 0,35 até 8,44 x 5,63 x 5,40 x 1,79 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Seus índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,68; L2/C= 0,62; A/C= 0,22; A/L1= 0,32 e L2/L1= 0,91 (Tabela 5). Segundo os índices morfométricos *Gundlachia* n. sp. 1 possui de uma concha baixa (A/C= 0,22) e estreita (A/L1= 0,32).

Em vista dorsal, observamos que a forma da abertura da concha é elíptica, ápice arredondado e projetado entre a linha mediana e a borda direita da concha (Figura 50A). Em alguns exemplares a abertura da concha apresenta-se com a região mediana mais larga, diferindo das populações do chamado complexo *G. radiata* (Figura 51A), as quais as bordas são paralelas.

A protoconcha é arredondada e com escultura, ela é representada por três regiões, uma com pontuações irregulares profundas e bem evidentes, que ocupam 3/4

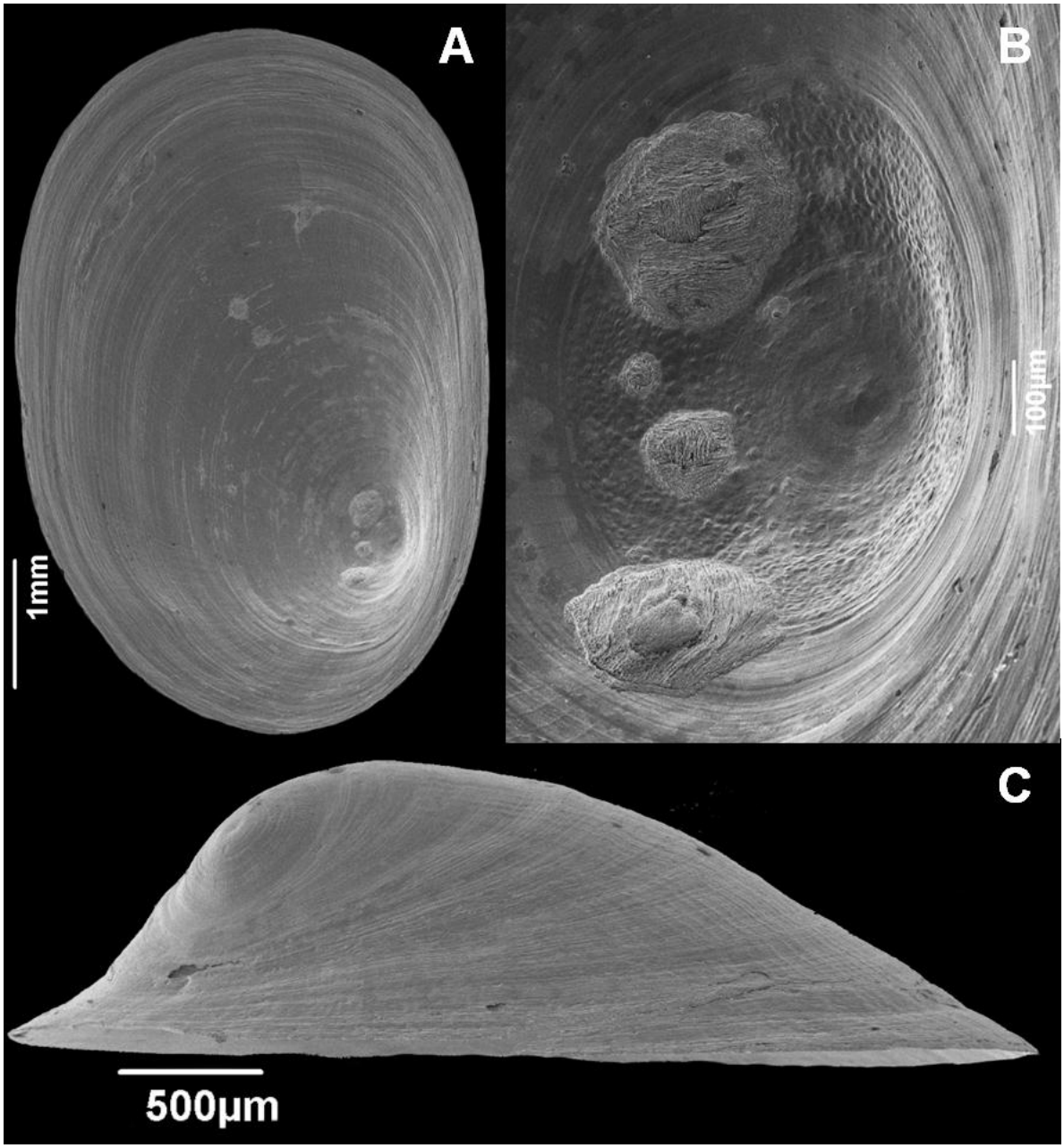
(75%) do comprimento total da protoconcha, seguida por uma área lisa, que ocupa (15%) e por uma depressão apical ampla e profunda (10%) (Figura 50B).

A teleoconcha possui linhas de crescimento concêntricas em toda a superfície (Figura 50), podendo apresentar tênues linhas radiais, principalmente na região anterior da teleoconcha (Figura 50C e 51B). A coloração do perióstraco variou entre amarelo avermelhado (*Oliver-Ocher*) a marfim (*Olive-Buff*). Não observamos projeções no perióstraco em nenhuma das conchas analisadas.

Em vista lateral (Figura 50C), destacamos duas regiões da concha: uma dorsal, côncava e com tênues ondulações relacionadas às linhas de crescimento; e outra convexa, que pode ser observada na região posterior.

A concha baixa, o ápice mais projetado e recurvado para direita, posicionando-se entre a linha mediana e a margem direita da concha, a protoconcha com pontuações profundas e sua depressão apical ampla e rasa são caracteres da concha, que podem auxiliar na identificação de *Gundlachia* n. sp. 1. Apesar de não serem exclusivos, pois alguns caracteres como, por exemplo, o ápice recurvado é projetado entre as linha mediana e a margem da concha ou então a depressão apical ampla e rasa que é compartilhada com algumas populações do complexo *G. radiata*, mas diferem quanto ao posicionamento do ápice que é mais centralizado em *G. radiata*. Esses dados associados aos caracteres das partes moles não deixaram dúvidas sobre a distinção desse táxon, para a sua devida descrição formal.

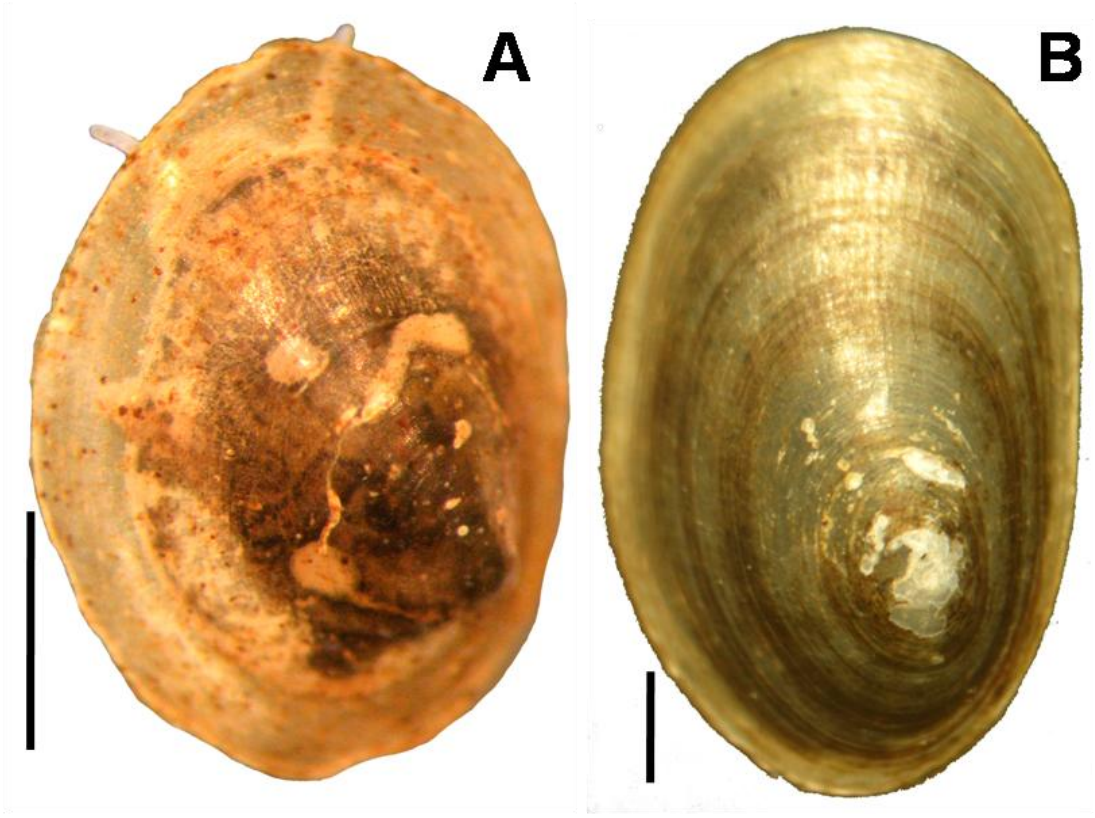
Figura 50 - Morfologia externa da concha de *Gundlachia* n. sp. 1.



Legenda: **(A)** Vista dorsal da concha, coletada (UERJ 10407), evidenciando a abertura da concha elíptica e o ápice projetado entre a linha mediana e a borda direita da concha. **(B)** detalhe da microescultura apical, em vista dorsal, apresentando um faixa de pontuações irregulares, profunda e bem evidentes, que ocupam 75% da protoconcha, seguida por uma área lisa (25%) e depressão apical ampla e profunda (25%). **(C)** Vista lateral, evidenciando as linhas de crescimento concêntrico e linhas radiais tênues na região anterior da teleoconcha. Escala = 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 51 - Morfologia da concha e variação de coloração de *Gundlachia* n. sp. 1.



Legenda: **(A)** Animal em vista dorsal (concha e parte mole), representando a coloração do perióstraco amarelo avermelhado (*Oliver-Ocher*) demonstrando o ápice mais projetado e recurvado para direita. Além das impressões musculares sob a concha. **(B)** concha em vista dorsal, evidenciando a cor marrom escuro (*Ecru Olive*) do perióstraco e a presença de linhas radiais na região anterior da teleoconcha. Ambas as figuras do lote (10407). Escala = 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

Morfologia externa (Figura 52): os tentáculos são longos (Figura 52), do mesmo comprimento da distância interocular e o palpo oral é bífido (Figura 52A-D), apesar de ser menos evidente do que as demais espécies congenéricas.

Gundlachia n. sp. 1 possui três impressões musculares, sendo a anterior direita elíptica, com uma área adesiva alongada na região interna, que pode estar mais afastada (Figura 52A) ou contigua com o MAD (Figura 52C); a anterior esquerda e a posterior arredondadas, podendo o MP ser, em torno de 1/5 menor do que o MAE (Figura 52A e C).

Em relação à pigmentação no teto do manto observamos três padrões: um intermediário, com manchas esparsas em todo o teto do manto, que representou 37,5% do lote (Figura 52C); um forte, com toda a superfície do manto coberta, com mesma representatividade do anterior e um fraco, que tem uma mancha ao lado do MAD e outra na região posterior, além de algumas pequenas manchas esparsas, com um pouco menos 28,75% do lote. O padrão fraco foi semelhante ao figurado por Lacerda et al. (2013: fig. 4C), porém os demais são distintos.

Em vista ventral, observamos que a forma do pé é alongada e a extremidade posterior do pé é arredondada (Figura 50B e D).

A pseudobrânquia possui dois lobos, um lobo dorsal é 1/3 menor do que a largura lobo ventral, com 12 a 15 lamelas, enquanto o ventral variou de 18 a 21 lamelas (Figura 50E).

Morfologia interna (Figura 53 e 54): em relação à morfologia interna observamos a rádula (Figura 52), o restante do sistema digestório (Figura 53A-C), o sistema excretor (Figura 53D), o sistema reprodutor (Figura 53E-H) e o sistema nervoso (Figura 53I-J).

Gundlachia n. sp. 1 apresenta as cúspides principais do dente raquidiano assimétricas, curtas, atingindo 1/3 da altura da placa basal e afiladas. O dente raquidiano tem de quatro a cinco cúspides no total; a placa basal tem forma trapezoidal, e curta com a base 1/3 menor do que a altura (Figura 52A); além disso, a cúspide principal esquerda possui o dobro do comprimento da direita, podendo apresentar uma ou duas cúspides acessórias do seu lado e mais uma entre as duas cúspides principais (Figura 52A). O dente lateral apresenta as cúspides principais com largura e comprimentos distintos; o mesocone é mais largo (o dobro) e longo do que os demais e tem só uma cúspide acessória entre o endocone e o ectocone (Figura 52B), enquanto que o número

de cúspides acessórias externas ao ectocone pode variar de duas a três. O dente marginal é multicuspidado, apresentando 11 cúspides (Figura 52C), tendo as três cúspides principais bem evidentes e com o dobro da largura das cúspides acessórias. A fórmula radular da espécie é 17-1-17.

O sistema digestório (Figura 53A-C) apresentou o bulbo bucal com forma alongada; a glândula salivar longa, pois a parte que ultrapassa atinge a metade do comprimento do bulbo; e com o diâmetro constante (Figura 53A e B); o saco radular curto, pois não ultrapassa o bulbo bucal (Figura 53B); o estômago é diferenciado, semelhante aos demais Ancylinae, e formado por duas porções: uma região muscular e uma região pilórica que possuem proporções iguais no estômago; o ceco é curto, pois não ultrapassa a metade da largura da região muscular do estômago (Figura 53C).

O sistema excretor está localizado próximo à borda do manto, com forma geral sinuosa, em relação à borda do manto e as extremidades dessa estrutura forma a figura de um triângulo equilátero, que também foi utilizada na descrição do órgão. A porção proximal desse sistema é glandular, apesar de pouco evidente, com forma sinuosa, pois após a primeira mudança de sentido, para a região anterior do corpo do animal, há sinuosidade (Figura 53D). O ventrículo, com forma retangular, é completamente justaposto ao rim e tem o triplo do comprimento do átrio que tem a forma triangular (Figura 53D). A porção terminal do sistema excretor é paralela a borda do manto e ultrapassa a porção glandular. O poro excretor localiza-se na extremidade da porção terminal, o restante das estruturas possui a mesma topologia.

O sistema reprodutor possui a forma geral do ovoteste semi-esférica, com ácinos arredondados e de diâmetros semelhantes. O número de divertículos no ovoteste variou de 29 a 35 (Figura 53E). A vesícula seminal esta localizada próximo ao ovoteste e apresenta cinco divertículos, pouco projetados (Figura 53E-G); sua largura alcança o triplo da largura do ovispermoduto. A glândula de albúmen apresenta textura heterogênea, com largura 1/3 menor, em vista dorsal, do que a da glândula nidamental, que tem a forma alongada. Essa glândula tem o comprimento três vezes maior do que a largura e a extremidade anterior arredondada e a posterior aguda; a superfície dessa estrutura tem uma textura homogênea e de aspecto acinoso (Figura 53E). O útero apresenta-se arredondado na região anterior (Figura 53F); o apêndice terminal do útero é curto, em torno de 1/3 da largura da glândula nidamental (Figura 53F) e fino, pois tem a mesma largura do ovispermoduto. A espermateca tem forma arredondada e o seu duto tem a mesma espessura da vagina (Figura 53F). A próstata tem sete folículos evidentes

(Figura 53F) e em vista ventral observam-se os folículos da próstata flexionados, como se fossem dedos voltados sobre a palma das mãos, conforme descrito e figurado por Santos (2003: fig. 27) para outra espécie de *Gundlachia*. O complexo ejaculatório possui flagelo longo, aproximadamente o dobro do comprimento do prepúcio. O prepúcio é grosso, com largura variando de 1/3 a 1/5 do seu comprimento (Figura 53H).

O sistema nervoso apresentou, em vista dorsal, a comissura cerebral visível e espessa, pois a sua largura é quase a metade da largura do gânglio cerebral. A forma da porção intermediária do protocérebro é convexa e os nervos, tentacular, peritentacular externo e óptico, são próximos e partem da região anterior do gânglio cerebral (Figura 53I). Além disso, observa-se o gânglio pleural, parietal e abdominal, bem evidentes e menores do que o cerebral, posicionado mais anteriormente no anel circum-esofágico. Em vista ventral, os gânglios pediosos são da mesma largura do que os gânglios cerebrais e estão unidos por uma comissura pediosa curta, pois os gânglios pediosos são tão próximos que não se observa a comissura (Figura 53J).

Distribuição geográfica: a distribuição de *Gundlachia* n. sp.1 está restrita ao lote examinado. Em relação ao hábitat esses espécimes foram coletados aderidos em folhas e galhos próximos a margem.

Considerações: o novo táxon foi incluído no gênero *Gundlachia* pelas seguintes razões: a concha apresenta protoconcha com pontuações irregulares e sem linhas radiais; teleoconcha pode ter ou não linhas radiais e dente central da rádula assimétrico, sendo estes os principais caracteres de diagnose de *Gundlachia* segundo diversos autores (Pfeiffer 1849; Walker 1923; Marcus e Marcus 1962; Hubendick 1964, 1967; Lanzer 1996; Santos 1995, 2003; Lacerda et al. 2011; Ovando et al. 2014). Além disso, os fascículos musculares do músculo anterior direito são cruzados (Figura 52D), o que de acordo com a descrição de Santos (2003), caracteriza o gênero *Gundlachia.* O novo táxon está incluso, segundo as nossas análises, dentro do clado *Gundlachia* formado com base na morfologia comparada com os outros gêneros de Ancylinae (Figura 64) e molecular (Figura 68, 69; tabela 7).

Gundlachia n. sp.1 difere de *G. bakeri, G. leucaspis, G. lutzi, G. ticaga e G. saulcyana* e *Gundlachia* n. sp. 2 por possuir uma depressão apical ampla e rasa; e uma concha baixa, enquanto as demais espécies a depressão apical é profunda e rasa e a concha alta.

Enquanto o novo táxon apresenta linhas radiais tênues na teleoconcha, assim como em *G. ticaga* e *G. radiata*; este difere das demais espécies congenéricas por estar ausente.

Em relação às partes moles *Gundlachia* n. sp. 1 apresenta entre 18 a 21 lamelas no lobo ventral da pseudobrânquia, enquanto que em *G. radiata* variou de quatro a 12. Nas demais espécies, apesar de variar o número de lamelas, apresentaram sempre menos de seis. Segundo a análise cladística esse caráter foi apontado como uma autapomórfia, assim como a placa basal longa, as cúspides principais do dente lateral da rádula com larguras distintas; ventrículo com o triplo do comprimento do átrio e a porção terminal do sistema excretor paralela a borda do manto.

Difere de *G. lutzi* e *Gundlachia* n. sp. 2 por possuir os tentáculos longos, enquanto as duas espécies são curtos.

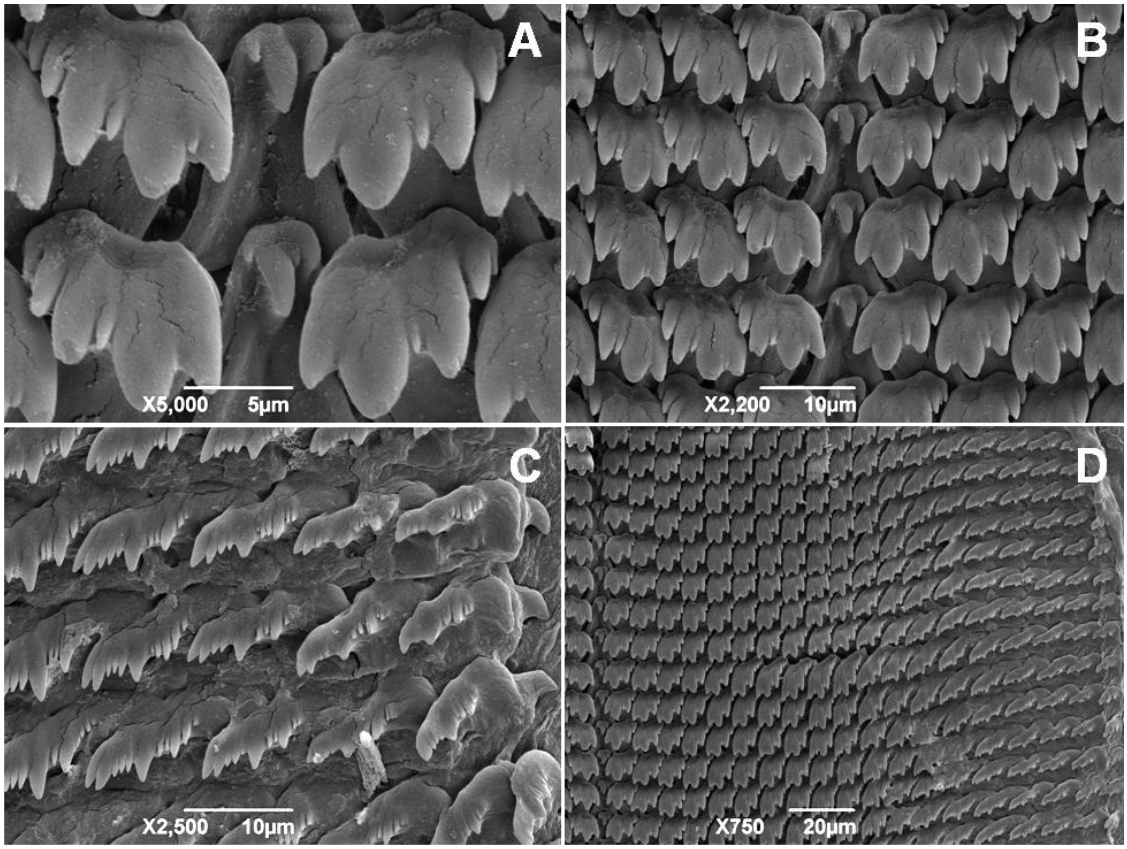
Difere de *G. radiata* em relação ao apêndice terminal do útero, que é curto no novo táxon e longo em *G. radiata*. *G. ticaga* apresenta também um apêndice curto, porém nela o apêndice alcança a metade da largura da glândula nidamental, em contrapartida no novo táxon só alcança, no máximo, 1/3 da largura.

Nossas observações apontam para uma grande semelhança entre a descrição de *G. radiata* (Guilding, 1828) fornecida por distintos pesquisadores (Harrison 1983; Lanzer 1996; Santos 1995, 2003; Ovando et al. 2011; Lacerda et al. 2013; Ovando et al. 2014) e *Gundlachia* n. sp. 1 encontrada no rio Juruá no Acre (UERJ 10407), para a morfologia das conchas e das partes moles. Porém, apesar de ambas as espécies apresentarem pontuações irregulares que ocupam mais da metade da protoconcha, *G. radiata* (Figura 16A-C) difere por ter o ápice mais próximo da linha mediana da concha, enquanto que *Gundlachia* n. sp. 1 fica entre a linha mediana e a margem direita (Figura 50A). Diferem, também em relação à forma e ao número de estruturas internas do sistema reprodutor, como por exemplo, o apêndice terminal do útero. *Gundlachia* n. sp. 1 se mostra curto, já em *G. radiata* é longo (Figura 23A), ambos não apresentam a extremidade dilatada, diferindo de *G. ticaga* que é curto, porém com a extremidade dilatada (Marcus e Marcus 1962; Santos 1995, 2003) (Figura 45F).

Dentre as espécies de *Gundlachia* o novo táxon apresenta um maior número de divergências entre as seguintes espécies: *G. bakeri, G. lutzi, G. leucaspis, G. ticaga* e *Gundlachia* n. sp. 2, tanto com base em caracteres morfológicos (Figura 63) quanto com base em dados moleculares (Figura 68 e 69; tabela 7), exceto para *Gundlachia* n. sp. 2 que não foi avaliada sob a visão molecular. Enquanto que comparada com *G. radiata*, o

número de caracteres morfológicos que as diferencia é reduzido, assim como a divergência genética entre essas duas espécies. Contudo, *Gundlachia* n. sp. 1 apresentou sete caracteres autapomórficos, apresentados na diagnose da espécie, que servirão de base para a publicação formal do novo táxon. Apesar da divergência genética do gene COI do mtDNA, ter sido menor entre o novo táxon e o complexo de *Gundlachia radiata*, em média (1,5%, tabela 7) em relação as demais espécies congenéricas (8,3 a 10%); a divergência genética observada entre as distintas populações de *G. radiata* (Bahia, Rio de Janeiro, Mato Grosso) divergiram somente (0,3%). Portanto, o novo táxon além das diferenças morfológicas, diverge geneticamente das demais espécies de *Gundlachia*, o que sustenta a sua definição e distinção de outros táxons congenéricos.

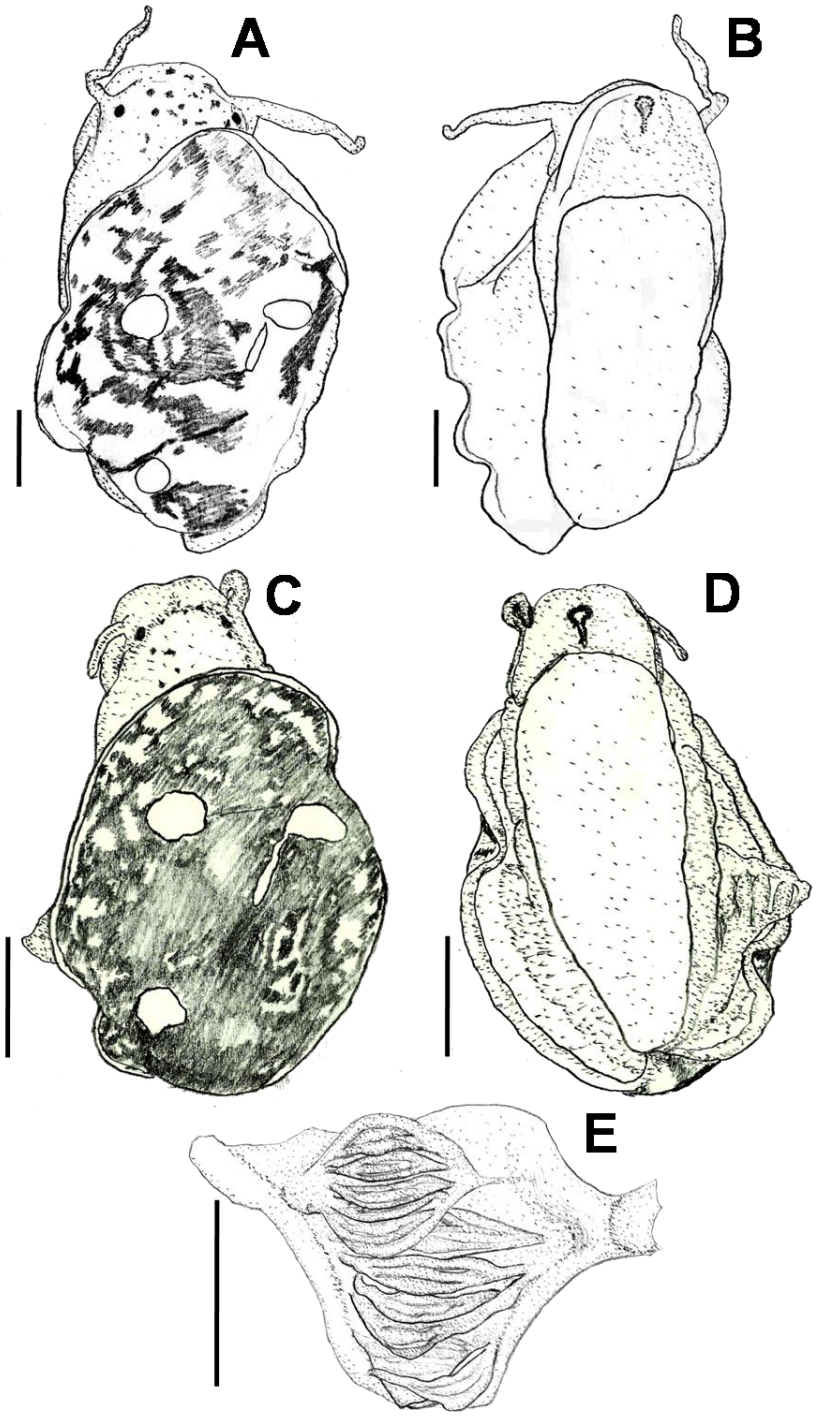
Figura 52 - Morfologia da rádula de *Gundlachia* n. sp. 1.



Legenda: **(A)** Vista dorsal da região mediana da rádula, mostrando os dentes centrais e laterais. As cúspides principais são assimétricas, curtas e afiladas, sendo a esquerda o dobro da direita. A placa basal é trapezoidal e longa. **(B)** Dentes laterais apresentam as três cúspides principais com tamanhos diferentes, sendo o mesocone o mais largo e mais longo. **(C)** Os dentes marginais são multicuspidados, apresentando 11 cúspides sendo as três cúspides principais visíveis até a borda da rádula. (A-D) rio Juruá, Cruzeiro do Sul, Acre (UERJ 10407).

Fonte: O autor, 2015.

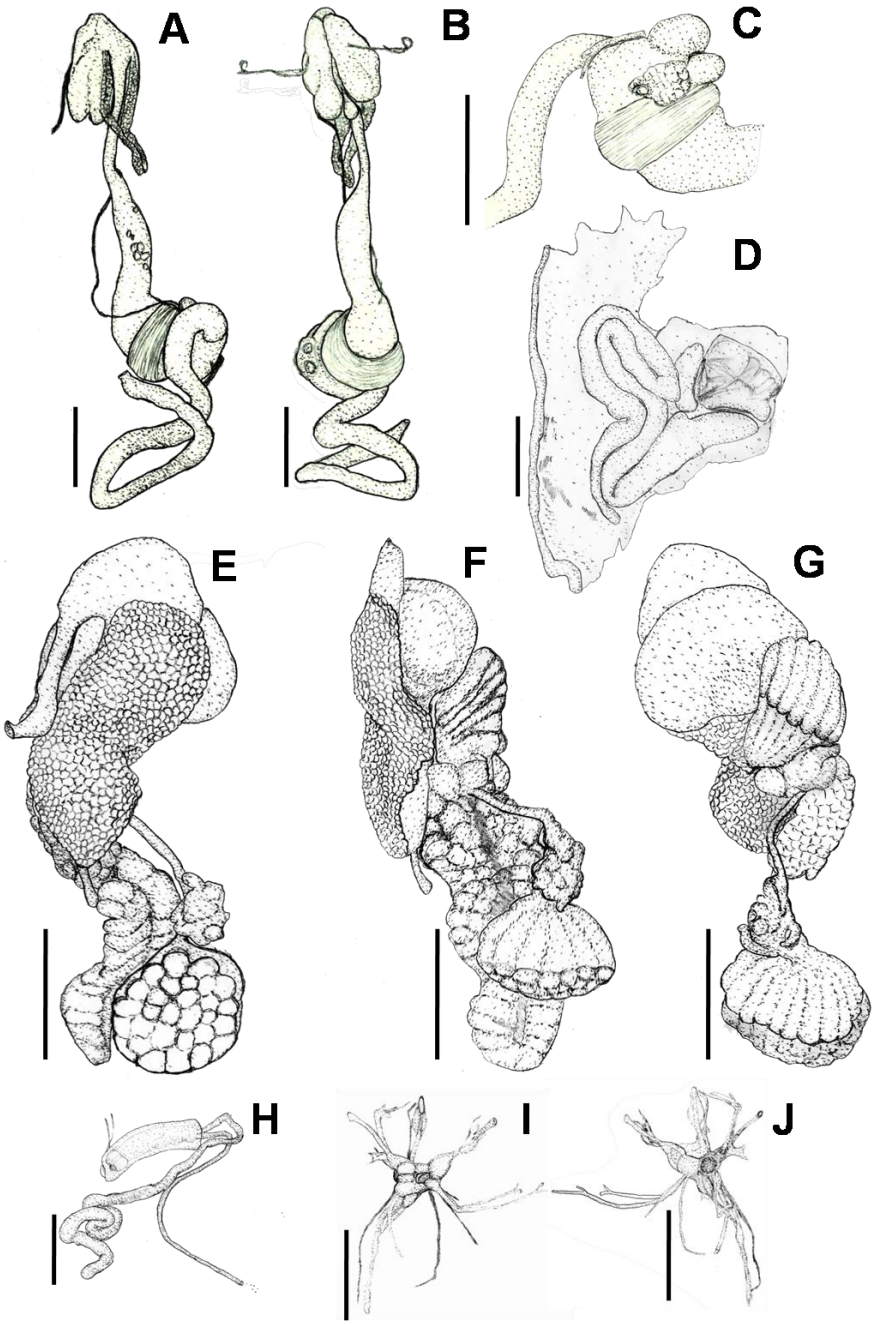
Figura 53 - Morfologia externa das partes moles de *Gundlachia* n. sp. 1.



Legenda: **(A)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando as três impressões musculares, sendo a MAD elíptico e MPE e a MAE alongadas; e a pigmentação, concentrada na região central do teto do manto (Padrão intermediário). **(B)** Vista ventral da parte mole, evidenciando a forma alongada do pé e a extremidade arredondada. **(C)** Vista dorsal do teto do manto, evidencia o MAD elíptico e com uma área adesiva alongada contigua na sua região interna; pigmentação concentrada em todo o teto do manto (Padrão forte). **(D)** Vista ventral da parte mole, evidenciando a forma alongada do pé e a extremidade afilada. **(E)** Pseudobrânquia, com o lobo dorsal com 15 lamelas e o ventral $1^{1/2}$ maior do que o dorsal, com 18 lamelas. (A-E) rio Juruá, Cruzeiro do Sul, Acre (UERJ 10407). Escala= 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 54 - Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia* n. sp. 1



Legenda: **(A-C)** Sistema digestório. **(A-B)** Vista dorsal e ventral, respectivamente, evidenciando bulbo bucal alongado, glândula salivar longa e regular, esôfago com a largura menor do que a do bulbo, estômago e intestino. Glândula digestiva, removida. **(C)** Vista lateral do estômago, evidenciando a região muscular, a pilórica e o ceco curto. **(D)** Vista dorsal do sistema excretor, evidenciando a forma sinuosa e o ventrículo com o triplo do comprimento do átrio. **(E-G)** sistema reprodutor; **(E)** Vista dorsal evidencia a glândula nidamental alongada, região anterior do útero arredondada e seu apêndice terminal curto e ovoteste com 29 ácinos; **(F)** Vista lateral-esquerda, evidencia a vesícula seminal com cinco divertículos; **(G)** Vista ventral, a forma e os sete folículos da próstata; e a espermateca. **(H)** Complexo peniano com flagelo longo, aproximadamente o dobro do comprimento do prepúcio. **(I)** Vista dorsal do sistema nervoso, evidenciando, a comissura cerebral espessa e os o gânglio pleural, parietal e abdominal, bem evidentes e menores do que o cerebral, posicionado mais anteriormente no anel circum-esofágico. (**J)** evidenciando os gânglios e comissura pediosa curta. Escala= 1,0 mm. (A-J) rio Juruá, Cruzeiro do Sul, Acre (UERJ 10407).

Fonte: O autor, 2015.

4.2.1.8 *Gundlachia* n. sp. 2

(Figuras 55-59)

Tipos: A serem definidos na publicação.

Localidade-tipo: A ser definida na publicação.

Lista sinonímica:

Gundlachia sp.: Thiengo et al. 2002: 622—Thiengo et al. 2004: 275—Thiengo et al. 2006: 239—Santos et al. 2010: 512.

Material estudado: Brasil, *Rio de Janeiro*: Angra dos Reis (Frade) 03 conchas, 30.X.2001, (FIOCRUZ s/nº); (Jacuecanga) 02 conchas, 02 animais dissecados, 24.IX.2001, (FIOCRUZ s/nº); (Praia do Bananal) 05 conchas, 01 animal dissecado, 07.IX.2007, (UERJ 7115); Parati (Parati-Mirim) 06 conchas, 03 animais dissecados, 30.X.01, (FIOCRUZ s/nº); Rio das Ostras, 01 concha, 01 animal dissecado, 20.IX.99, (FIOCRUZ s/nº), 02 conchas, 20.IX.99, (FIOCRUZ s/nº); Macaé (Macaé) 06 conchas, 20.IX.99, (FIOCRUZ s/nº); Campos dos Goytacazes (Dores de Macabu), 01 concha, 03 animais dissecados, 14.X.02, col. Fernandez, M.A., Mattos, A.C. e Santos, T.L.C., (FIOCRUZ s/nº); (Vila Rosa) 03 animais, 09.IX.02, col. Boaventura, M.F., e Mattos, A.C., (FIOCRUZ s/nº); Cambuci (Monte Verde) 04 conchas, 01 animal dissecado, 21.VI.04, (FIOCRUZ s/nº), (Cruzeiro) 16 conchas, 01 animal dissecado, 21.VI.04, col. Fernandez, M.A., Loureiro, M.S. e Azevedo, M.P., (FIOCRUZ s/nº); Itaperuna (Boaventura) 03 conchas, 17.V.2004, (FIOCRUZ s/nº), (Nossa Senhora da Penha) 01 concha, 08.XI.2004, (FIOCRUZ s/nº), (Rosal) 01 animal dissecado, 09.VIII.04, col. Fernandez, M.A., Mattos, A.C. e Loureiro, M.S., (FIOCRUZ s/nº); Miguel Pereira (Miguel Pereira) 06 conchas, 01 animal dissecado, 21.V.1998-1, (FIOCRUZ s/nº), 02 conchas, 04.VI.1998-, sendo que uma foi feita M.E.V., (FIOCRUZ s/nº), 06 conchas, (CMIOC/Fiocruz 4500); Vassouras (Vassouras) 13 conchas, 27 animais sendo um dissecado, 22.VI.99, (FIOCRUZ s/nº); Magé (Magé) 08 conchas, 17.IX.2002, (FIOCRUZ s/nº); Santa Maria Madalena (Sossêgo) 18 conchas, 23 animais dissecados, 16 a 18.X.00, (FIOCRUZ s/nº); Cantagalo (S. S. do Paraíba) 01 concha, 17.X.00, (FIOCRUZ s/nº); Trajano de Moraes (Santo Antônio do Imbé) 01 concha, 18.X.00, (FIOCRUZ s/nº), (Sodrelândia) 01 concha, 24.IV.2000, (FIOCRUZ s/nº), (Trajano de

Moraes) 01 concha, 25.IX.2000, (FIOCRUZ s/nº); Bom Jesus de Itabapoana (Rosal) 06 conchas, 01 animal dissecado, 09.VIII.2004, col. Fernandez, M.A., Mattos, A.C. e Loureiro, M.S. (FIOCRUZ s/nº); Santo Antônio de Pádua (Ibitiguaçu) 03 conchas, 13.X.2004, (FIOCRUZ s/nº). Porciúncula (Porciúncula) 06 animais dissecados, 22.XI.03, col. Fernandez, M.A., Boaventura, M.F. e Mattos, A.C., (FIOCRUZ s/nº); Natividade (Querendo) 01 animal dissecado, 09.VIII.04, (FIOCRUZ s/nº Miracema (Paraíso do Tobias) 01 animal dissecado, 24.V.03, col. Thiengo, S.C., Boaventura, M.F. e Mattos, A.C., (FIOCRUZ s/nº).

Diagnose: concha baixa com pontuações irregulares que ocupam 80% da protoconcha; impressão muscular posterior elíptica; glândula salivar com diâmetro irregular; de seis a nove ácinos no ovoteste; região anterior do útero com três projeções e apêndice terminal do útero longo e com a extremidade dilatada.

Descrição da concha de *Gundlachia* n. sp. 2: As 120 conchas mensuradas são relativamente pequenas (< 7mm) variando de 1,55 a 6,85 mm de comprimento. A análise descritiva básica e os índices morfométricos de *Gundlachia* n. sp. 2 encontram-se na tabela 5.

As dimensões variaram de 1,55 x 0,80 x 0,50 x 0,38 até 6,85 x 4,75 x 4,05 x 1,75 milímetros (mm) de comprimento, largura anterior, largura posterior e altura, respectivamente. Seus índices conquiliométricos médios foram: L1/C= 0,64; L2/C= 0,51; A/C= 0,33; A/L1= 0,52 e L2/L1= 0,80 (Tabela 5). Segundo os índices morfométricos *Gundlachia* n. sp. 2 possui de uma concha baixa (A/C= 0,33) e estreita (A/L1= 0,52).

Para verificar a variação intraespecífica das conchas de *Gundlachia* n. sp. 2 utilizamos os três municípios com o maior número de conchas, íntegras, mensuradas (Angra dos Reis = 16 conchas; Cambuci = 20 conchas e Santa Maria Madalena = 18 conchas). Essas três populações apresentaram diferença estatística significativa, segundo a Análise Discriminante (AD) (Wilks' Lambda = 0,156; df = 86; p = 0,000). Com esta análise multivariada verificamos, que apesar da diferença estatística significativa, a forma geral da concha dos lotes analisados desta espécie é semelhante, conforme veremos a seguir.

Em vista dorsal, observamos que a forma da abertura da concha é elíptica, ápice arredondado e recurvado projetando-se além do quadrante posterior direito (Figura

55A), podendo, às vezes, ultrapassar um pouco a margem direita da concha (Figura 55B), em alguns exemplares.

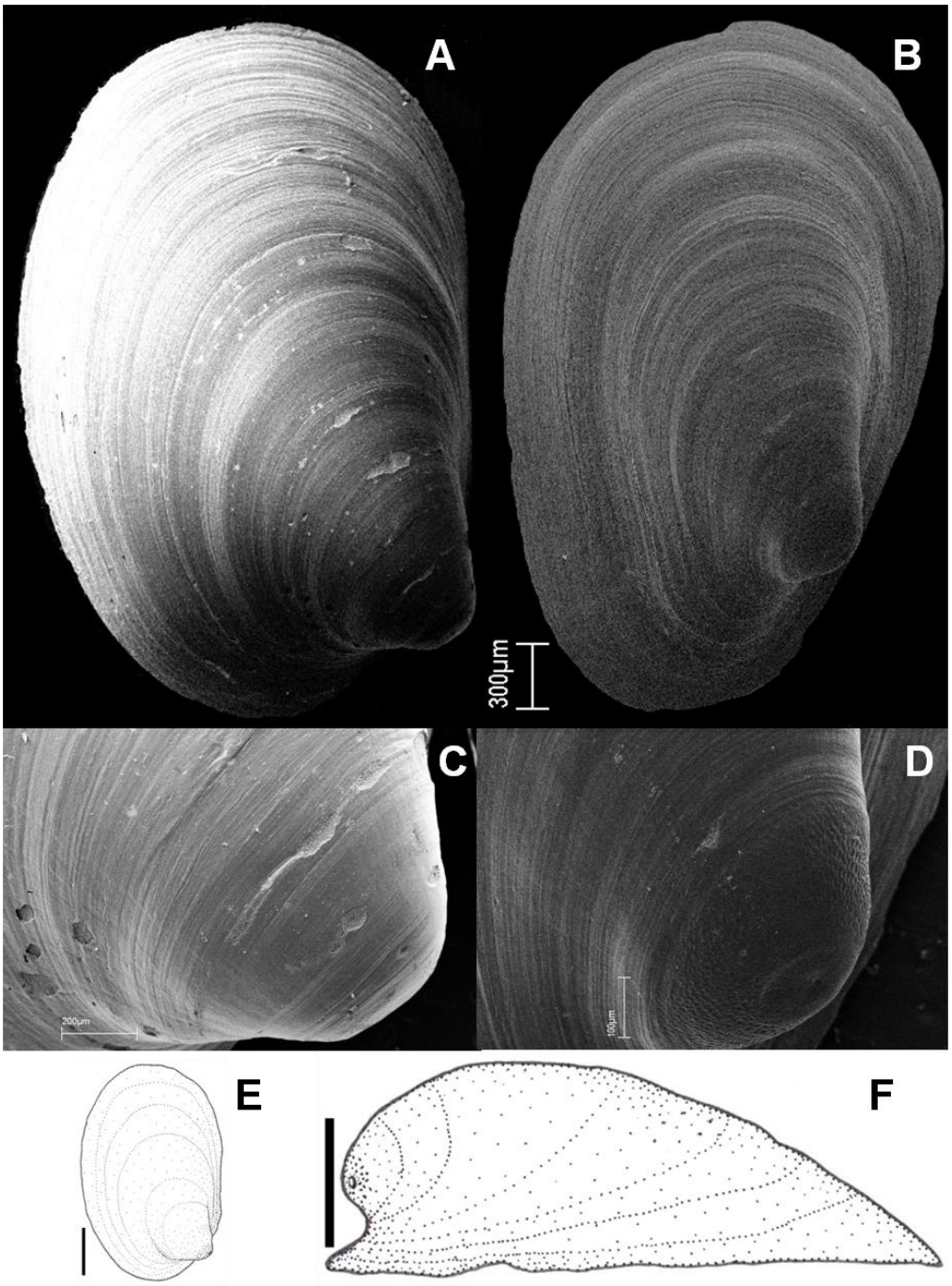
A protoconcha é arredondada e com escultura representada por uma depressão apical curta e profunda ocupando 5% da área da protoconcha, seguida por uma área lisa, que ocupa em torno de 15% da protoconcha, e uma área com pontuações irregulares profundas que ocupam em torno de 80% dela (Figura 55C e D).

A teleoconcha possui linhas de crescimento concêntricas em toda a superfície (Figura 55). A coloração do perióstraco variou de amarelo avermelhado (*Oliver-Ocher*) a marfim (*Olive-Buff*). Não observamos projeções no perióstraco em nenhuma das conchas analisadas.

Em vista lateral (Figura 55F), a região dorsal é convexa, com ondulações relacionadas às linhas de crescimento, bem evidentes; a região côncava, corresponde à região posterior. Devido ao ápice ser bem recurvado, a concavidade é mais acentuada nesta espécie do que nas demais espécies congenéricas.

O ápice bem recurvado, ultrapassando a margem direita da concha, a protoconcha com pontuações profundas e depressão apical curta e profunda são caracteres da concha, que podem auxiliar na identificação de *Gundlachia* n. sp. 2. Apesar de não serem exclusivos, pois alguns caracteres como, por exemplo, o ápice bastante recurvado é compartilhado com *G. leucaspis*. Esses dados associados aos caracteres das partes moles não deixam dúvidas sobre a distinção desse táxon, que terá a descrição formal no devido tempo.

Figura 55 - Morfologia externa da concha de *Gundlachia* n. sp. 2.



Legenda: **(A)** Vista dorsal da concha, coletada (UERJ 7115), evidenciando a abertura da concha elíptica e o ápice ultrapassando a borda. **(B)** Vista dorsal da concha, observa-se uma variação pois, o ápice ultrapassa pouco a borda da concha e a região anterior é mais alargada do que a posterior. **(C e D)** detalhe da microescultura apical, em vista dorsal, apresentando um faixa de pontuações irregulares que ocupam 80% da protoconcha, seguida por uma área lisa (15%) e depressão apical profunda e curta (5%). **(E-F)** Ilustração da concha em vista dorsal e lateral, respectivamente; evidenciando as linhas de crescimento concêntrico e o ápice bem recurvado. **(A-C)** espécime coletado na Praia do Bananal, Angra dos Reis (UERJ 7115); **(B e D)** espécime coletado no rio Cachimbau, no município de Pinheiral (Fiocruz s/n) e (**E-F)** espécime coletado município de Miguel Pereira (Fiocruz s/n). Escala = 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

Morfologia externa: os tentáculos são curtos (Figura 56A-C). O palpo oral é bífido (Figura 56A-C).

Gundlachia n. sp. 2 possui três impressões musculares, sendo a anterior direita (MAD) e posterior (MPE) elípticas e a anterior esquerda (MAE) alongada, tendo o comprimento o dobro da largura. Contudo, observamos uma pequena variação na forma das impressões musculares no Lote UERJ 7115, o qual apresentou espécimes com o MAE elíptico e não alongado (Figura 56C e D). A MPE elíptica, é apontada como um caráter autapomórfico pela análise cladística.

A maioria dos espécimes estudados apresentou a pigmentação no teto do manto concentrada na região central (Figura 56A), porém algumas populações apresentaram a pigmentação fraca e esparsa (Figura 56C).

Em vista ventral, observamos que a forma do pé é alongada e a extremidade posterior do pé é afilada (Figura 56B).

A pseudobrânquia possui dois lobos: um lobo dorsal que tem a largura 1/3 menor do que o lobo ventral e tem de três a seis lamelas, enquanto o ventral variou de quatro a oito lamelas (Figura 56E), apesar das variações no número de lamelas o tamanho relativo dos lobos foi constante podendo o lobo dorsal alcançar a proporção de até três vezes menor do que o ventral (Figura 56F).

Morfologia interna: em relação à morfologia interna observamos a rádula, sob microscopia óptica (Figura 57), o restante do sistema digestório (Figura 58A-C), o sistema excretor (Figura 58D), o sistema reprodutor (Figura 58E-I) e o sistema nervoso (Figura 58J).

Gundlachia n. sp. 2 apresenta as cúspides principais do dente raquidiano assimétricas, curtas e afiladas, porém devido a técnica utilizada não definimos o número de cúspides do dente, apesar de termos atingido um aumento de 1000X, que se mostrou insuficiente para objetivo. A placa basal tem forma trapezoidal e curta (Figura 57A). O dente lateral apresenta as cúspides principais com largura e comprimentos distintos; o endocone é mais longo do que os demais, a existência de cúspides acessórias também foi comprometida devido à técnica (Figura 57B). A figura 42B, exibe um trecho que representa meia fileira da rádula, com esta imagem podemos verificar que o dente marginal é multicuspidado, e que as três cúspides principais são visíveis até a borda da rádula. A fórmula radular da espécie é 17-1-17.

O **sistema digestório** (Figura 58A-C) apresentou o bulbo bucal com forma alongada; a glândula salivar longa e com o diâmetro irregular (Figura 58A); o saco radular curto, pois não ultrapassa o bulbo bucal (Figura 58B); o esôfago largo, da mesma largura do bulbo bucal; estômago é diferenciado, semelhante aos demais Ancylinae, e formado por duas porções: uma região muscular e uma região pilórica que possuem proporções iguais no estômago; o ceco é curto, pois alcança somente 1/3 da largura da região muscular do estômago (Figura 58C).

O **sistema excretor** está localizado próximo a borda do manto, apresenta uma forma geral sinuosa, em relação à borda do manto e com o formato de um triângulo isósceles. A porção proximal desse sistema é glandular, e bem evidente, com forma sinuosa, formando flexuras em forma de V invertido, em relação à borda do manto (Figura 58D). O ventrículo, com forma triangular, é completamente justaposto ao rim e suas dimensões são semelhantes ao do átrio (Figura 58D). A porção terminal do sistema excretor não é paralela a borda do manto e ultrapassa a porção glandular. O poro excretor localiza-se na extremidade da porção terminal, o restante das estruturas possui a mesma topologia.

O **sistema reprodutor** (Figura 58E-I) possui a forma geral do ovoteste semi-esférica, com ácinos arredondados e de diâmetros semelhantes. O número de divertículos no ovoteste variou de seis a nove (Figura 58F). A vesícula seminal está localizada próximo ao ovoteste e apresenta cinco divertículos (Figura 58H); sua largura alcança o dobro da largura do ovispermoduto. A glândula de albúmen apresenta textura heterogênea, com largura semelhante a da glândula nidamental, que tem a forma alongada. Essa glândula tem o comprimento quatro vezes maior do que a largura e a extremidade anterior arredondada e a posterior aguda; a superfície dessa estrutura tem uma textura homogênea e de aspecto glandular (Figura 58E). O útero apresenta-se modificado, com três projeções na região anterior, em relação à forma arredondada, que é observada na maioria das espécies de *Gundlachia*; o apêndice terminal do útero é longo, pois ultrapassa a largura da glândula nidamental, e com a extremidade dilatada (Figura 58E e G). A espermateca tem forma arredondada e o seu duto tem a mesma espessura da vagina (Figura 58G). A próstata tem cinco folículos evidentes. O complexo ejaculatório possui flagelo longo, aproximadamente o dobro do comprimento do prepúcio. O complexo ejaculatório apresentou variação, um animal dissecado de Miguel Pereira apresentou o seu comprimento quatro vezes maior que o comprimento do prepúcio. Em um exemplar do município de Vassouras, o pênis evertido alcançou quase

40% do comprimento total do corpo. O prepúcio é grosso, com largura de 1/3 do seu comprimento (Figura 58I).

O **sistema nervoso** apresentou, em vista ventral, os gânglios pediosos, são da mesma largura do que os gânglios cerebrais e estão unidos por uma comissura pediosa curta, pois os gânglios pediosos são tão próximos que não se observa a comissura (Figura 58J).

Distribuição geográfica: registrado em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro: Angra dos Reis, Parati, Rio das Ostras, Macaé, Campos dos Goytacazes, Cambuci, Itaperuna, Miguel Pereira, Vassouras, Magé, Santa Maria Madalena, Cantagalo, Trajano de Moraes, Bom Jesus de Itabapoana, Santo Antônio de Pádua, Porciúncula, Natividade e Miracema. Aparentemente, trata-se de espécie endêmica para o Rio de Janeiro, uma vez que não observamos nada semelhante procedente de outros locais. A figura 59 apresenta os registros de ocorrência para *Gundlachia* n. sp. 2, baseado no material examinado.

Considerações: o novo táxon foi incluído no gênero *Gundlachia* pelas seguintes razões: a concha apresenta protoconcha com pontuações irregulares e sem linhas radiais; teleoconcha pode ter ou não linhas radiais e dente central da rádula assimétrico, todos caracteres diagnóstico de *Gundlachia* segundo Pfeiffer (1849); Walker (1923); Marcus e Marcus (1962); Hubendick (1964, 1967); Lanzer (1996); Santos (1995, 2003); Lacerda et al. (2011); Ovando et al. (2014). Além disso, os fascículos musculares do músculo anterior direito são cruzados (Figura 57D), o que de acordo com a descrição de Santos (2003) caracteriza o gênero *Gundlachia.*

O novo táxon difere de todas as espécies de *Gundlachia* por apresentar impressão muscular posterior elíptica; glândula salivar com diâmetro irregular; de seis a nove ácinos no ovoteste; região anterior do útero com três projeções e apêndice terminal do útero longo e com a extremidade dilatada.

Gundlachia n. sp. 2 difere de *G. radiata*, G. *bakeri*, *G. lutzi*, *G. ticaga*, *G. saulcyana e Gundlachia* n. sp. 1 pela posição do ápice que não se projeta além da borda da concha e pela forma do útero que é arredondada, mas compartilha com *G. leucaspis* essas duas características, ápice projetado além da margem da concha e útero com três projeções na região anterior.

Todavia, enquanto *Gundlachia* n. sp. 2 apresenta a região de pontuações ocupando 80% da protoconcha, a MAE elíptica e a vesícula seminal com cinco divertículos; *G. leucaspis* só ocupa 50% da protoconcha, a MAE é alongada e a vesícula seminal não apresenta divertículos evidentes.

Nossas observações apontam para uma grande semelhança entre a descrição de *G. saulcyana* (Bourguignat, 1853) fornecida por Santos (1995, 2003) e *Gundlachia* n. sp. 2 citada em Thiengo et al. (2002, 2004, 2006), para o Estado do Rio de Janeiro, em relação à morfologia das conchas e partes moles. Ambas as espécies apresentam pontuações irregulares em quase toda a protoconcha (Figura 55D) e impressões musculares elípticas; contudo, diferem em relação à forma e ao número de estruturas internas do sistema reprodutor, como por exemplo, o número de folículos do ovoteste. *Gundlachia* n. sp. 2 possui cinco folículos, enquanto *G. saulcyana* identificada por Santos (1995: fig. 82) possui de 12 a 20 folículos; o apêndice terminal do útero se mostra longo e dilatado na porção final em *Gundlachia* n. sp. 2 (Figura 57E), já em *G. saulcyana* apesar de ser longo, não apresenta a extremidade dilatada (Figura 48C); diferindo de *G. ticaga* que é curto, porém com a extremidade dilatada (Marcus e Marcus 1962; Santos 1995, 2003) (Figura 45F).

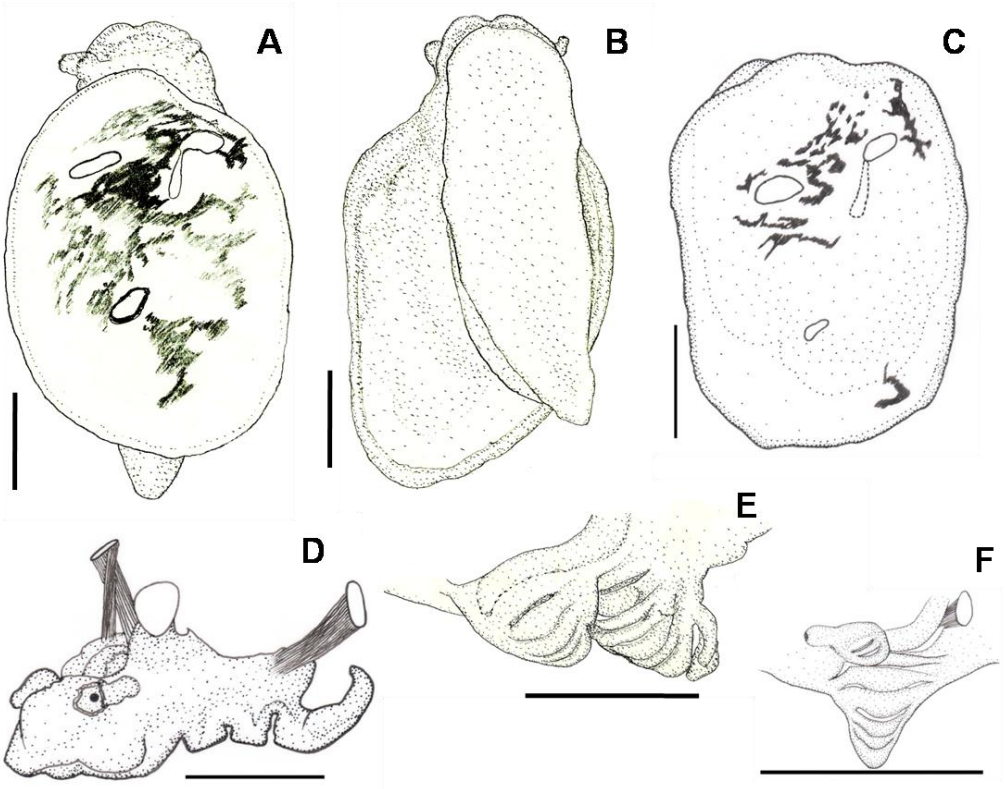
Gundlachia n. sp. 2 apresentou a impressão muscular anterior direita elíptica, característica que a distingue de *G. ticaga*, na qual esta impressão muscular é arredondada ou em forma de "gota" (Santos 2003, fig.47). Já em *G. radiata*, a MAD, é maior e elíptica com um alongamento na parte interna promovida pela área adesiva (Figura 20).

O lobo dorsal da pseudobrânquia de *Gundlachia* n. sp. 2 é menor do que o ventral (Figura 56F), diferindo de *G. ticaga* que apresenta ambos os lobos bem desenvolvidos e proporcionais assim como em *G. leucaspis* e *G. radiata* coletada em Goiás; contudo, em *Gundlachia* n. sp. 2 o número de pregas do lobo dorsal variou de três até seis e no lobo ventral de quatro a oito e em *G. ticaga* de três a quatro no dorsal e quatro a seis no ventral. Isso demonstra que o número de pregas da pseudobrânquia não é um bom caracter para a diagnose ou sistemática, excetuando talvez a proporção dos lobos.

Apesar das nossas tentativas de extração de DNA, para auxiliar na distinção desse táxon considerado por nós como críptico, não obtivemos sucesso. Todavia, as diferenças apresentadas pelas conchas e pelas partes moles mostram que *Gundlachia* n.

sp. 2 apresenta uma série de caracteres morfológicos que sustentam a sua definição e distinção de outros táxons congenéricos.

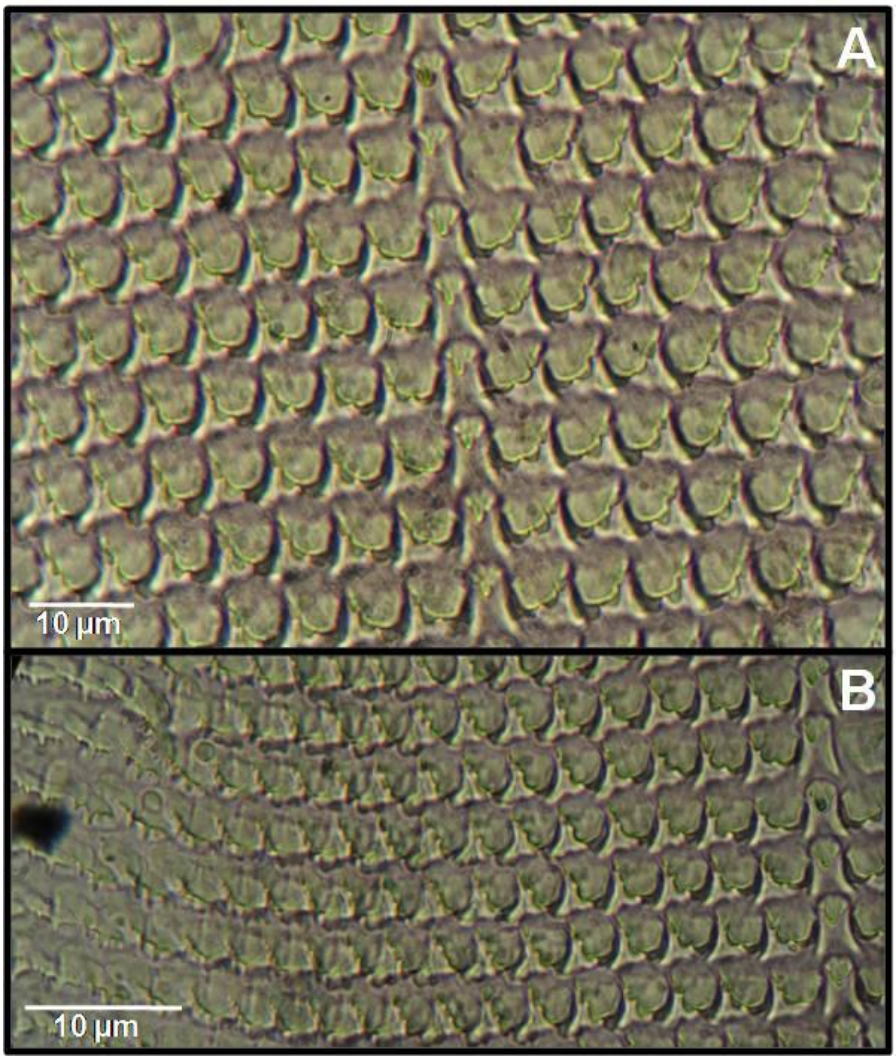
Figura 56 - Morfologia externa das partes moles de *Gundlachia* n. sp. 2.



Legenda: **(A)** Vista dorsal do teto do manto, evidenciando as três impressões musculares, sendo a MAD e MPE elípticas e a MAE alongada; e a pigmentação, concentrada na região central do teto do manto. **(B)** Vista ventral da parte mole, evidenciando a forma alongada do pé e a extremidade afilada (UERJ 7115). **(C)** Vista dorsal do teto do manto, evidencia o MAE elíptico e pigmentação concentrada na região anterior. **(D)** Detalhe dos três músculos adutores (MAD com os feixes cruzados), do palpo labial bífido e tentáculos curtos. **(E)** Pseudobrânquia, com o lobo dorsal com seis lamelas e o ventral $1^{1/2}$ maior do que o dorsal, com oito lamelas. **(F)** Pseudobrânquia, evidenciando que o lobo dorsal pode ser até três vezes menor do que o ventral, espécime coletado em Rio das Ostras (Fiocruz s/n). (A, B, E) Jacuecanga, Angra dos Reis (Fiocruz s/n); (C-D) Praia do Bananal, Angra dos Reis (UERJ 7115). Escala= 1 mm.

Fonte: O autor, 2015.

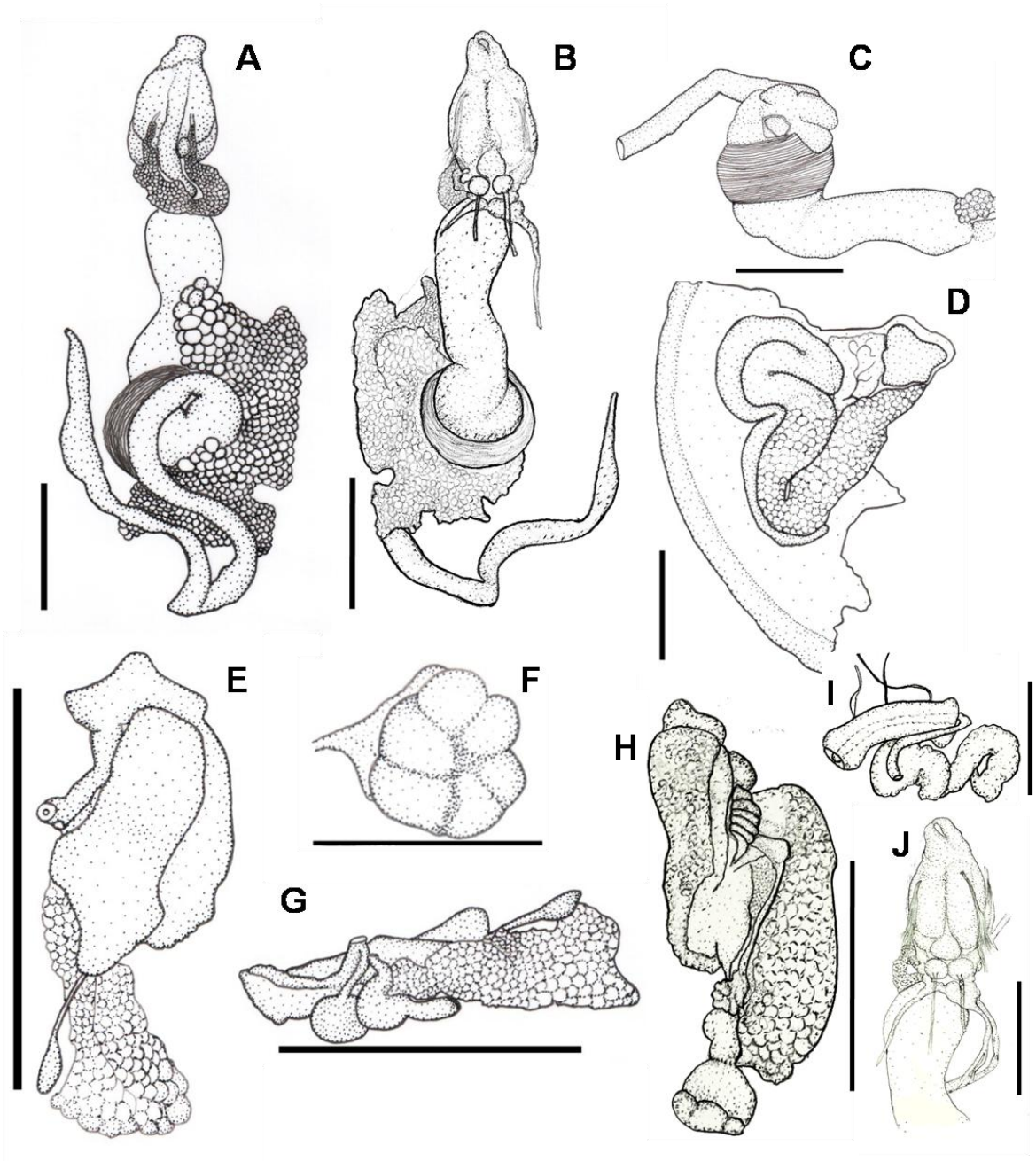
Figura 57 - Morfologia da rádula de *Gundlachia* n. sp. 2.



Legenda: Rádula examinada sob microscópio óptico. **(A)** Vista dorsal da região mediana da rádula, mostrando os dentes centrais e laterais. As cúspides principais são assimétricas e afiladas, sendo a esquerda mais larga do que a direita. A placa basal é trapezoidal e curta. **(B)** Dentes laterais apresentam as três cúspides principais com tamanhos diferentes, sendo o endocone o mais longo, quase alcançando a placa basal. Os dentes marginais são multicuspidados, e as três cúspides principais são visíveis até a borda da rádula.

Fonte: O autor, 2015.

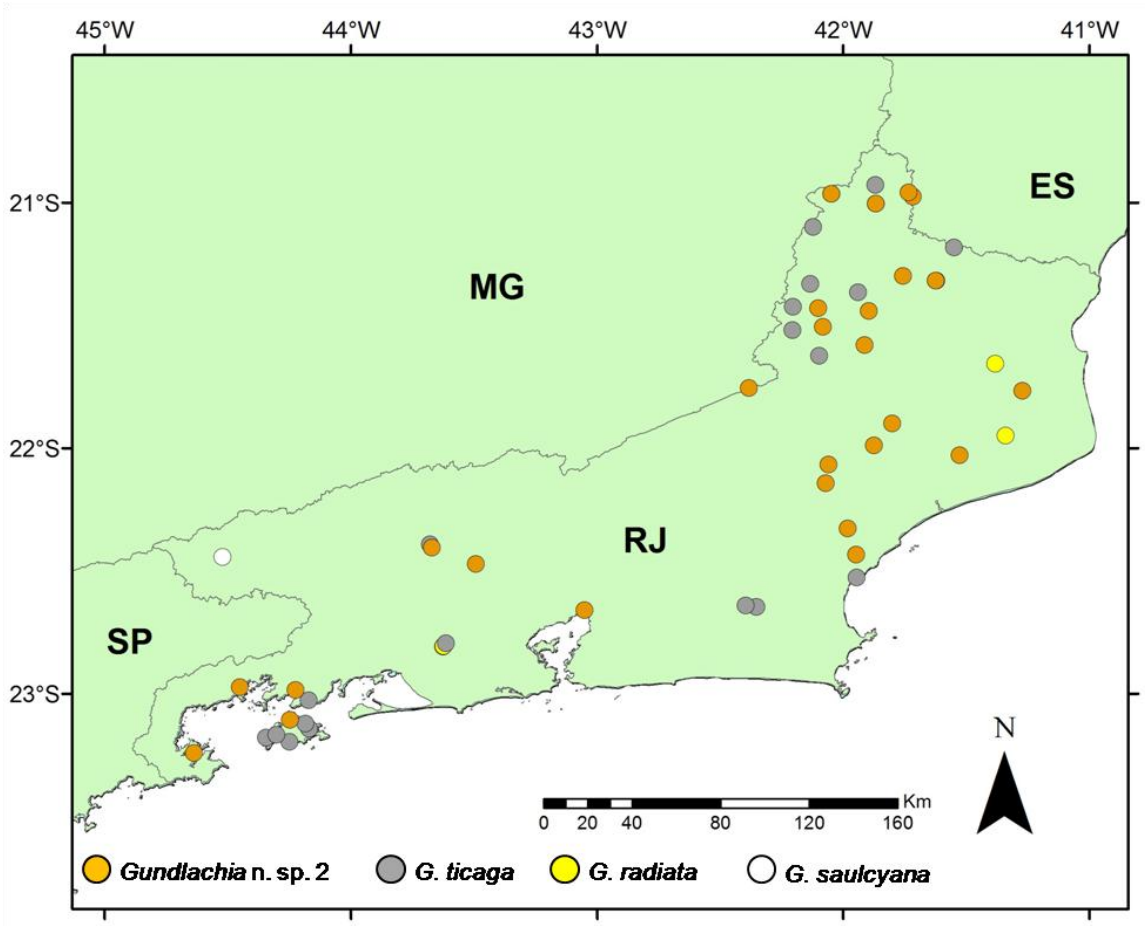
Figura 58 - Morfologia interna das partes moles de *Gundlachia* n. sp. 2.



Legenda: **(A-C)** Sistema digestório. **(A-B)** Vista dorsal e ventral, respectivamente, evidenciando bulbo bucal alongado, glândula salivar longa e irregular, esôfago da mesma largura do bulbo, estômago, intestino e a glândula digestiva. **(C)** Vista lateral do estômago, evidenciando a região muscular mais larga do que a pilórica e o ceco curto, alcançando 1/3 da largura da região muscular. **(D)** Vista dorsal do sistema excretor, evidenciando a forma sinuosa e a proporção semelhante do átrio e do ventrículo. **(E-I)** sistema reprodutor; **(E)** Vista dorsal evidencia a glândula nidamental alongada e a região anterior do útero modificada, com três projeções e o seu apêndice terminal longo e dilatado; **(F)** Ovoteste, com seis divertículos; **(G)** Vista lateral-direita, evidencia a vagina e o duto da espermateca de mesmo calibre. **(H)** Vista ventral-esquerda, evidencia a vesícula seminal com cinco divertículos, a próstata com cinco folículos **(I)** Complexo peniano com flagelo longo, aproximadamente o dobro do comprimento do prepúcio. **(J)** Sistema nervoso, evidenciando os gânglios e comissura pediosa curta. Escala= 1,0 mm. (A-D, H-J) Jacuecanga, Angra dos Reis (Fiocruz s/n); (E, G) Rio das Ostras (Fiocruz s/n); (F) Praia do Bananal, Angra dos Reis (UERJ 7115).

Fonte: O autor, 2015.

Figura 59 - Mapa da distribuição geográfica de *Gundlachia* n. sp. 2.



Legenda: registros de ocorrência das quatro espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 que ocorrem no estado do Rio de Janeiro, baseado no material examinado. Datum WGS 84.
Fonte: O autor, 2015.

A tabela 6 sumariza as principais diferenças morfológicas entre as seis espécies de *Gundlachia* estudas. Distintas estruturas embasam a distinção das espécies já descritas e dos dois novos táxons propostos, *Gundlachia* n. sp. 1 e *Gundlahcia* n. sp. 2.

Tabela 6 - Comparação morfológica dos caracteres diagnóstico das espécies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 analisadas.(continua)

		G. radiata	***G. leucaspis***	***G. bakeri***	***G. lutzi***	***G. ticaga***	***G. saulcyana***	***Gundlachia* n. sp. 1 (AC)**	***Gundlachia* n. sp. 2 (RJ)**
	Morfometria	Baixa e estreita	Baixa e estreita	Alta e estreita	Alta e estreita	Baixa e estreita	Alta e estreita	Baixa e estreita	Baixa e estreita
Concha	Abertura da concha	Elíptica	Elíptica	Arredondada	Elíptica	Elíptica	Elíptica	Elíptica	Elíptica
	Ápice	Projetado **entre** a linha mediana e a borda direita da concha.	Projetado **sobre** a margem lateral direita da concha ou **ultrapassando**.	Projetado **próximo** à borda da concha.	Projetado **próximo** à borda da concha.	Projetado **entre** a linha mediana e a borda direita da concha.	Projetado **próximo** à borda da concha.	Projetado **entre** a linha mediana e a borda direita da concha.	Projetado **sobre** a margem lateral direita da concha ou **ultrapassando**.
	Protoconcha	Depressão apical **curta** (maioria) ou **ampla**, mas sempre **rasa**; pontuações irregulares que podem ser **profundas** ou **rasas**.	Depressão apical **curta** e **profunda**; área lisa e pontuações irregulares **rasas**.	Depressão apical **curta** e **profunda**; área lisa e pontuações irregulares **profundas**.	Depressão apical **curta** e **profunda**; área lisa e pontuações irregulares **profundas**.	Depressão apical **curta** e **rasa**; área lisa e pontuações irregulares **profundas**.	Depressão apical **curta** e **profunda**; área lisa e pontuações irregulares **profundas**.	Depressão apical **ampla** e **profunda**; área lisa e pontuações irregulares **profundas**.	Depressão apical **curta** e **profunda**; área lisa e pontuações irregulares **profundas**.
	Depressão apical da protoconcha	Ocupa de 6,25 a 37,5%.	Ocupa 5%.	Ocupa de 5 a 10%	Ocupa 5%	Ocupa 10%	Ocupa 5%	Ocupa 10%	Ocupa 5%
	Área lisa da protoconcha	Ocupa de 12,5 a 45%.	Ocupa 45%.	Ocupa de 18 a 27%	Ocupa 15%	Ocupa 20%	Ocupa 10%	Ocupa 15%	Ocupa 15%
	Banda de pontuações da protoconcha	Ocupa de 50 a 75%.	Ocupa 50%.	Ocupa de 67 a 72%	Ocupa 80%	Ocupa 70%	Ocupa 85%	Ocupa 75%	Ocupa 80%
	Teleoconcha	Possui linhas concêntricas de crescimento e **pode** apresentar **linhas radiais**.	Possui linhas concêntricas de crescimento.	Possui linhas radiais, que se iniciam abaixo da protoconcha e **dispostas em leve espiral**.	Possui linhas concêntricas de crescimento.	Possui linhas concêntricas **podendo** apresentar também **linhas radiais**.	Possui linhas concêntricas de crescimento.	Possui linhas concêntricas de crescimento e **pode** apresentar tênues **linhas radiais.**	Possui linhas concêntricas de crescimento **com ondulações**.
Impressões musculares	Anterior direita	**Elíptica** e alongada na parte interna.	**Elíptica,** com um estreitamento na região interna.	**Elíptica**, sendo o seu comprimento o dobro da largura da MAE	**Alongada**, com um estreitamento na região interna.	**Elíptica** e menor do que a MAE.	**Elíptica****	**Elíptica**	**Elíptica**
	Anterior esquerda	**Arredondada**	**Elíptica**	**Elíptica**	**Alongada**, com a largura duas vezes maior do que o comprimento	**Elíptica**, maior do que MAE e em forma de gota d'água.	**Elíptica****	**Arredondado**, do mesmo diâmetro da MPE.	**Alongada**
	Posterior esquerda	**Arredondada**, podendo ser a metade da MAE.	**Alongada**, sendo o comprimento o dobro da largura.	**Alongada**, sendo a largura o dobro do comprimento.	**Alongada**, com o comprimento três vezes maior do que	**Arredondado**	**Alongada**, tendo a largura três vezes maior	**Arredondado**	**Elíptica**

					a largura		do que o comprimento.**		
Pseudobrânquia	Lobo dorsal	Varia entre as populações, mas em geral o lobo dorsal é menor do que a largura lobo ventral, variando de **duas** a **cinco lamelas**.	Tem a mesma largura do lobo ventral, variando de **duas** a **três lamelas**.	Tem em torno da **metade** da largura da ventral e tem **três** lamelas.	Tem o dobro da largura da ventral e tem **duas** lamelas.	Tem quase sempre a **mesma** largura do lobo ventral e varia de **três** a **quatro** lamelas.	O lobo dorsal é menor do que o ventral.**	Tem largura em torno de **1/3 menor** do que o ventral, variando de **12** a **15** lamelas.	Tem em torno de **1/3** da largura do lobo ventral e varia de **três** a **seis** lamelas.
	Número de lamelas no lobo ventral	**Quatro** a **12 lamelas**.	**Três ou quatro lamelas**.	**Quatro** lamelas.	**Três** lamelas.	**Quatro** a **seis** lamelas.	**Três** a **quatro** lamelas.**	de **18** a **21** lamelas.	**Quatro** a **oito**.
Sistema digestório	Forma do bulbo bucal	Arredondada.	Alongada.	Arredondada e.	Alongada.	Alongada.	Arredondada.	Alongada.	Alongada.
	Comprimento da glândula salivar	Longo.	Longo.	Curto.	Longo.	Curto.	Longo.*	Longo.	Longo.
Rádula	Dente central da rádula	Tem **seis cúspides**, sendo duas cúspides principais e mais duas acessórias de cada lado; placa basal tem forma **trapezoidal** e **curta.**	Tem **quatro** ou **cinco cúspides**, a placa basal tem forma **trapezoidal** e **curta.**	Tem **seis cúspides**, a placa basal tem forma **trapezoidal** e **curta.**	Tem **seis ou sete cúspides**, a placa basal tem forma **trapezoidal** e **curta.**	Tem de **cinco** a **seis cúspides**, sendo uma cúspide acessória entre as duas principais e mais uma ou duas cúspides acessórias laterais de cada lado; a placa basal tem forma **trapezoidal** e **curta.**	Tem **quatro cúspides**, com duas cúspides principais e mais uma cúspide acessória de cada lado; a placa basal tem forma **trapezoidal** e **curta.****	Tem de **quatro** a **cinco cúspides**, sendo duas cúspides principais, uma ou duas cúspides acessórias do lado esquerdo e mais uma entre as duas cúspides principais; a placa basal tem forma **trapezoidal** e **curta.**	Assimétrico, com duas cúspides principais e uma cúspide acessória lateral a principal mais acentuada
	Cúspides principais do dente central	**Assimétricas**, **curtas** e **afiladas**.	**Assimétricas**, **curtas** e **afiladas**.	**Assimétricas**, **curtas**, **truncadas** e com uma ou duas cúspides acessórias entre**.**	**Assimétricas**, **curtas** e **truncadas**. A esquerda possui o dobro da espessura e do comprimento da direita, com duas cúspides acessórias	**Assimétricas**, **curtas,** apesar de próximas da metade da placa basal e **afiladas.**	**Assimétricas**, **curtas** e **truncadas**.**	**Assimétricas**, **curtas,** atingindo 1/3 da altura da placa basal e **afiladas**	**Assimétricas**, **curtas** e **afiladas.**

					do seu lado e mais duas ou três cúspides do lado da "principal" direita.				
	Dentes laterais	Com largura e comprimentos **semelhantes**, apesar do mesocone ser um pouco mais largo e tem geralmente **duas** cúspides acessórias entre o endocone e o ectocone.	Com largura e comprimentos **distintos**; o mesocone é mais largo e longo do que os demais e tem só **uma** cúspide acessória entre o endocone e o ectocone.	Com largura e comprimentos **distintos**; o mesocone é mais largo do que os demais e tem de **duas a três** cúspides acessórias entre o endocone e o ectocone.	Com largura e comprimentos **distintos**; o mesocone é mais largo e longo do que os demais e tem só **uma** cúspide acessória entre o endocone e o ectocone.	Com largura e comprimentos **distintos**; o mesocone é mais largo do que os demais, apesar de ser menor do que o ectocone e tem de uma a duas cúspides acessórias entre o endocone e o mesocone.	Com largura e comprimentos **distintos**; o mesocone é mais largo e longo do que os demais e tem só uma cúspide acessória entre o endocone e o ectocone.**	Com largura e comprimentos **distintos**; o mesocone é mais largo (o dobro) e longo do que os demais e tem só uma cúspide acessória entre o endocone e o ectocone.	Com largura e comprimentos **distintos**; o endocone é mais longo do que os demais.
	Dentes marginais	Com **13** cúspides.	Variando de **10** a **14** cúspides.	Com **11** cúspides.	Com **12** ou **13** cúspides.	Variando de **oito** a **nove** cúspides.	**Com **11** cúspides.	Com **11** cúspides.	Multicuspidado e com três cúspides principais são visíveis até a borda.
	Fórmula radular	17-1-17 a 26-1-26.	13-1-13	14-1-14	14-1-14	16-1-16 a 20-1-20	15-1-15 a 16-1-16**	17-1-17	17-1-17
Sistema reprodutor	**Nº de folículos no ovoteste**	**Variou de 22 a 38.**	**Variou de 11 a 12.**	**Variou de dez a 20.**	**Variou de 13 a 20.**	**Variou de 12 a 15.**	**Variou de 12 a 20. ****	**Variou de 29 a 35.**	**Variou de seis a nove.**
	Vesícula seminal	Variou de **três** a **seis** divertículos.	Não observado (ausente).	Possui **quatro** divertículos.	Sem divertículos, apesar de apresentar o ovispermoduto dilatado.	Variou de **quatro** a **cinco** divertículos.	**Sem divertículos, triangular e lisa.	Possui **cinco** divertículos.	Possui **cinco** divertículos.
	Próstata	Quatro a seis folículos	-	-	-	Quatro folículos	-	-	Cinco folículos
	Forma do útero e do seu apêndice terminal	**Arredondada**; **longo** e **sem** extremidade dilatada.	Com **três projeções**; apêndice **ausente**.	**Arredondada**; apêndice **ausente**.	**Arredondada**; apêndice **ausente**.	**Arredondada**; **curto** e com a extremidade **fina**.	**Arredondada**; **longo** e com a extremidade **fina**. **	**Arredondada**; **curto** e com a extremidade **fina**.	Com **três projeções**; longo e com a extremidade dilatada.

Legenda: Os dados apresentados são resultados desse trabalho e compilações de Hubendick (1964*), Harrison (1983), Marcus e Marcus (1962), Santos (1995**, 2003), Lanzer (1996); Lacerda et al. (2011, 2013); Ovando et al. (2014).

4.3 **Conquiliometria**

A amplitude de variação das conchas para as nove variáveis conquiliométricas de *Gundlachia* pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5 - Conquiliometria de oito espécies de *Gundlachia*. Estatística descritiva das conchas, apresentando a amplitude morfométrica.

		G. radiata	*G. leucaspis*	*G. bakeri*	*G. lutzi*	*G. ticaga*	*G. saulcyana*	*Gundlachia* n. sp.1	*Gundlachia* n. sp. 2
N		**147**	**66**	**49**	**48**	**262**	**21**	**29**	**120**
Variáveis									
C	Min	2,25	1,52	1,02	1,68	1,25	1,68	1,31	1,55
	Med	5,78	2,97	2,09	2,87	2,79	2,53	4,36	3,15
	Dp	1,68	0,63	0,50	0,62	0,78	0,34	2,06	1,01
	Max	9,72	4,57	3,18	5,09	5,70	3,08	8,44	6,85
L1	Min	1,40	0,93	0,65	1,22	0,80	1,14	0,92	0,80
	Med	3,50	2,02	1,47	2,01	1,84	1,75	2,93	2,03
	Dp	0,98	0,44	0,38	0,48	0,55	0,23	1,33	0,72
	Max	5,93	3,03	2,61	3,84	4,20	2,10	5,63	4,75
L2	Min	1,25	0,51	0,61	0,96	0,55	0,75	0,75	0,50
	Med	3,50	1,57	1,19	1,67	1,52	1,34	2,70	1,64
	Dp	1,00	0,41	0,32	1,68	0,46	0,24	0,42	0,67
	Max	7,35	2,35	2,01	3,14	3,33	1,78	0,92	4,05
A	Min	0,49	0,61	0,36	0,58	0,45	054	0,35	0,38
	Med	1,33	1,07	0,74	1,07	0,81	0,97	1,79	1,01
	Dp	0,38	0,23	0,16	0,35	0,21	0,13	0,42	2,28
	Max	2,21	1,73	1,18	3,01	1,15	1,18	0,92	1,75
L1/C	Min	0,48	0,59	0,58	0,62	0,58	0,60	0,57	0,47
	Med	0,61	0,68	0,70	0,70	0,66	0,69	0,68	0,64
	Dp	0,05	0,04	0,05	0,03	0,03	0,05	0,04	0,07
	Max	0,94	0,81	0,82	0,77	0,78	0,78	0,76	0,81
L2/C	Min	0, 43	0,28	0,37	0,38	0,37	0,34	0,53	0,30
	Med	0,56	0,52	0,57	0,58	0,55	0,53	0,62	0,51
	Dp	0,06	0,07	0,07	0,06	0,05	0,07	0,04	0,09
	Max	0,91	0,62	0,71	0,69	0,73	0,65	0,70	0,74
A/C	Min	0,15	0,28	0,27	0,23	0,23	0,31	0,16	0,23
	Med	**0,23**	0,36	0,36	0,38	0,55	0,39	**0,22**	0,33
	Dp	0,03	0,04	0,04	0,11	0,05	0,04	0,03	0,05
	Max	0,37	0,49	0,44	1,09	0,40	0,48	0,30	0,51
A/L1	Min	0,24	0,40	0,36	0,30	0,33	0,47	0,24	0,35
	Med	0,38	0,54	0,51	0,54	0,29	0,56	0,32	0,52
	Dp	0,05	0,08	0,06	0,16	0,02	0,06	0,05	0,10
	Max	0,52	0,77	0,62	1,49	0,40	0,68	0,45	0,81
L2/L1	Min	0,72	0,44	0,58	0,35	0,60	0,50	0,81	0,53
	Med	0,92	0,77	0,82	0,83	0,82	0,76	0,91	0,80
	Dp	0,08	0,09	0,10	0,10	0,07	0,09	0,04	0,10
	Max	1,55	0,89	0,97	0,94	1,00	0,91	0,98	0,95

Legenda: (C) Comprimento; (L1) Largura anterior; (L2) Largura posterior; (A) Altura; (L1/C) Largura anterior/ Comprimento; (L2/C) Largura posterior/ Comprimento; (A/C) Altura/comprimento; (A/L1) Altura/largura anterior; (L2/L1) Largura posterior /largura anterior; (Min) Valor mínimo; (Med) Média; (Dp) Desvio padrão; (Max) Valor máximo.

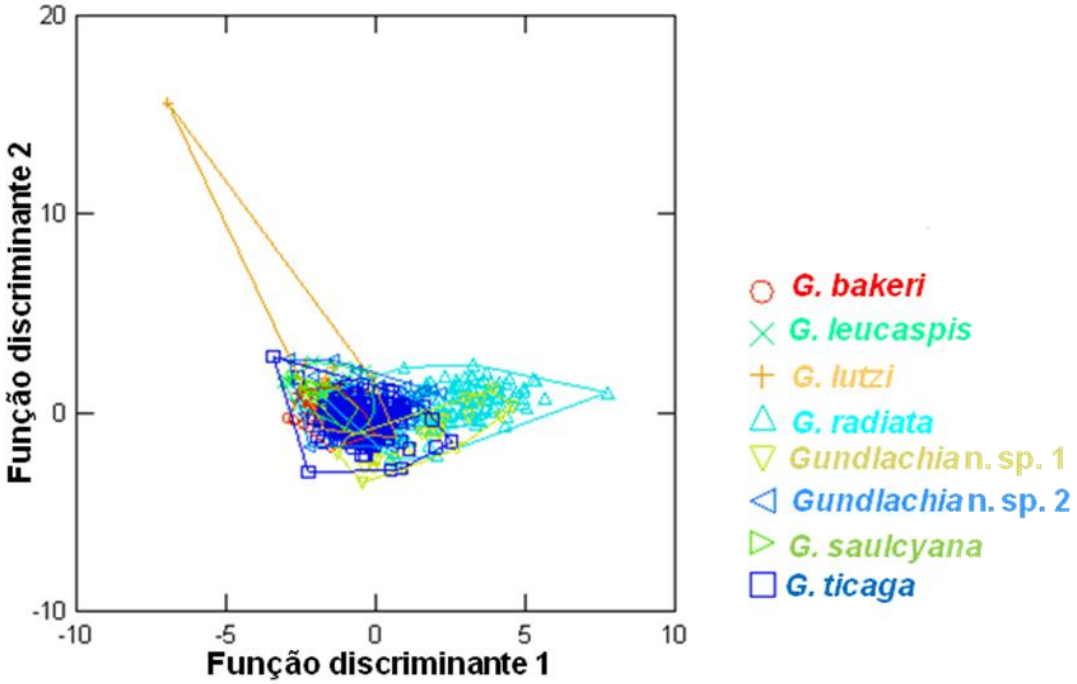
Fonte: O autor, 2015.

Foram analizadas 742 conchas provenientes de oito espécies diferentes de *Gundlachia*. As informações sobre as espécies e o número de conchas medidas de cada uma encontram-se na Tabela 5.

A variável largura anterior (L1) foi retirada da Análise Discriminante (AD) por ter apresentado uma alta correlação com a variável comprimento (C) (r = 0,979) e com a variável largura posterior (L2) (r=0,976); A variável comprimento (C) também foi retirada da análise por apresentar alta correlação com a variável largura posterior (L2) (r= 0,966).

A Análise Discriminante apresentou resultados que diferenciaram, de maneira significativa, as oito espécies (*Wilks' lambda* = 0,196; F= 28,640; p= 0,000), embora os centróides espacialmente não tenham se apresentado distantes entre si, conforme visualizados no gráfico da figura 60.

Figura 60 – Representação gráfica da Análise Discriminante em função da morfometria utilizando as oito espécies de *Gundlachia* analisadas.



Legenda: Os pontos com os seus respectivos agrupamentos, representam as 742 conchas das oito espécies analisadas de acordo com as sete variáveis morfométricas: (L2) Largura posterior; (A) Altura; (L1/C) Largura anterior/ Comprimento; (L2/C) Largura posterior/ Comprimento; (A/C) Altura/comprimento; (A/L1) Altura/largura anterior; (L2/L1) Largura posterior /largura anterior, utilizadas pela Análise Discriminante.

Fonte: O autor, 2015.

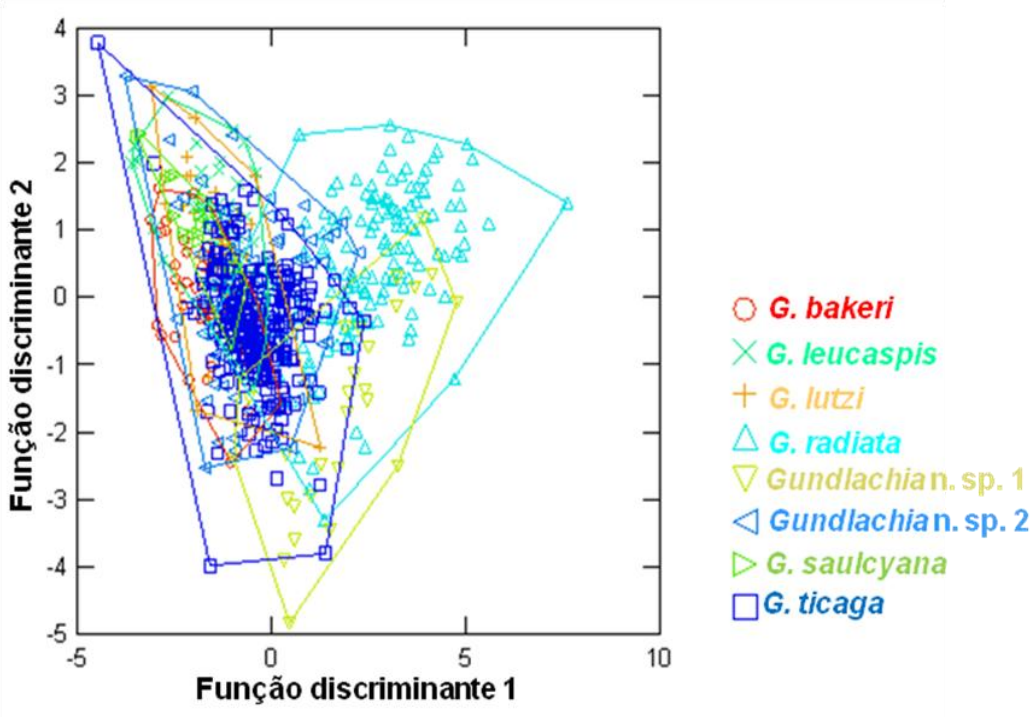
Nessa primeira abordagem, foi observado que um espécime de *G. lutzi* (5,09 mm de comprimento), comportou-se na análise como um "*out group*", apesar de realmente ser um indivíduo da espécie, foi retirado e repetido todos os procedimentos da análise com o intuito de observar melhor o conjunto de dados analisado, a fim de detectar quais as espécies que se destacam morfometricamente do conjunto de dados.

A retirada da concha "*out group*" de *G. luzi* não trouxe modificações na significância para esse conjunto de dados, além das mesmas variáveis (C e L1) serem retiradas o resultado da AD foram semelhantes (*Wilks' lambda* = 0,175; F= 30,949; p< 0,001). Contudo, apesar de ainda ter ocorrido alguma sobreposição, os pontos relativos a cada espécie tenderam a se agrupar em uma determinada área do gráfico (Figura 61).

Segundo esta análise *G. radiata* e *Gundlachia* n. sp. 1 possuem a morfometria mais semelhante entre si, destacando-se das demais espécies, principalmente pela função discriminante 1 (FD1), que teve a variável A/C com o maior valor da função canônica (4,904). Essa constatação da análise morfométrica vai de acordo com a primeira distinção morfológica entre as conchas ao serem observadas sob lupa de forma

geral. Essas duas espécies de *Gundlachia* são os táxons que apresentam a concha mais baixa e a abertura mais alongada, podendo ser facilmente constatado pelos seus baixos índices da relação A/C (0,23 e 0,22 respectivamente), que inferem essa morfologia (Tabela 5).

Figura 61 – Representação gráfica da Análise Discriminante em função da morfometria utilizando as oito espécies de *Gundlachia* analisadas, sem o "*out group*".



Legenda: Os pontos com os seus respectivos agrupamentos, representam as 741 conchas das oito espécies analisadas de acordo com as sete variáveis morfométricas: (L2) Largura posterior; (A) Altura; (L1/C) Largura anterior/ Comprimento; (L2/C) Largura posterior/ Comprimento; (A/C) Altura/comprimento; (A/L1) Altura/largura anterior; (L2/L1) Largura posterior /largura anterior, utilizadas pela Análise Discriminante.
Fonte: O autor, 2015.

A função discriminante 1 (FD1), gerada pela AD, foi a mais importante para explicar a discriminação dos grupos. A proporção de explicabilidade foi 0,823 para FD1; 0,499 para FD2; 0,407 para FD3 e 0,278 para FD4. A proporção acumulada de explicabilidade das funções discriminantes para FD1 foi de 0,756, para FD1+FD2 foi de 0,875, para FD1+FD2+FD3 foi de 0,947 e para FD1 somada até a FD4 foi de 0,994.

As variáveis que mais contribuíram para a discriminação representada pela FD1, disposta em ordem decrescente de importância, foram: L2 (1,003), L1/C (-0,572), A/C (0,383), A/L1(-0,382), L2/L1 (0,120), A (-0,090) e L2/C (0,044).

As demais funções apresentaram as seguintes variáveis para FD2 foram: A/C (6,116), A/L1(-5,180), L1/C (-1,749), L2/C (-1,182), L2/L1 (0,802), A (0,534) e L2 (0,331); para FD3 foram: A/C (4,838), A/L1(-3,176), L2/C (3,894), L1/C (-3,054), L2/L1 (-2,906), L2 (-0,924) e A (0,385); e para FD4 foram: A/L1 (-4,108), L2 (2,869), A/C (2,639), L1/C (-2,506), L2/L1 (0,862), L2/C (-0,831) e A (-0,152).

Os índices morfométricos (L1/C, A/C, A/L1, L2/L1 e L2/C) têm se mostrado melhores que as medidas lineares para a discriminação das populações, conforme observado por Lacerda et al. (2011) para *Gundlachia ticaga*. Esses índices retiram um pouco da variação morfométrica das conchas que são fortemente influenciadas pelas variações ecofenotípicas (Basch 1963). Eles refletem as formas geométricas das conchas que tem se mostrado ser as mais úteis para as inferências taxonômicas. É importante destacar que as variáveis lineares, que são tradicionalmente utilizadas para a caracterização das amplitudes morfométricas das espécies, foram em geral, as variáveis que menos contribuíram para a discriminação dos grupos, conforme constatado nas funções discriminantes descritas acima.

A matriz de classificação (Tabela 7) mostra quantos representantes possuem a "identidade morfológica" de cada espécie estudada, apresentando ao final da matriz o índice de acerto na separação das espécies realizada pela Análise Discriminante.

Tabela 7 - Matriz de classificação da Análise Discriminante (AD). Indicando quantos representantes possuem a "identidade morfológica" de cada espécie.

	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**% acerto**
***G. bakeri* (1)**	**15**	5	8	0	1	1	10	9	**31**
***G. leucaspis* (2)**	3	**29**	9	0	0	4	13	8	**44**
***G. lutzi* (3)**	6	5	**22**	0	1	0	8	5	**47**
***G. radiata* (4)**	0	0	1	**114**	14	4	0	14	**78**
***Gundlachia* n. sp.1 (5)**	0	0	0	4	**22**	0	0	3	**76**
***Gundlachia* n. sp.2 (6)**	8	17	9	6	3	**45**	4	28	**38**
***G. saulcyana* (7)**	0	3	3	0	0	2	**12**	1	**57**
***G. ticaga* (8)**	14	24	15	4	6	45	3	**151**	**58**
Total	**46**	**83**	**67**	**128**	**47**	**101**	**50**	**219**	**55**

Legenda: As linhas representam as espécies e as colunas representam os grupos formados a partir da identificação morfométrica de cada concha analisada na AD.

Fonte: O autor, 2015.

As variações conquiliométricas entre as espécies de *Gundlachia* permitiu inferir que o estudo nesse gênero deve se basear, principalmente, em caracteres discretos das conchas (ex. posição do ápice, forma da abertura, ocupação da banda de pontuações), associados aos dados da morfologia externa e interna das partes moles, pois as conchas sofrem variação, refletindo o ambiente em que vivem, dificultando a separação das espécies por morfometria. Isso se aplica principalmente para as espécies de *G. bakeri*, *G. leucaspis*, *G. lutzi* e *Gundlachia* n. sp. 2 que apresentaram o seus índices de acerto abaixo de 50% (Tabela 7), indicando uma baixa "identidade morfológica", quando diz respeito a morfometria de suas conchas. Entretanto, as espécies *G. radiata*, *Gundlachia* n. sp. 2, *G. ticaga* e *G. saulcyana* apresentaram seus índices de acerto acima de 55%, conforme destacado na Tabela 7.

As duas espécies (*G. radiata* e *Gundlachia* n. sp.2) que apresentam a concha mais baixa e a forma da abertura mais "alongada", em relação as demais espécies, são as primeiras a serem diferenciadas refletindo nos mais altos índices de acerto da Matriz de Classificação da AD.

A maioria das diferenças observadas nas conchas entre as distintas espécies foram encontradas, por exemplo, na posição relativa do ápice em relação à concha. Este pode se projetar entre a linha mediana do corpo e a borda direita da concha, conforme observado em *G. radiata*, *G. ticaga* e *Gundlachia* n. sp. 1; próximo da margem, como observado em *G. bakeri*, *G. lutzi* e *G. saulcyana* ou ainda ultrapassando-a, conforme observado em *G. leucaspis* e *Gundlachia* n. sp. 2 (Tabela 5). Essas diferenças não são detectadas pela morfometria, uma vez que a largura anterior (L1) é tomada pela maior largura da concha e a posterior (L2) é tomada por uma linha imaginária que passa pela depressão apical, logo a posição do ápice não influencia nessa questão.

A aplicação da morfometria tradicional tem se mostrado capaz de distinguir as espécies (Benaim e Absalão 2011) e populações (Lacerda et al. 2011) de forma satisfatória. Nesse atual conjunto de dados, apesar do baixo percentual de acerto da matriz (Tabela 7), a maioria das espécies apresentaram uma boa identidade morfométrica, principalmente *G. radiata* cujo centróide e sua nuvem de pontos foi o mais destacado dentre os centróides das demais espécies (Figura 61).

A espécie que apresentou o mais baixo índice de acerto foi *Gundlachia* n. sp. 2, acreditamos que isso tenha ocorrido pela ampla variação morfológica da espécie e pelo estreito limiar que a separa de *G. ticaga*, tanto na morfometria, quanto na morfologia externa das partes moles, sendo distintas na maioria dos caracteres internos, conforme

apresentado na suas descrições e sumarizado na Tabela 6. O maior tamanho amostral e a maior amplitude de forma que *G. ticaga* geralmente exibe (Lacerda et al. 2011), pode ter sido um outro fator que reduziu o índice de acerto de *Gundlachia* n. sp. 2, mediante as demais espécies congenéricas (Tabela 7).

Diante disto, foi testado se as duas novas espécies, *Gundlachia* n. sp. 1 que ocorre somente no estado do Acre, e *Gundlachia* n. sp. 2 que parece ser restrita do Estado do Rio de Janeiro, apresentam diferenças significativas na morfometria se comparadas com *G. radiata* e *G. ticaga* que são os táxons menos distintos, segundo os dados morfológicos. Para esta análise, foi reduzido o número de conchas utilizadas, limitando-se aos lotes de *G. ticaga* utilizadas por Lacerda et al. (2011) do Estado do Rio de Janeiro, por se tratar de espécimes coletados próximo às distintas populações amostradas de *Gundlachia* n. sp 2. Em relação a *G. radiata* utilizamos os lotes mensurados por Lacerda et al. (2013) para a comparação com *Gundlachia* n. sp 1. Esse procedimento foi adotado para verificarmos se a ampla amostragem e o distinto número de lotes utilizados estavam influenciando no baixo índice de acerto do novo táxon do Rio de Janeiro.

Assim como as demais análises a variável largura anterior (L1) foi retirada da Análise discriminante (AD) por ter apresentado uma alta correlação com a variável comprimento (C) (r = 0,981) e com a variável largura posterior (L2) (r=0,971); A variável comprimento (C) também foi retirada da análise por apresentar alta correlação com a variável largura posterior (L2) (r= 0, 964).

A Análise Discriminante apresentou resultados que diferenciaram, de maneira significativa, as quatro espécies (*Wilks' lambda* = 0,258; F= 33,388; p= 0,000), e suas respectivas nuvens de pontos e seus centróides, apresentaram mais distantes entre si, conforme visualizados no gráfico da Figura 62.

A função discriminante 1 (FD1), gerada pela AD, foi a mais importante para explicar a discriminação dos grupos. As variáveis que mais contribuíram para a discriminação representada pela FD1, disposta em ordem decrescente de importância, foram: L2 (1,500), A (-0,536), A/C (-0,503), L2/C (-0,382), L2/L1 (0,347), A/L1(0,019) e L1/C (-0,003).

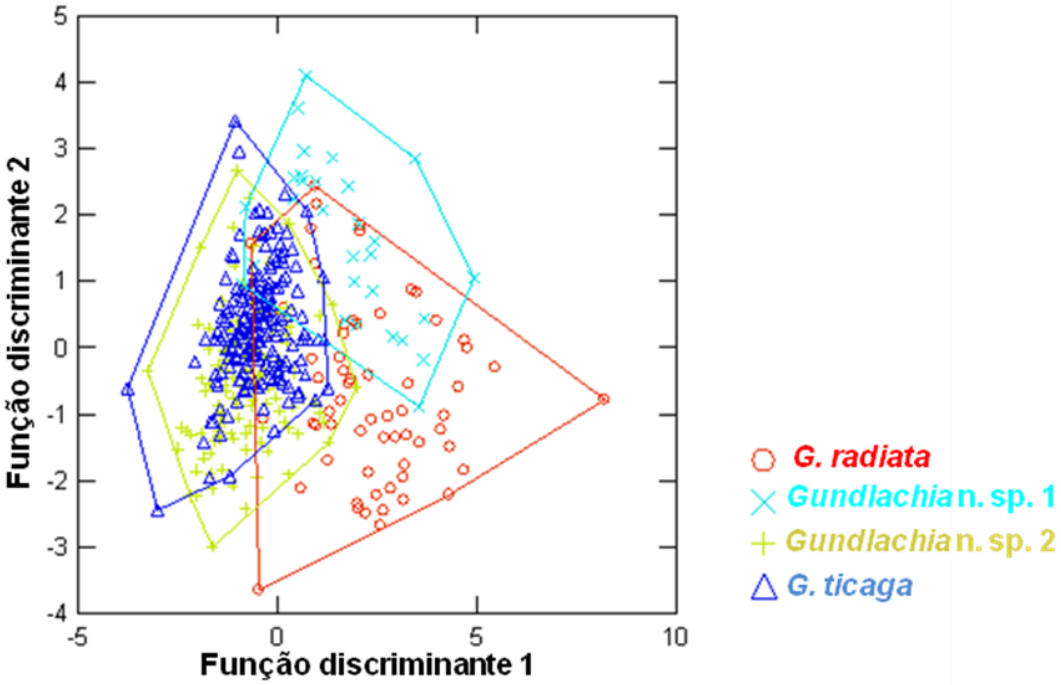
Conforme observado nas análises anteriores *G. radiata* e *Gundlachia* n. sp. 1, apresentam os centróides mais distantes entre si, segundo o eixo FD1 (Figura 62).

Enquanto a taxa de acerto de *G. radiata* diminuiu com a redução do tamanho amostral de 78%, com 147 conchas (Tabela 7) para 70% com 64 conchas (Tabela 8); *G.*

ticaga apresentou-se de forma contrária diante da redução do tamanho amostral, na primeira análise a taxa de acerto foi de 58% com 262 conchas, para 78% com 201 conchas, semelhante ao ocorrido com o índice total de acerto da tabela que foi de 72%, bem maior do que a análise anterior que foi de 55% (tabela 8).

Apesar de ainda apresentarem graficamente uma grande sobreposição dos seus centróides (Figura 62), *Gundlachia* n. sp. 2 e *G. ticaga* apresentaram melhores índices de acerto na Matriz de Classificação, após a redução do tamanho amostral de *G. ticaga* (Tabela 8), reduzindo assim da amplitude morfológica que tem se mostrado com uma grande plasticidade, variando de formas elípticas até formas quase arredondadas (Ovando et al. 2014: fig. 8a).

Figura 62 – Representação gráfica da Análise Discriminante em função da morfometria utilizando as quatro espécies de *Gundlachia*.



Legenda: Os pontos com os seus respectivos agrupamentos, representam as 414 conchas das quatro espécies analisadas de acordo com as sete variáveis morfométricas: (L2) Largura posterior; (A) Altura; (L1/C) Largura anterior/ Comprimento; (L2/C) Largura posterior/ Comprimento; (A/C) Altura/comprimento; (A/L1) Altura/largura anterior; (L2/L1) Largura posterior /largura anterior, utilizadas pela Análise Discriminante.
Fonte: O autor, 2015.

Dentre as 29 conchas de *Gundlachia* n. sp. 1, quatro conchas apresentaram a "identidade morfológica" de *Gundlachia radiata* e três conchas foram mais semelhantes a *G. ticaga*, obtendo 76% de acerto.

Gundlachia n. sp. 2, coletada no Estado do Rio de Janeiro, apresentou o índice de acerto menor 61% (Tabela 8). Apesar do maior número de conchas (73) ter a "identidade morfológica" do novo táxon, 39 conchas apresentaram seus índices conquiliométricos mais semelhantes com *G. ticaga*, cinco com *G. radiata* e três com *Gundlachia* n. sp. 1 (Tabela 8).

Tabela 8 - Matriz de classificação da Análise Discriminante (AD). Indicando quantos representantes das quatro espécies de *Gundlachia* possuem a "identidade morfológica" das espécies analisadas.

	(1)	**(2)**	**(3)**	**(4)**	**% acerto**
***G. radiata* (1)**	**45**	12	3	4	**70**
***Gundlachia* n. sp. 1 (2)**	4	**22**	0	3	**76**
***Gundlachia* n. sp. 2 (3)**	5	3	**73**	39	**61**
***G. ticaga* (4)**	2	5	37	**157**	**78**
Total	**56**	**42**	**113**	**203**	**72**

O uso da morfometria tem se mostrado uma ferramenta útil no auxílio das distinções das espécies (Lacerda 2011; Benaim e Absalão 2011; Miyahira 2014), apesar das amplas variações intra e interespecíficas (Lacerda et al. 2011), conforme apresentado nas descrições das distintas espécies de *Gundlachia*.

Independente dos índices de acertos das diferentes Matrizes de Classificação da AD, todas as análises apontaram que as oito espécies de *Gundlachia* analisadas, apresentam diferenças morfométricas significativas. Embora algumas representações espaciais da AD tenham parecido pouco contundentes (Figura 60 e 61), a maioria dos índices de acerto da Matriz de Classificação apontou para uma identidade morfométrica distinta das demais (Tabela 7 e 8), sugerindo índices de acertos razoáveis considerando a complexidade e variabilidade morfológica que esses pequenos moluscos límnicos estão submetidos.

Os resultados aqui apresentados reafirmam que os índices morfométricos (A/C, L2/C, L2/L1, A/L1 e L1/C) são, em geral, os melhores descritores das formas sendo indispensáveis para a compreensão e descrição das espécies, uma vez que o uso das relações métricas tende a ser mais informativo do que as medidas lineares que sofrem diretamente o efeito do ambiente sobre as conchas, conforme observado por diversos autores (McMahon e Whitehead 1987; McMahon 2004; Wullschleger e Jokela 2002; Lacerda et al. 2011; Barbosa e Santos 2014). Lacerda et al. (2011) relataram que os

maiores espécimes estavam em corpos hídricos com a maior disponibilidade de matéria orgânica disponível, influenciando desta forma as análises e diferenciando as populações. Além disso, o uso da análise multivariada, apesar de pouco utilizada tem se mostrado eficaz no auxílio da identificação e apresentação dos polimorfismos (Benaim e Absalão 2011; Barbosa e Santos 2014).

4.4 Filogenia baseada em dados morfológicos

A análise resultou em duas árvores, as quais foram submetidas ao consenso estrito, resultando em uma árvore igualmente parcimoniosa (L= 237; CI= 0,399; RI = 0,502), cuja topologia está apresentada na figura 63. A árvore encontrada foi (*B. ingae* + (*S. rosanae* + *F. fragilis*) + *F. gentilis*) + (Gênero nov. + (*Laevapex* + *A. dutrae*) + (*A. obliquus* + *Anisancylus* sp.) + (*U. concentricus* + (*G. saulcyana* + (*Gundlachia* sp. nov. + *G. lutzi*) + (*G. leucaspis* + *G. bakeri*) + (*G. ticaga* + (*G. radiata*-GO + *G. radiata*-BA) + (*G. radiata*-RJ + *G. radiata*-AC) + (*Hebetancylus* sp. + (*H. moricandi*-10412 + *H. moricandi*-10410)))))))))).

Os caracteres com o maior índice de consistência (Ci=1,00) foram os seguintes: 2 (projeção do ápice), 9 (disposição das esculturas na protoconcha), 12 (depressão apical da protoconcha), 17 (comprimento dos pelos periostracais), 22 (número de impressões musculares), 28 (forma do pé), 36 (número de cúspides do dente raquidiano), 57 (forma dos ácinos do ovoteste) e 67 (número de folículos da próstata). Treze caracteres obtiveram o Ci= 0,50; e 19 caracteres apresentaram o índice de consistência ≤0,20.

Apesar do baixo suporte da árvore, *a priori*, não se retira nenhum táxon de nenhum carácter, uma vez que essa primeira proposta está aberta para todas as críticas e sugestões que um trabalho de filogenia deve estar aberto para recebé-las. Em um segundo momento, poderá ser retirados os caracteres com baixo índice de consistência (os 19 que apresentaram mais de cinco passos [IC≤0,20]), remover os táxons com as estruturas morfológicas incompletas, ou ainda rever a codificação de alguns caracteres, se assim for necessário.

Esse parágrafo é um posicionamento contra a retirada de caracteres e táxons para a busca de um índice que seja publicável. Um exemplo, de acrodo com a tese foi a

inserção de dados sobre a morfologia interna de *B. ingae* (Figura 63, [nó 34]), coletada recentemente (Nov/2014) pela equipe do nosso laboratório. Com o auxílio da Dra. Ximena Ovando, consegui obter informações sobre a morfologia interna, que por hora só continha na descrição original de Lanzer (1991), devido as pequenas dimensões dos espécies coletados (≤ 2 mm). Com isso, *B. ingae* saiu de um clado terminal dentro de *Gundlachia*, para um clado basal na filogenia proposta (Figura 63). Isso reforça o posicionamento que a exposição dos dados com baixos suportes tendem, as vezes, auxiliar mais o avanço do conhecimento de um grupo do que a retirada dos mesmos. Alguns representantes africanos de *Burnupia*, com base em dados de biologia molecular, segundo Albrecht et al. (2004) formam um clado fora de Ancylidae e Planorbidae, sendo a forma da concha pateliforme uma convergência evolutiva surgida várias vezes dentro dos basomatóforos.

Por hora, não poderemos contribuir com essa discussão, todavia acreditamos que a incorporação de dados moleculares, de *B. ingae*, associados a morfologia comparada das espécies africanas permitirá que verifiquemos se *Burnupia* é um grupo monofilético ou não. Diante disto, poderemos rever o real status taxonômico da espécie sul-Americana.

O clado formado pelo nó 33 (figura 63) é suportado por duas sinapomorfias homoplásticas: pela perda da microescultura na teleoconcha (caráter 15) e pela perda das projeções filamentosas originadas no perióstraco (caráter 16). Este clado inclui todos os gêneros de Ancylinae, exceto *Burnupia*, que já foi discutida.

As duas espécies de *Ferrissia* caíram em clados distintos; *Ferrissia fragilis* + *S. rosanae* formado pelo nó 45, que compartilham duas sinapomorfias: forma geral da concha baixa de acordo com o índice da altura pelo comprimento (caráter 18) e a forma elíptica da impressão muscular anterior direita (caráter 23) e *F. gentilis* no nó 32. Esses três táxons necessitam de complementação da descrição da morfologia interna: *Ferrissia fragilis* apesar de ter sido recentemente estudada em vários aspectos da sua morfologia com MEV (concha e rádula) e biologia molecular por Lacerda et al. (2015), algumas estruturas internas necessitam ser complementadas.

Um outro problema que foi observado e deve ser re-analisado, é *S. rosanae*, este gênero foi descrito por Gutierrez-Gregoric (2012), mas necessita de uma série de complementações morfológicas, uma delas é o sistema digestório que apesar de ter sido explicitamente colocado que é semelhante aos demais ancilídeos, este não foi ilustrado e nem fotografado; e mediante a vários caracteres morfológicos distintos, como

posicionamento do ápice na região anterior, forma da rádula e de estruturas da morfologia interna, segundo conversas informais com Dra. Ovando, pode se tratar realmente de uma outra família. Por hora não conseguimos material, por diversas razões, para resolver essa questão, apesar de termos analisado o holótipo e ter tido acesso a um lote, proveniente de Iguaçu (UERJ 10575), que infelizmente não amplificou na parte molecular desse estudo. Contudo, essas espécies, exceto *S. rosanae*, posicionadas em clados mais basais, próximos ao grupo externo *A. fluviatilis*. Os resultados concordam com as propostas do Hubendick (1967, 1978), em que *Ancylus* + *Ferrissia*, provavelmente seriam os grupo-irmão dos demais ancilídeos, como por exemplo, *Laevapex*.

O clado formado pelo nó 31 (figura 63), é suportado por seis sinapomorfias, sendo uma não homoplástica: surgimento do desvio do ápice (caráter 4), das pontuações (caráter 8), do palpo oral bífido (caráter 21), de mais um lobo na pseudobrânquia (caráter 30), maior proporção do lobo ventral (caráter 31) e a presença de quatro a seis lamelas na pseudobrânquia (caráter 33). Com essas sinapomorfias o clado formado agrupa Gênero nov., proposto neste estudo, com os demais ancilídeos neotropicais (*Anisancylus* + (*Uncancylus* + (*Gundlachia* + *Hebetancylus*))), exceto *Laevapex*, que será discutido adiante.

O clado formado pelo nó 30 (figura 63) é suportado por cinco sinapomorfias, sendo uma não homoplástica: a disposição das esculturas na protoconcha passam a ser irregulares (caráter 9), aumento no número de regiões na protoconcha (caráter 10), voltaram a ter linhas radiais na teleoconcha (caráter 15, reversão), bulbo bucal passou a ser alongado (caráter 43) e a glândula nidamental passou a ser alongada (caráter 61). Este clado agrupa os chamados ancilídeos neotropicais (*Laevapex* sp. + *Anisancylus* spp.) + *Uncancylus* (*Gundlachia* + *Hebetancylus*)), baseado principalmente na sinapomorfia não homoplástica representada pelo caráter 09, o estado primitivo deste caráter era regular, conforme observado no grupo-externo e nos clados mais basais (ex. *B. ingae* e *Ferrissia*), assumiu uma condição derivada nesse clado com a presença de pontuações irregurales, que proporcionalmente irão variar entre os distintos gêneros e espécies nos clados mais derivados.

O clado formado pelo nó 29 (Figura 63) é suportado por três sinapomorfias, homoplásticas: redução proporcional da região com escultura da protoconcha (caráter 11), forma alongada da extremidade posterior do pé (caráter 29) e a porção terminal do sistema excretor não paralelo (caráter 54). Esse clado aloca *U. concentricus* como

grupo-irmão de *Gundlachia* + *Hebetancylus*.

O clado formado pelo nó 28 (Figura 63) que é o objetivo principal deste trabalho, é suportado por três sinapomorfias: o músculo anterior direito elíptico (caráter 23), o músculo posterior alongado (caráter 26) e a redução do número de ácinos do ovoteste (caráter 57). Segundo esse nó *Gundlachia* não formou um grupo monofilético, apesar de apresentar as sinapomorfias destacadas acima.

A presença de *Hebetancylus* no clado terminal, nó 43, tendo como grupo-irmão o clado de distintas populações de *G. radiata* ("Complexo *G. radiata"*), nos permitiu levantarmos duas hipóteses para explicar tal fato.

O primeiro diz respeito ao método, que segundo a figura 61, o nó 43 é sustentado por quatro sinapomorfias homoplásticas com baixo índice de consistência (média= 0,32), podendo por isso ser claramente criticado.

O segundo está pautado na experiência empírica sobre o grupo, que apesar dos baixos índices, *Hebetancylus* como grupo-irmão do "complexo *G. radiata"* não traz nenhum espanto. Pois compartilham de inúmeras semenhanças morfológicas, que em trabalho de campo e até mesmo em laboratório, são difíceis de serem distinguidos.

Tradicionalmente o gênero *Hebetancylus* é definido pela ausência de pontuações na protoconcha (Figura 63) caráter 7 (Ci=0,50)) já *Gundlachia*, inclusive *G. radiata* apresentam tal caráter. As demais sinapomorfias também estão relacionadas as conchas, sendo que em duas observa-se reversão, a ausência do desvio do ápice e presença de só duas regiões na protoconcha, ambos são estados plesiomórficos, que foram reassumidos nesse clado formado por diferentes espécies de *Hebetancylus*. Portanto, pode ser que a perda das pontuações da protoconcha seja um caráter apomórfico, conforme observado em *Hebetancylus*.

Dentro do clado formado por *Gundlachia* + *Hebetancylus*, temos um clado mais derivado formado pelo nó 27 (Figura 63) que é suportado por três sinapomorfias homoplásticas: ausência das linhas radiais na teleoconcha (caráter 15), mais do que dez cúspides no dente marginal (caráter 42) e até sete divertículos na vesícula seminal (caráter 60). Este clado não inclui *G. saulcyana*, que possui três autapomorfias sendo uma delas, tentáculos longos, uma homoplasia, que é uma sinapomorfia homoplástica que sustenta o nó 36, que agrupa *G. ticaga* e o "complexo *G. radiata*".

Os clados formados pelos nós 35 e 25 (Figura 63) são suportados por três e duas sinapomorfias homoplásticas, respectivamente. Cada um deles agrupa duas espécies de *Gundlachia*. O primeiro nó (35), agrupa *Gundlachia* n. sp. 2 + *G. lutzi*, embasado pelas

seguintes sinapomorfias: músculo anterior esquerdo alongado (caráter 24), de uma a três lamelas no lobo ventral da pseudobrânquia (caráter 33) e forma truncada das cúspides principais do dente raquidiano (caráter 37). Essas espécies apresentaram uma redução no número de lamelas na pseudobrânquia e ambas foram encontradas em ambientes lóticos (córregos e rios). Portanto, a redução do número de lâmelas no lobo ventral da pseudobrânquia nos permite relacionar a funcionalidade dessa estrutura, auxilio nas trocas gasosas por difusão, com o habitat desses animais em corpos hídricos lóticos, conforme já relatado por Santos (2003). Portanto, a mudança de estado desse caráter, à princípio, pode ser relacionada com a adaptação morfo-fisiológica para ambientes com maiores disponibilidade de oxigênio dissolvido, como é o caso dos ambientes lóticos.

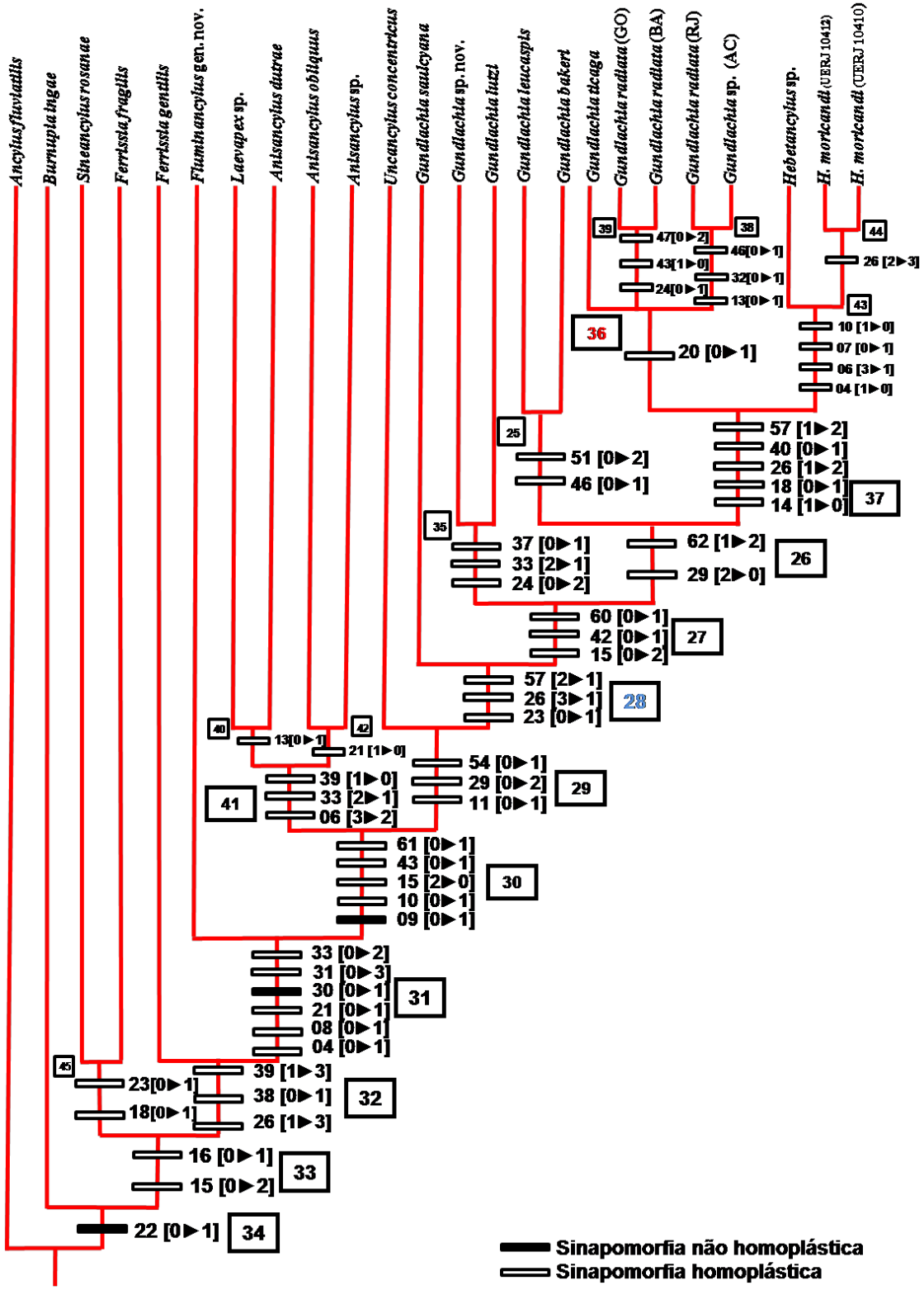
O segundo nó (25), agrupou *G. leucaspis* + *G. bakeri*, embasado por duas sinapomorfias homoplásticas: ápice com desvio (caráter 4) e o sistema excretor com a forma geométrica de um triângulo equilátero (caráter 51). Ambas sinapomorfias possuem baixo índice de consistência (0,33 e 0,20 respectivamente). Ambos taxa apresentaram inúmeras autapomorfias.

O clado formado pelo nó 37 (Figura 63) é suportado por cinco sinapomorfias: depressão apical rasa (caráter 14), concha baixa de acordo com o índice da altura pelo comprimento (caráter 18), músculo posterior arredondado (caráter 26), largura igual das três cúspides principais do dente lateral (caráter 40) e a presença de 21 a 35 ácinos no ovoteste (caráter 57). Esse clado é formado pelo ("complexo *G. radiata*" + *G. ticaga*) + *Hebetancylus* spp.)). Ao longo da sua série de transformação passaram a possuir como sinapomorfia um número maior de folículos no ovoteste e como reversão a depressão apical da concha. Além da forma geral baixa da concha, que é bastante marcante em seus representantes, exceto *G. ticaga*. Esse nó ainda é sustentado por mais duas sinapomorfias, ao todo são três caracteres de distintas estruturas das partes moles e mais duas da concha sustentando esse clado.

O clado formado pelo nó 41 (Figura 63) é suportado por três sinapomorfias, homoplásticas: forma da protoconcha obtusa (caráter 6), de uma a três lamelas no lobo ventral da pseudobrânquia (caráter 33) e a altura baixa da placa basal do dente raquidiano (caráter 39). Esse clado agrupa (*Laevapex* sp. + *Anisancylus* sp.) + (*A. obliquus* + *Anisancylus* sp.)), acreditamos que este clado, necessite de uma complementação no estudo da morfologia interna. Apesar de termos realizados MEV das conchas e a análise da morfologia externa, que atinge mais de 50% dos caracteres observados no atual trabalho a complementação se faz necessária para verificação do

real posicionamento de *Laevapex* sp., principalmente. A redução do número de lâmelas no lobo ventral da pseudobrânquia, novamente, nos levou a relacionar a funcionalidade dessa estrutura com o seu habitat, corpos hídricos lóticos, principalmente, os representantes de *Anisancylus*, conforme já tinha sido relatado por Santos (2003). Segundo a autora *A. dutrae* e *A. obliquus* foram encontrados aderidas a pedras em riachos com correnteza, condições semelhantes ao material coletado nesse trabalho. Portanto, a mudança de estado desse caráter, pode ser relacionada com a adaptação morfo-fisiológica para ambientes lóticos.

Figura 63 - Resultado da análise de parcimônia gerada pela matriz proposta através do consenso estrito.



Legenda: Primeira das duas árvores obtidas pelo TNT, utilizando os dados da matriz de caracteres morfológicos propostos. Os números indicam os caracteres suportando os nós e ao lado as suas respectivas mudanças de estados. Os números dos nós foram representados dentro dos quadrados.

Fonte: O autor, 2015.

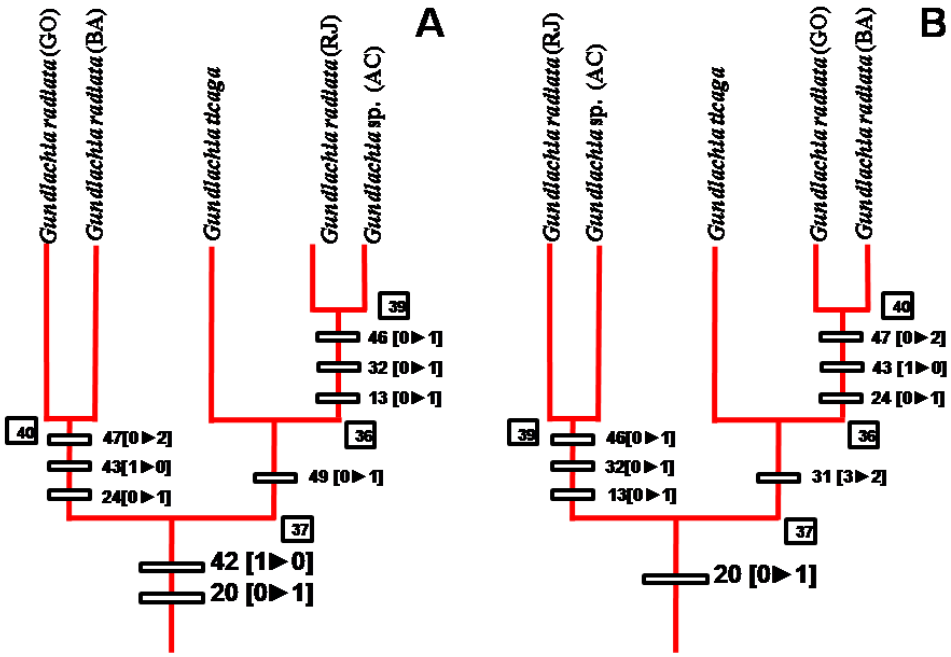
A única diferença entre as topologias das duas árvores geradas foi no nó 36 (Figura 63). A presença, na primeira árvore (Figura 64A), do grupo (*G. radiata*-GO + *G. radiata*-BA) + *G. ticaga* + (*G. radiata*-RJ + *Gundlachia* sp.-AC)) possui como sinapomorfias homoplásticas os caráteres 20 [estado 1 (tentáculo longo)] com Ci = 0,33 e 42 [estado 0 (até dez cúspides no dente marginal)] com Ci = 0,20. Nessa árvore *G. ticaga* apresentou-se como grupo-irmão de *G. radiata* proveniente Rio de Janeiro e *Gundlachia* sp. do Acre, embasada pela sinapomorfia homoplástica do caráter 49 [estado 1 (posição intermediária do sistema excretor em relação à borda do manto)] com Ci = 0,33 (Figura 64A).

No entanto, a segunda árvore (Figura 64B) formou o grupo (*G. radiata*-RJ + *Gundlachia* sp.-AC) + *G. ticaga* (*G. radiata*-GO + *G. radiata*-BA)) apresentando como sinapomorfia homoplástica somente o caráter 20. Nessa segunda topologia *G. ticaga* apresentou-se como grupo-irmão de *G. radiata* provenientes de Goiás e da Bahia, embasada pela sinapomorfia homoplástica do caráter 31[estado 2 (Largura igual do lobo ventral em relação ao dorsal da pseudobrânquia)] com Ci = 0,17 (Figura 64B).

É importante ressaltar que o caráter 31, observado no nó 36 da Figura 64B, apresentou um baixo índice de consistência (Ci), com seis passos, na nossa árvore. Esses caráteres homoplásticos, revelados pela análise cladística, poderão futuramente, ser retirados para verificar melhor as relações entre *G. ticaga*, *G. radiata* e *Gundlachia* sp. (Acre), baseadas em dados morfológicos. Contudo, a princípio, essas espécies compartilham a presença de um tentáculo longo, como sinapomorfia homoplástica.

A matriz de caracteres e táxons utilizados neste estudo pode ser observada no quadro 3.

Figura 64 - Resultado da análise de parcimônia gerada pela matriz proposta, apresentando as duas árvores geradas a partir da análise *Tradicional Reserch*.



Legenda: As duas árvores obtidas pelo TNT, utilizando os dados da matriz de caracteres morfológicos propostos. **(A)** Árvore 1, apresentando duas sinapomorfias homoplásticas no [nó 37]. **(B)** Árvore 2, apresentando duas sinapomorfias homoplásticas, apresentadas no [nó 37]. Os números indicam os caracteres suportando os nós e ao lado as suas respectivas mudanças de estados. Os números dos nós foram representados dentro dos quadrados.

Fonte: O autor, 2015.

Quadro 3 - Matriz de caracteres e táxons utilizados neste estudo. (continua).

	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	29	30	31	32	33	34	35
Ancylus fluviatilis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gundlachia bakeri	1	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	-	0	0	1	1	1	1	0	2	1	0	0	0	1	3	0	2	1	1
Gundlachia leucaspis	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	1	2	1	-	0	0	0	1	1	1	0	2	1	1	0	0	1	2	0	2	1	1
Gundlachia lutzi	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	1	2	1	-	0	0	0	1	1	0	2	2	1	1	0	2	1	3	0	1	1	1
Gundlachia ticaga	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	-	1	0	1	1	1	1	0	2	2	1	0	2	1	2	0	2	1	1
***Gundlachia* sp. n. Acre**	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	-	1	0	1	1	1	1	1	2	2	1	0	0	1	3	1	3	1	1
***Gundlachia radiata* RJ**	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	1	0	2	1	-	1	0	1	0	1	1	0	2	3	1	0	0	1	3	1	2	1	0
***Gundlachia radiata* BA**	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	0	2	1	-	1	0	1	1	1	1	1	2	2	1	0	0	1	2	0	2	1	1
***G. radiata* GO**	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	-	1	0	1	1	1	1	1	2	2	1	0	2	1	2	0	2	?	?
***G. saulcyana* (UERJ 46)**	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	-	0	1	1	1	1	1	0	2	1	1	?	2	?	?	?	2	1	1
***Gundlachia* sp. nov. (RJ)**	0	0	2	1	1	3	0	1	1	1	0	0	0	1	2	1	-	1	0	0	1	1	1	2	2	3	1	0	2	1	3	1	1	1	1
***A. dutrae* (UERJ 10404)**	0	0	2	1	2	2	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	-	0	0	?	?	1	?	?	?	?	1	?	?	?	?	?	?	?	?
***Anisancylus* sp. (UERJ 10404)**	0	0	2	1	2	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	-	0	0	0	0	1	0	0	2	1	1	0	1	1	2	0	1	1	0
***A. obliquus* (UERJ 10574)**	0	0	2	1	2	2	0	2	1	1	0	0	0	0	0	1	-	0	0	?	0	1	0	0	2	3	1	?	?	1	?	?	?	1	?
***U. concentricus* (UERJ 10414)**	0	0	2	1	2	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	2	2	3	1	0	2	1	3	0	2	1	1

(continuação)

	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	55	66	67	68	69	70
Ancylus fluviatilis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gundlachia bakeri	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	2	0	0	0	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	?	?	?	0	0	1
Gundlachia leucaspis	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	2	1	0	1	2	1	1	?	?	?	0	2	2	0	1	?	?	0	1	-
Gundlachia lutzi	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	2	1	1	1	1	-	0	1	0	0	0	1	-	0	1	-
Gundlachia ticaga	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	2	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	?	?	0	0	1
***Gundlachia* sp. n. Acre**	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	2	1	2	0	2	1	2	1	0	1	1	2	0	1	1	0	1	0	0	0
***Gundlachia radiata* RJ**	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	2	1	3	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
***Gundlachia radiata* BA**	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	2	1	2	1	2	1	0	1	1	2	0	?	1	0	1	0	0	0
***G. radiata* GO**	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	0	2	0	1	1	0	1	1	1	2	1	3	1	0	1	1	2	0	1	1	0	1	0	0	0
***G. saulcyana* (UERJ 46)**	0	0	1	?	0	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	2	1	1	1	1	0	1	?	?	?	1	0	0	?	?	?
***Gundlachia* sp. nov. (RJ)**	?	1	1	1	0	?	?	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	2	1	0	1	0	1	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0
***A. dutrae* (UERJ 10404)**	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
***Anisancylus* sp.** (UERJ 10404)	0	1	0	0	0	1	0	?	?	?	?	2	1	1	0	0	0	?	0	2	1	2	0	1	-	1	1	0	?	1	0	0	?	0	0
***A. obliquus* (UERJ 10574)**	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	2	1	2	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
***U. concentricus* (UERJ 10414)**	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	2	1	2	3	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0

(continuação)

	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	29	30	31	32	33	34	35
Hebetancylus **(UERJ 10413)**	0	0	2	0	-	1	1	-	-	0	-	0	1	0	2	1	-	1	0	0	1	1	1	1	2	2	1	0	1	1	3	0	2	1	1
H. moricandi **(UERJ 10410)**	0	0	2	0	-	1	1	-	-	0	-	0	0	0	2	1	-	1	0	0	1	1	1	0	2	3	1	0	0	?	?	?	?	?	?
H. moricandi **(UERJ 10412)**	2	0	2	0	-	1	1	-	-	0	-	0	0	0	2	1	-	1	0	0	1	1	1	2	2	3	1	0	0	1	3	0	2	?	?
Laevapex **sp. (UERJ 10415)**	1	0	2	0	-	2	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	-	1	1	0	1	1	1	0	1	3	1	0	0	1	1	0	1	0	1
Ferrissia fragilis	0	0	2	0	-	3	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	-	1	0	0	0	1	1	0	2	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Ferrissia gentilis	0	0	2	0	-	3	0	0	0	0	0	0	0	?	2	1	-	0	0	0	0	1	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Burnupia ingae	0	0	2	0	-	3	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Gênero novo	0	0	2	1	1	3	0	1	0	0	0	0	1	1	2	1	-	0	0	0	1	1	0	0	1	3	1	0	0	1	3	0	2	0	1
Sineancylus rosanae	0	1	1	0	-	2	1	-	-	-	-	1	-	-	2	1	-	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0

(conclusão).

	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	55	66	67	68	69	70
Hebetancylus **(UERJ 10413)**	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	?	1	1	0	1	0	1	2	1	2	2	1	-	0	2	1	0	1	0	1	0	0	0
H. moricandi **(UERJ 10410)**	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
H. moricandi **(UERJ 10412)**	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	?	1	1	0	1	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Laevapex **sp. (UERJ 10415)**	0	0	1	0	0	?	0	1	?	?	0	0	1	1	0	0	0	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Ferrissia fragilis	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	?	?	?	0	0	3	0	1	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
Ferrissia gentilis	1	0	1	1	0	1	1	0	?	?	?	0	0	1	0	3	0	0	0	2	1	?	1	0	1	?	?	?	?	?	?	?	0	0	1
Burnupia ingae	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	2	1	0	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	1	-
Gênero novo	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	2	1	2	2	1	-	0	1	0	1	?	1	-	1	-	-
Sineancylus rosanae	0	0	0	0	0	0	0	?	?	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	3	0	?	-	?	?	1	?	?	1	-	0	0	0

Legenda: Os caracteres, cujos estados não puderam ser verificados, foram codificados como "?" (*missing data*) e os não-aplicáveis como "–".
Fonte: O autor, 2015.

Apesar de ter analisado o sistema nervoso, por hora, não foi inserido na análise cladística, pois teria a necessidade de inserir outros representantes como grupo-externo, além dos já inseridos, que sairia do escopo desse trabalho. Contudo, as bases para tais comparações já estão em andamento. Os cinco caracteres do sistema nervoso e mais dois do sistema reprodutor, listados abaixo, permaneceram no corpo desse trabalho pois foram utilizados nas descrições das espécies.

Sistema nervoso

Segundo Hubendick (1964) dentro dos Basommatophora existe uma tendência à concentração do sistema nervoso central. O autor acrescentou, que a comissura visceral concentrada e com poucos gânglios representa um estágio evolucionário mais avançado, do que a comissura visceral menos concentrada.

Comissura cerebral: (0) ausente (1) presente.

A comissura cerebral localiza-se sobre o esôfago e liga os gânglios cerebrais. A maioria dos ancilídeos neotropicais apresenta a comissura cerebral (Figura 33J).

Largura da comissura cerebral: (0) espessa (1) fina.

A comissura cerebral é espessa quando a largura da comissura cerebral for maior do que a metade da largura do gânglio cerebral, conforme observado em *G. bakeri* (Figura 33J). Em contrapartida é fina, quando a largura da comissura cerebral for menor ou igual que a metade da largura do gânglio cerebral (Figura 40I).

Forma da porção intermediária do protocérebro: (0) convexa, (1) côncava.

Segundo Chase (2001), baseado nos desenhos de van Mol (1974), os ancilídeos possuem a forma convexa na porção intermediária e ter os nervos (tentacular, peritentacular externo e óptico) próximos (Chase 2001, fig. 3.4, BII), conforme observado em *G. bakeri* (Figura 33J); já os planorbídeos, possuem a forma côncava na porção intermediária e o nervo óptico afastado dos demais.

Comissura pediosa: (0) ausente (1) presente.

A comissura pediosa liga os dois gânglios pediosos que podem ser observados, em vista ventral. A presença da comissura pediosa já foi relatada por Hubendick (1962: fig: 25) em *A. lacustris*; apesar de não ficar evidente, pois a figura retratada está em vista lateral, o autor relatou que os gânglios pediosos são unidos por uma estrutura extremamente delgada que os deixam muito próximos, provavelmente se trata da comissura pediosa. Podemos ver a comissura pediosa bem evidente em *G. bakeri* (Figura 33K).

Comprimento da comissura pediosa: (0) curto (1) longo.

A comissura pediosa curta é quando os gânglios pediosos são tão próximos que não se observa a comissura, como relatado e figurado por Lanzer (1994: fig. 9) para *A. obliquus*; figurado por Marcus e Marcus (1962: fig. 11) para *G. ticaga e G. radiata* (Figura 23J). Em contrapartida a comissura longa é bem evidente conforme observado em *G. bakeri* (Figura 33K).

Sistema reprodutor

Comprimento do apêndice terminal do útero em relação a largura da glândula nidamental: (0) curto, (1) longo.

O comprimento do apêndice terminal do útero foi definida como curto, quando for menor do que a largura da glândula nidamental, aferida na porção mediana, conforme observado em *Gundlachia* n. sp. 1 (Figura 54E) e longa quando for maior ou igual, conforme foi visto no Gênero nov. e em *G. radiata* (Figura 23A).

Largura do apêndice terminal do útero: (0) fina, (1) grossa.

A largura do apêndice terminal do útero foi definida como fina, quando não ultrapassa a largura do ovispermoduto, conforme observado em *G. radiata* (Figura 54E) e grossa conforme foi visto no Gênero nov. e em *B. ingae* (Lanzer 1991: fig. 16).

4.5 **Filogenia baseada em dados moleculares**

Analisamos amostras dos sete dos oito gêneros ocorrentes na região neotropical que estão incluídos na sub-família Ancylinae, foram submetidos à análise molecular, com base nos marcadores moleculares COI e 16S.

As informações específicas sobre os táxons utilizados no estudo molecular, estão sumarizadas na tabela 9.

Tabela 9 - Representantes de Ancylinae utilizados no estudo molecular. (continua)

Táxon	Localidade	Coordenadas Geográficas	Coletor	UERJ	N° de novas sequencias (16S)/(COI)	Código GenBank
Ferrissia fragilis	Córrego do Abraão, Vila do Abrão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil	-23,141778°S -44,170056°O	I.C.B. Gonçalves, R.F. Ximenes	10402	(03)/(03)	KM224646 KM224647 KM224648
Ferrissia fragilis	Cachoeira da Mucuíba,Vargem Grande, RJ, Brasil	-22,956973°S - 43,49040°O	L.E.M. Lacerda, C.A.M. Alcântara e G.K.M. Nunes	10403	(03)/(03)	KM224649 KM224650 KM224651
Ferrissia fragilis	Rio das Velhas, na foz do riacho do ribeirão, Lassance, MG, Brasil	-17,97199°S -44,53364°O	L.E.M. Lacerda, I.C.B. Gonçalves e R.F. Ximenes	10417	(03)/(03)	KM224652 KM224653 KM224654
Ferrissia fragilis	Represa Três Marias, Felixlândia, MG, Brasil	-18,798000°S -44,95115°O	L.E.M. Lacerda	10420	(03)/(03)	KM224655 KM224656 KM224657
Gênero nov.	Brejo, Lopes Mendes, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil	-23.171036°S -44.125394°O	L.E.M. Lacerda, Braga, R.M.R. e S.T.V Souza.	10355	(03)/(03)	Não disponível
***Laevapex* sp.**	Lago da Iara, Bosque Municipal Rodrigues Alves, Belém, PA, Brasil	-1,430633°S -48,456901°O	S.B.Santos e C.B.Santos	10415	(03)/(03)	Não disponível
Hebetancylus excentricus	Hawaii, EUA	-	S.B. Santos e S.Thiengo		(02)/(02)	Não disponível
A. dutrae	Baturité, CE, Brasil	-04,338905°S -38,890913°O	I.C.B. Gonçalves, R.F. Ximenes	10404	(02)/(02)	Não disponível
***Anisancylus* sp.**	Rio São Gonçalo, Lassance, MG, Brasil	-17,878785°S -44,56644°O	L.E.M. Lacerda, I.C.B. Gonçalves, R.F. Ximenes	10419	(03)/(03)	Não disponível
A. obliquus	Cajúndel, Maipo, Chile	-	Gil-Azevedo	10574	(01)/(01)	Não disponível
Uncancylus concentricus	Arroio Canelon Grande, Santa Rosa, Canelones, Uruguai	-34,482389°S -56,040528°O	I.C. Miyahira, C. Clavijo e M.C.D. Mansur	10414	(03)/(03)	Não disponível

G. ticaga	Córrego do Abraão, Vila do Abraão, Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Brasil	-23,141778°S -44,170056°O	I.C.B. Gonçalves e R.F. Ximenes	10405	(03)/(03)	Não disponível
G. leucaspis	Rio Coxipó, Cuiabá, MT, Brasil	-15,629460°S -56,062547°O	L.E.M. Lacerda, I.C. Miyahira e J.B. Carneiro	10406	(02)/(02)	Não disponível
G. leucaspis	Rio Cuiabá, MT, Brasil	-15,648028°S -56,069056°O	L.E.M. Lacerda, I.C. Miyahira e J.B. Carneiro	10416	(03)/(03)	Não disponível
G. aff leucaspis	Represa Três Marias, Felixlândia, MG, Brasil	-18,798000°S -44,95115°O	L.E.M. Lacerda	10421	(03)/(03)	Não disponível
G. lutzi	Rio São Gonçalo, Lassance, MG, Brasil	-17,878785°S -44,56644°O	L.E.M. Lacerda, I.C.B. Gonçalves e R.F. Ximenes	10418	(03)/(03)	Não disponível
G. bakeri	Lago da Iara, Bosque Municipal Rodrigues Alves, Belém, PA, Brasil	-1,430633°S -48,456901°O	S.B.Santos e C.B.Santos	10408	(03)/(03)	Não disponível
G. radiata	Rio Guandu, Parque todos os Santos, Nova Iguaçu, RJ, Brasil	-22,80680°S -43,62474°O	L.E.M. Lacerda, M.C.D.Mansur e S.B.Santos	10409	(03)/(03)	Não disponível
G. radiata	Praia do Parafuso, Camaçari, Bahia, Brasil	-	L.E.M. Lacerda, I.C. Miyahira, G.K.M. Nunes e J.L. Oliveira	7475	(01)/(01)	Não disponível
G. radiata	Lago artificial, Várzea Grande, MT, Brasil	-15,657738°S -56,073991°O	L.E.M. Lacerda, I.C. Miyahira e J.B. Carneiro	10411	(03)/(03)	Não disponível
***Gundlachia* sp.**	Rio Juruá, Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil	-7,646952°S -72,674954°O	S.B.Santos, M.A.Fernandes e S.Thiengo	10407	(03)/(03)	Não disponível
Hebetancylus moricandi	Lagoa do Peixoto, Osório, RS, Brasil	-29,969639°S -50,230361°O	I.C. Miyahira, C. Clavijo e M.C.D.Mansur	10410	(03)/(03)	Não disponível
Hebetancylus moricandi	Arroio Colla, Passo Arbollo, Colonia, Uruguai	-34,318972°S -57,337694°O	I.C. Miyahira e C. Clavijo	10412	(02)/(02)	Não disponível
***Hebetancylus* sp.**	Praia do Veludo, Belém Novo, RS, Brasil	-	I.C. Miyahira, C. Clavijo e M.C.D.Mansur	10413	(02)/(02)	Não disponível

Legenda: Lotes utilizados para a realização do sequenciamento com os genes 16S e COI do mtDNA. Localidade de coleta, GPS (Datum WGS 84, em graus decimais), coletores, número da Coleção Malacológica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, o número de novas sequencias geradas para cada gene e o código do GenBank, quando disponível.

Fonte: O autor, 2015.

Esforço amostral: do total de material analisados, se considerou a extração de 93 amostras. Destas não foi obtido quantidade de material genômico "suficiente" para os seguintes táxons: *G. bakeri*, *G. lutzi*, *F. irrorata*, Gênero nov. e *Sineancylus rosanae*. Dos 24 táxons sequenciados, a quantificação variou de 16,3 a 68,3 ng/µL. Alguns espécimes simplesmente não amplificaram, principalmente as amostras coletadas a mais de um ano e preservadas em álcool sem ser o absoluto (100%) isso incluiu a maioria dos lotes já depositados na coleção. Outras, como foi o caso de *G. lutzi* cuja tentativa inicial de extração foi realizada em menos de seis meses após a coleta, também não foi bem sucedida. Nesse caso, acho que foi o sinergismo atuando sobre as condições de coleta (sol forte e altas temperaturas até o laboratório no Rio de Janeiro) e a qualidade do álcool comprado durante o campo. Passamos a adotar novos procedimentos técnicos, como por exemplo, levar pequenas quantidades de álcool absoluto para o campo, em ependorffs. Um simples procedimento que aumentou sensívelmente o sucesso das extrações e amplificações das amostras posteriormente coletadas após essa constatação. Esses problemas nos levaram a coletar novamente em alguns lugares (Bélém, PA; Lassance, MG; e Angra dos Reis, Rio de Janeiro, por exemplo), principalmente nas localidades-tipo de distintas espécies de *Gundlachia*.

Para o gene 16S foram amplificadas 72 amostras e mais 28 amostras para o gene COI do mtDNA. Essa diferença no número de amplificações foi devido as inúmeras adequações e aperfeiçoamento do método que inicialmente se deu com o gene 16S do mtDNA.

Ao final desse estudo 63 novas sequências foram geradas e analisadas para cada gene mitocondrial (Tabela 9). Essas sequências são inéditas para a maioria dos gêneros de moluscos límnicos pateliformes ocorrentes na América do Sul. Dos oito gêneros ocorrentes nessa região (Ovando et al. 2014), somente *Burnupia* e *Sineancylus* não constam em nossas análises (Tabela 9), apesar de termos tentado a amplificação conforme explicado anteriormente. *Gundlachia* foi o gênero com o maior número de amostras sequenciados, totalizando 29 novas sequências em sete espécies identificadas: *G. ticaga, G. leucaspis, G. lutzi, G. bakeri, G. radiata* e *Gundlachia* sp. nov. 1 (Acre) (Tabela 9).

Ferrissia foi o segundo grupo, em relação ao número de espécimes sequenciados (12 sequências), para mais detalhes sobre a divergência genética entre as quatro populações identificadas de *F. fragilis* na América do Sul (Lacerda et al. 2015).

Para *Hebetancylus* foram nove sequências inéditas, sendo cinco de *H. moricandi*

(UERJ 10410 e UERJ 10412), duas de *H. excentricus* (UERJ s/n) e duas de *Hebetancylus* sp. (UERJ 10413).

Anisancylus obteve sete novas sequências, sendo uma de *A. obliquus*, espécie tipo do gênero coletada nas proximidades da localidade-tipo no Chile; três de *A. dutrae* coletadas no Ceará e três de *Anisancylus* sp. coletada em Minas Gerais e se distingue das demais espécies, tanto por dados morfológicos quanto por moleculares.

Pela primeira vez um representante do gênero *Uncancylus* foi realmente sequenciado, como veremos a seguir. Para as três novas sequências deste gênero foi utilizado *U. concentricus* coletado nos arredores de Montevideo, Uruguai, localidade-tipo da espécie (Santos, 2003). Ainda foi sequenciado três espécimes do Pará pertencentes ao gênero *Laevapex*, segundo os caracteres morfológicos, da forma da concha e o padrão de impressões musculares.

Por fim, foi sequenciado três espécimes identificados como *Burnupia* sp. (Thiengo et al. 2001,2002b, 2004b; Santos et al. 2010; Lacerda 2011).

O banco de dados foi composto por fragmentos de em média 641 pares de bases para o gene mitocondrial COI e por 410 pares de bases, em média, para o gene 16S mtDNA.

Análises moleculares: O melhor modelo de substituição de nucleotídeos encontrado, segundo o critério de Akaike, foi o GTR+G, para o gene 16S e o GTR+G+I para o COI.

As análises de *Neighbor-Joining* (NJ) e *Maximun Likelihood* (ML) para o gene 16S são mostradas nas Figuras 65 a 67 e as análises referentes ao gene COI, ambos do mt DNA, são apresentadas nas Figuras 69 e 70, respectivamente.

As relações filogenéticas, calculadas pela ML, entre os gêneros de Ancylinae e os grupos externos utilizados (*Lymnaea*, *Physa*, *Burnupia* e *Biomphalaria*), em geral, apresentaram a mesma topologia, para os dois marcadores moleculares, 16S e COI (Figuras 65 e 68, respectivamente).

A monofilia de Ancylinae foi recuperada com o gene 16S, com 87% de suporte e também com o gene COI 79%. Contudo observamos que, em geral, o gene COI perde um pouco do sinal filogenético para as definições das relações entre os distintos gêneros, inclusive apresentando valores de suporte mais baixos (Figura 69), enquanto o gene 16S corroborou os resultados apresentados pela análise cladística (Figuras 65 e 66).

O gene 16S, para as duas análises, NJ e ML, mostraram, em geral, a mesma topologia e valores elevados de suporte (Figuras 65 e 66). Todavia existem quatro pontos que necessitam ser abordados. Para isso, apresentamos as árvores e indicamos em cada uma os distintos clados formados. No primeiro ponto a ser abordado, os clados (A1+A2+A3+A4, figuras 65 e 66), agrupam diferentes espécies de *Gundlachia* + *Hebetancylus* (inseridos no clado A1). Portanto, uma vez que *Hebetancylus moricandi* (UERJ 10410 e 10412) e *Hebetancylus* sp. (UERJ 10413), estão inclusos no mesmo clado de *G. radiata*, com alto valor de suporte (91%). Levantamos aqui duas hipóteses: (a) *Hebetancylus* pode ser sinômino de *Gundlachia*. Como *Gundlachia* foi descrita primeiro, pela Lei da Prioridade, *Hebetancylus* deveria ser sinonimizado. Essa proposta estaria de acordo com a de Hubendick (1964), que segundo o autor *Hebetancylus*, *Anisancylus* e *Uncancylus* deveriam ser considerados sinônimos de *Gundlachia* por não apresentarem diferenças genéricas e sim específicas. Além disso, os valores de suporte para o clado A1 formado por (*G. radiata* + *Hebetancylus* spp.) são altos, maior do que 58% para 16S e maior do que 66% para o gene COI (Figuras 67 e 70, respectivamente). Esse resultado foi semelhante ao observado na análise cladística (Figura 63).

Isso nos levou a pensar na hipótese (b). Esta segunda, leva em consideração o clado C, formado por *Hebetancylus excentricus*, grupo irmão de (*Uncancylus* + *Anisancylus* + (*Gundlachia* + *Hebetancylus* spp.), segundo as análises de NJ e ML do gene 16S (Figuras 65 e 66). A hipótese aqui levantada seria que a ausência de pontuações na protoconcha, observada em *Hebetancylus* spp. (clado A1), não deve ser considerado um caráter genérico, conforme vem sendo tratado na literatura (Lanzer 1996; Santos 2003; Ovando et al. 2014), portanto *H. moricandi* (UERJ 10410 e 10412) e *Hebetancylus* sp. (UERJ 10413) passariam a ser consideradas espécies do gênero *Gundlachia* e com isso *Gundlachia* passaria a ser um grupo monofilético, corroborando os nossos resultados da análise cladística (Figura 63) e molecular (Figura 66). Além disso, com base em dados morfológicos, *H. moricandi* já foi alocada em *Gundlachia* por diferentes autores (Hylton Scott 1953; Hubendick 1967; Castellanos 1982; Miquel 1988; Castellanos e Miquel 1991; Castellanos e Landoni 1995).

O segundo ponto está relacionado ao grupo-irmão de "*Gundlachia*", que foi representado pelo clado B (*Uncancylus* + *Anisancylus*), para ambos os genes mitocondriais 16S (Figuras 65 e 66) e COI (Figura 69). Além disso, o valor de suporte dessa relação foi baixo (< 50%), por hora não ficando definido o grupo-irmão de *Gundlachia*, com base em dados moleculares. Todavia a análise cladística indica

Uncancylus como grupo-irmão de *Gundlachia,* baseado em três sinapomorfias não homoplásticas (Figura 63, [nó 29]).

O terceiro ponto para ser destacado, com o gene 16S, é que segundo as análises por NJ e ML, o clado D formado por *Laevapex* sp. foi grupo-irmão do clado E, formado por *Ferrissia* + *Ancylus* (Figuras 65 e 66) com um alto valor de suporte 85 e 67%, respectivamente. Nossos resultados diferem, em parte, dos de Walther et al. (2010) onde Ancylinae formou dois clados: o primeiro, Ancylini (*Ferrissia* + (*Ancylus* + *Rhodacmea elatior*)) e o segundo Laevapecini (*Laevapex fuscus* + (*H. excentricus* + (*Uncancylus* sp. + *Gundlachia radiata*))), baseados em dados de DNA nuclear 28S, enquanto que os nossos dados, baseados no gene 16S, agruparam no mesmo clado representantes de Ancylini e Laevapecini (*Laevapex* sp. + (*Ferrissia* + *Ancylus*)) + (*H. excentricus* + (*Uncancylus* + *Anisancylus* + (*Gundlachia s.l.*))))). Conforme vimos no histórico do grupo as sub-famílias de "Ancylidae" variaram muito a sua composição.

Diante dos dados obtidos sugerimos utilizar, em parte, a proposição feita por Hannibal (1914) e seguida por Santos (1995 e 1999) os quais consideraram os gêneros de ancilídeos neotropicais (*Gundlachia s.l., Hebetancylus, Anisancylus, Uncancylus*) na família Ancylidae e os gêneros *Ancylus, Ferrissia* e *Laevapex* na família Laevapecidae. Segundo os nossos dados, esses dois grupos deveriam ser validados e serem utilizados na categoria de sub-família: Ancylinae e Laevapecinae, respectivamente.

Segundo os nossas análises NJ e ML, os dois genes alocaram os representantes de *Burnupia* como grupo-irmão de *Biomphalaria* (Planorbidae), fora dos Ancylinae corroborando com os resultados de Albrecht et al. (2004, 2007), que demonstrou que *Burnupia* pode ter sofrido convergência evolutiva.

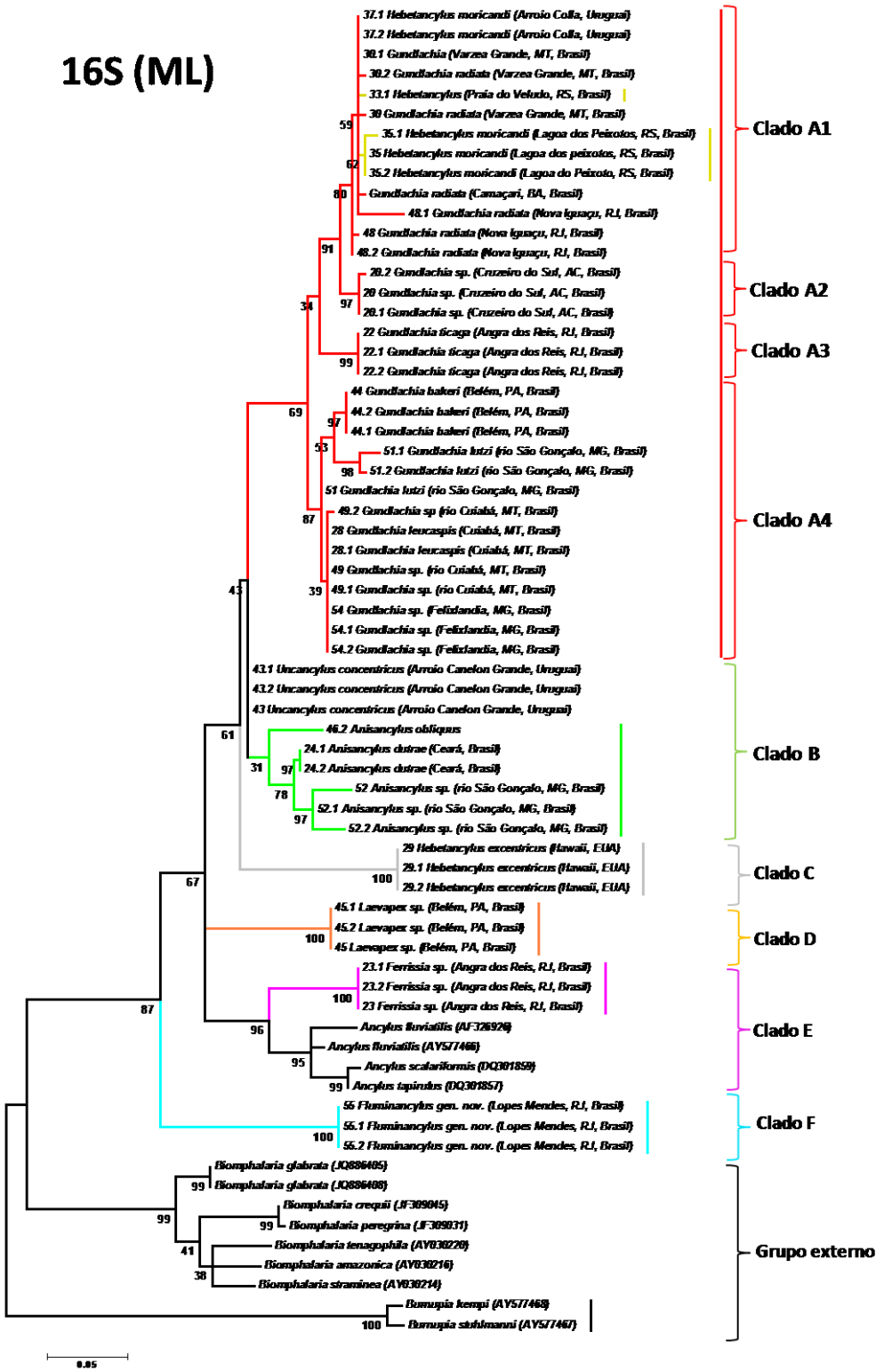
O clado F inclui os representantes de Gênero nov., que será formalmente descrito conforme o capítulo 6, artigo 23, inciso 23.6 (aplicação para atos nomenclaturais) do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN 1999).

Figura 65 - Árvore construída pelo método *Neighbor joining* a partir das novas sequências geradas do gene 16S do mtDNA de diferentes gêneros de Ancylidae.

Legenda: Os números abaixo dos ramos representam os valores de suporte *Bootstrap* gerados a partir de 10.000 réplicações utilizando o modelo K2P. Os representantes do grupo externo utilizados *Burnupia*, *Biomphalaria* e *Ancylus* foram apresentados com o número de acesso do GenBank ao lado. Diferentes cores foram utilizadas para evidenciar os gêneros de Ancylinae.

Fonte: O autor, 2015.

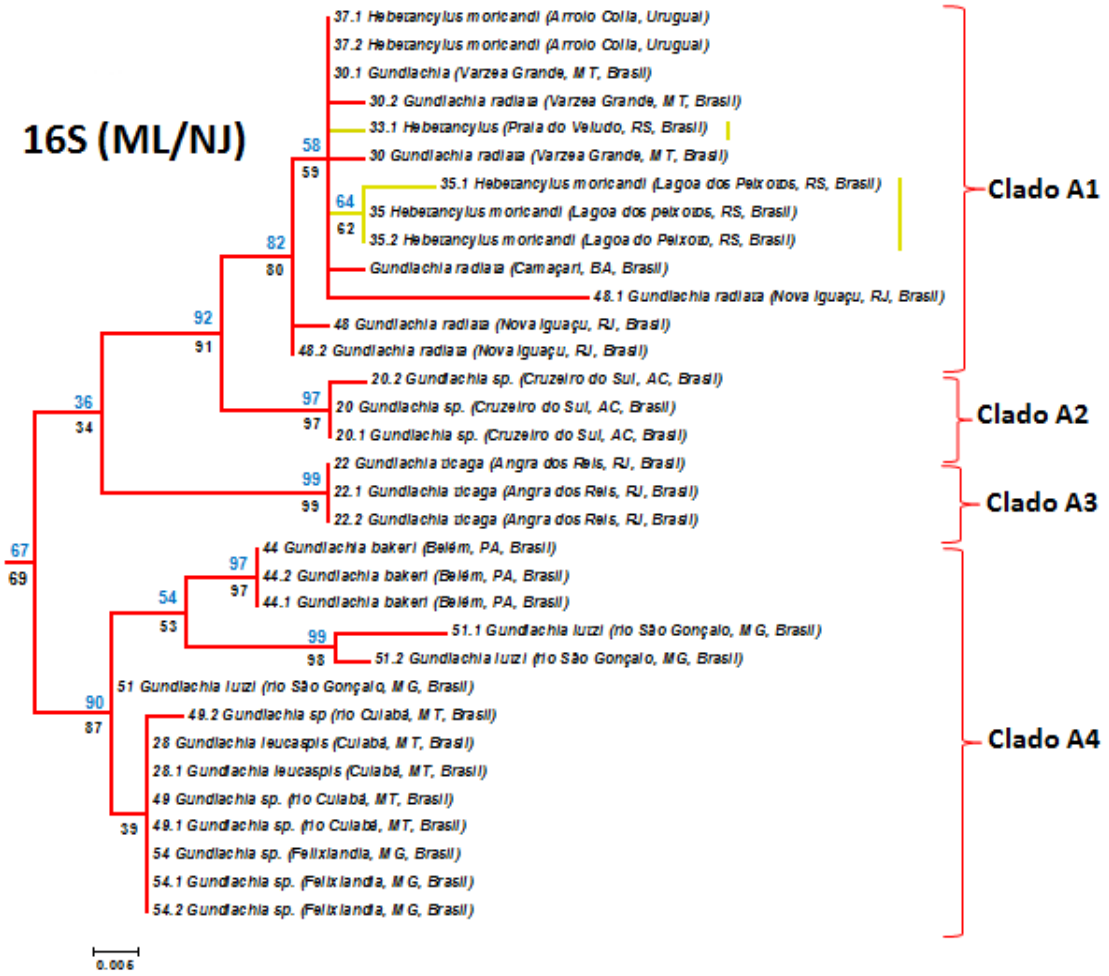
Figura 66 - Árvore construída pelo método heurístico de *Maximum likelihood* (ML) a partir das novas sequências geradas do gene 16S do mtDNA de diferentes gêneros de Ancylidae.



Legenda: Os números abaixo dos ramos representam os valores de suporte *Bootstrap* gerados a partir de 10.000 réplicações utilizando o modelo de evolução proposto pelo Critério de Akaike (*General Time Reversible + G*). Utilizamos *Burnupia*, *Biomphalaria* e *Ancylus* como representantes do grupo externo, o número de acesso do GenBank de cada sequência foram apresentadas ao lado. Diferentes cores foram utilizadas para evidenciar os gêneros de Ancylinae.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 67 - Árvore parcial construída pelo método heurístico de *Maximum likelihood* (ML) partir das novas sequências geradas do gene 16S do mtDNA para diferentes espécies de *Gundlachia*.



Legenda: Clado formado por diferentes espécies de *Gundlachia* + *Hebetancylus* spp. Os números acima dos ramos (em azul) representam os valores de suporte *Bootstrap* gerados, para a análise de Neighbor joining (NJ), a partir de 10.000 réplicações utilizando o modelo K2P e abaixo o suporte para a análise de *Maximum Likelihood* (ML).

Fonte: O autor, 2015.

A figura 67 apresenta em destaque as relações entre as diversas espécies de *Gundlachia*, com o gene 16S, e seus respectivos valores para NJ e ML, uma vez que apresentaram a mesma topologia.

A tabela 10 apresenta a média das divergências genéticas entre *Gundlachia* e os outros grupos analisados com o gene 16S e COI do mtDNA e a tabela 11 as divergências genéticas interespecíficas do gênero *Gundlachia* com o gene COI do mtDNA, para ambos os cálculos utilizamos a análise de Neighbor-joining (Tamura et al. 2007), com base no modelo de Kimura-2 parâmetros (K2P), para calcular a divergência genética entre as sequências geradas e as disponíveis no GenBank e utilizadas no estudo.

Tabela 10 - Média aritmética das divergências genéticas entre *Gundlachia* e os outros grupos analisados com o gene 16S e COI do mtDNA.

	Gundlachia	
	16S mtDNA	COI mtDNA
Gundlachia	0,033 ±0,010	0,065 ±0,013
Hebetancylus spp.	0,030 ±0,011	0,063 ±0,012
Uncancylus	0,052 ±0,013	0,106 ±0,018
Anisancylus	0,078 ±0,017	0,082 ±0,016
Hebetancylus excentricus	0,089 ±0,018	0,116 ±0,020
Laevapex	0,115 ±0,021	0,125 ±0,020
Ferrissia	0,126 ±0,022	0,110 ±0,019
Ancylus	0,124 ±0,022	0,131 ±0,021
Fluminancylus	0,130 ±0,022	0,138 ±0,021
Biomphalaria	0,199 ±0,029	0,137 ±0,022
Lymnaea diaphana	-	0,171 ±0,025
Physa pomilia	-	0,213 ±0,028
Burnupia	0,258 ±0,036	0,236 ±0,031

Legenda: Utilizamos a análise de *Neighbor-joining*, com o software MEGA (versão 5.20) (Tamura et al. 2007), com base no modelo de Kimura-2 parâmetros (K2P), para calcular a divergência genética entre as sequências geradas e as disponíveis no GenBank utilizadas no estudo. Os valores apresentados são referentes à média ±desvio padrão de cada conjunto de dados. Os valores em vermelho representam os baixos índices de divergência genética entre *Gundlachia* e *Hebetancylus* spp.

Fonte: O autor, 2015.

Tabela 11 - Divergências genéticas intra e interespecíficas do gênero *Gundlachia* com o gene COI do mtDNA.

	(1)	**(2)**	**(3)**	**(4)**	**(5)**	**(6)**
(1) *G. ticaga*	**0,000 ±0,000**	-	-	-	-	-
(2) *G. bakeri*	**0,070 ±0,015**	**0,012 ±0,005**	-	-	-	-
(3) *G. lutzi*	**0,064 ±0,014**	**0,044 ±0,011**	**0,039 ±0,009**	-	-	-
(4) *G. leucaspis*	**0,082 ±0,016**	**0,062 ±0,014**	**0,007 ±0,004**	**0,005 ±0,003**	-	-
(5) *Gundlachia* n. sp. 1	**0,083 ±0,016**	**0,088 ±0,016**	**0,092 ±0,017**	**0,100 ±0,018**	**0,000 ±0,000**	-
(6) *G. radiata*	**0,090 ±0,017**	**0,089 ±0,016**	**0,085 ±0,016**	**0,100 ±0,018**	**0,015 ±0,006**	**0,003 ±0,002**

Legenda: Utilizamos a análise de Neighbor-joining, com o software MEGA (versão 5.20) (Tamura et al. 2007), com base no modelo de Kimura-2 parâmetros (K2P), para calcular a divergência genética entre as sequências geradas e as disponíveis no GenBank utilizadas no estudo. Os valores apresentados são referentes à média ±desvio padrão de cada conjunto de dados. Os valores em vermelho representam a divergência genética intraespecífica.

Fonte: O autor, 2015.

Gundlachia e *Hebetancylus* spp. apresentaram as menores divergências genéticas para ambos dos genes mitocondriais (Tabela 10). A divergência genética observada entre as espécies de *Hebetancylus* foi menor (3,0%) do que a variação das espécies de *Gundlachia* (3,3%) para o gene 16S, exceto para *H. excentricus* (8,9%). Essa análise reafirma a hipótese levantada anteriormente, uma vez que *H. excentricus* possui uma divergência genética compatível com uma categoria genérica, conforme observado para os outros gêneros Neotropicais (Tabela 10); em contrapartida *H.*

moricandi e *Hebetancylus* sp. acumularam uma divergência genética que é compatível com a categoria específica, conforme observado na figura 11.

A divergência genética entre as cinco espécies de *Gundlachia* foi de 6,5% em média, a maior distância genética observada (10%) foi obtida entre *G. radiata* (Guilding, 1828) e *G. leucaspis* (Ancey, 1901), enquanto que as divergências entre *Gundlachia* e *Anisancylus* foram de 8,2%; em média. Estes resultados refletem a eficiência do gene COI para representar as relações intra e interespecíficas, já que conseguiu distinguir bem as espécies de *Gundlachia,* com índices baixos de divergência intraespecífica, não ultrapassando 3,9%, conforme observado para *G. lutzi*. Por outro lado as relações entre os gêneros obtiveram uma maior eficiência com o gene 16S cuja divergência foi de 7,8% entre *Gundlachia* e *Anisancylus*, enquanto que a divergência dentro de *Gundlachia* não ultrapassou 3,3%. *Uncancylus* foi o gênero com a menor distância genética de *Gundlachia* (5,2%).

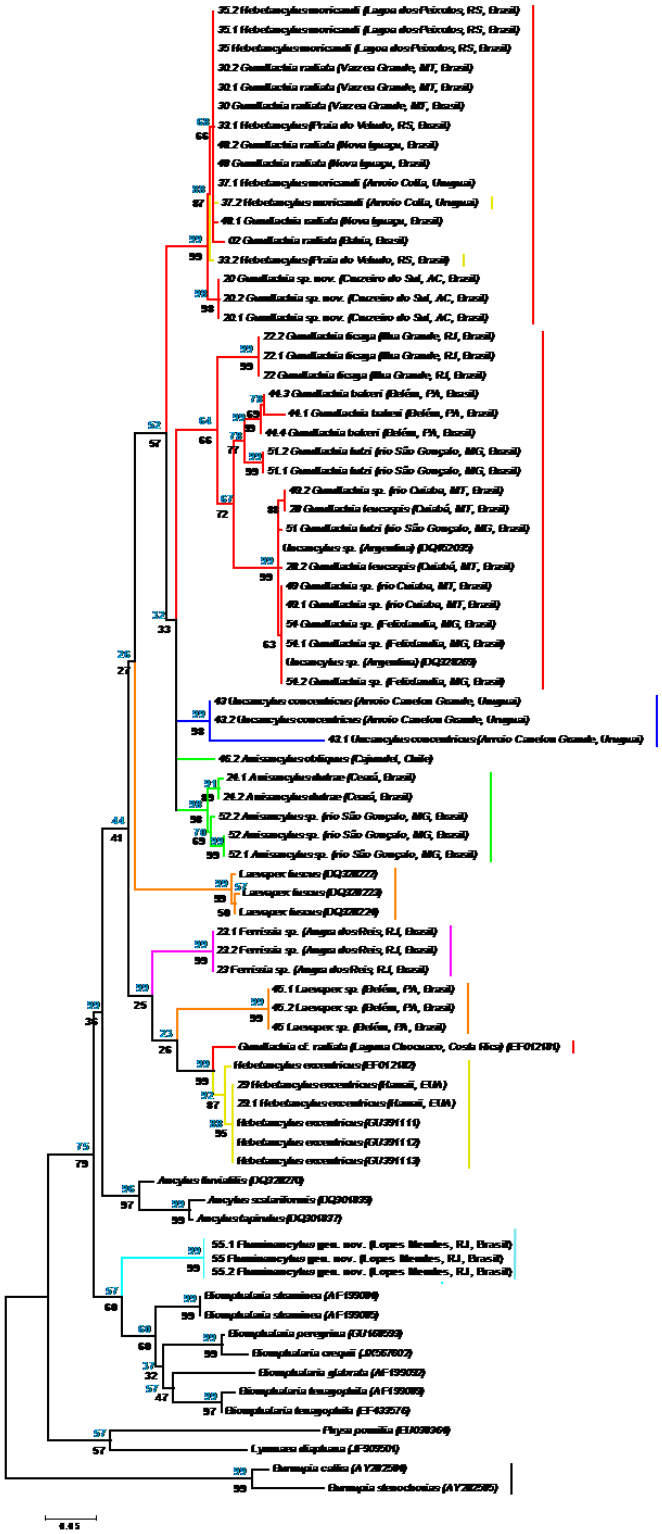
Portanto, o gene 16S foi mais eficiente para reconstruir a filogenia de Ancylinae, estabelecendo os limites de divergência genética entre os gêneros neotropicais, com base nesses conjunto de dados; enquanto que o gene COI, para esse conjunto de dados, indicou que a divergência até 3,9% deve ser considerada como intraespecífica e acima de 3,9 até 10% interespecífico.

O estudo acerca de *Ferrissia* sp. em comparação a *F. fragilis* gerou 12 novos genótipos, os quais são similares aos exemplares de *F. fragilis* existentes de diversos países (Sicília, Filipinas, Taiwan, Polônia e EUA). Esses genótipos apresentaram uma baixa divergência genética (0,2% a 0,8%) e altos valores de suporte, para ambas as análises, NJ e ML, sendo consideradas uma variação intraespecífica .

A divergência genética entre *Gundlachia* e o grupo-externo foi alta, 19,9% entre *Gundlachia* e *Biomphalaria* e 25,8% entre *Gundlachia* e *Burnupia*.

O gênero *Burnupia* não obteve relação com os demais gêneros de Ancylidae e se posicionou em um clado distinto. Estes resultados confirmaram os dados obtidos por Albrecht et al. (2004) para as espécies de *Burnupia* ocorrentes no Continente Africano.

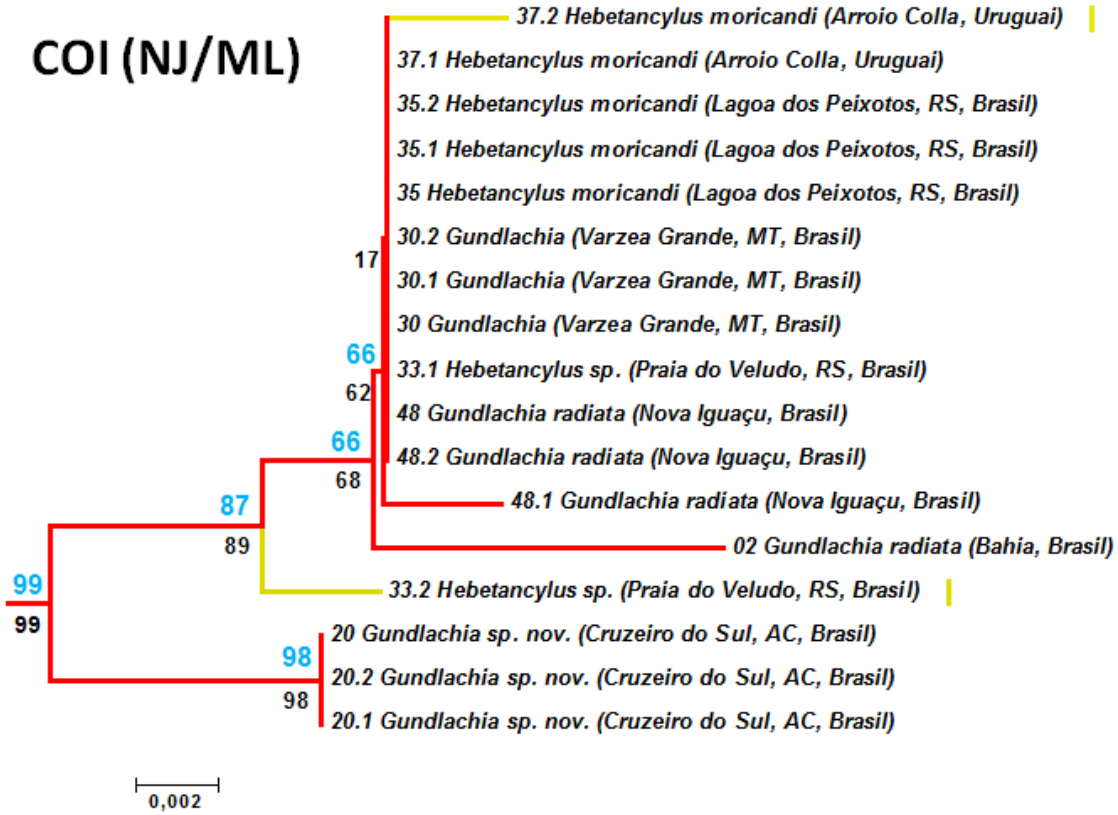
Figura 68 - Árvore construída pelo método heurístico de *Maximum likelihood* (ML) a partir das novas sequências geradas do gene COI do mtDNA de diferentes gêneros de Ancylidae.



Legenda: Os números abaixo dos ramos representam os valores de suporte *Bootstrap* gerados a partir de 10.000 réplicações utilizando o modelo de evolução proposto pelo Critério de Akaike (*General Time Reversible + G*). Utilizamos *Burnupia*, *Biomphalaria* e *Ancylus* como representantes do grupo externo, o número de acesso do GenBank de cada sequência foram apresentadas ao lado. Utilizamos diferentes cores para evidenciar os gêneros de Ancylinae.

Fonte: O autor, 2015.

Figura 69 - Árvore parcial de *Neighbor-Joining* (NJ) gerada a partir das novas sequências do gene COI do mtDNA para as populações que formam o "Complexo *G. radiata*" + *Hebetancylus* spp.



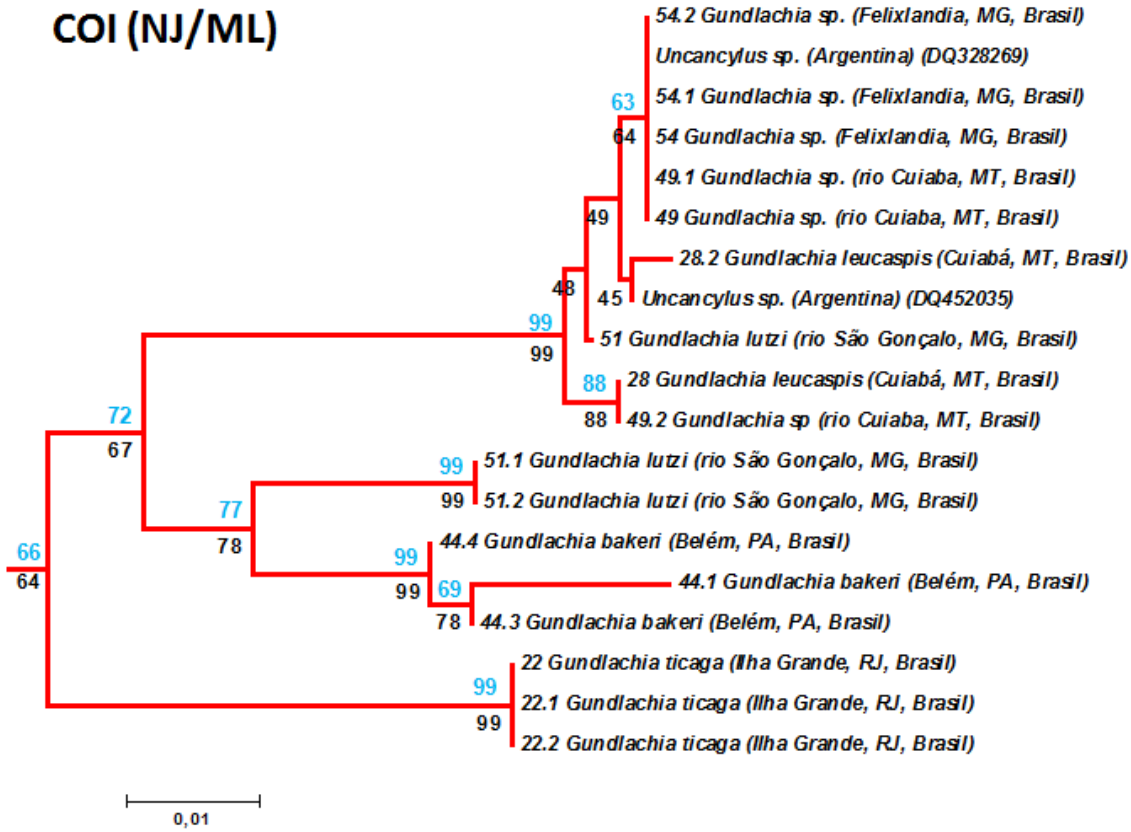
Legenda: Clado formado por diferentes espécies de *Gundlachia* + *Hebetancylus* spp. Os números acima dos ramos (em azul) representam os valores de suporte para a análise de *Maximum Likelihood* (ML) e abaixo o suporte gerado, para a análise de *Neighbor-Joining* (NJ), a partir de 10.000 réplicações utilizando o modelo K2P.

Fonte: O autor, 2015.

Na figura 69 se destaca o clado formado por *Gundlachia* n. sp. 1, encontrada no Acre, além de apresentar um alto valor de suporte para ambas análises, NJ e ML, possui o maior valor de divergência genética (1,3 ± 0,6%) dentre as espécies que compõem o clado chamado de "Complexo *G. radiata*" + *Hebetancylus* spp.

Enquanto a divergência entre as distintas populações de *G. radiata* e *Hebetancylus* spp. variaram entre 0,1% a 1,6%. *Gundlachia* n. sp. 1, do Acre, não apresentou divergência intraespecífica, enquanto *G. radiata* da Bahia apresentou 2,4% de divergência quando comparada com *Gundlachia* n. sp. 1.

Figura 70 - Árvore parcial de *Neighbor Joining* (NJ) gerada a partir das sequências do gene COI do mtDNA para diferentes espécies de *Gundlachia*.



Legenda: Clado formado por diferentes espécies de *Gundlachia*. Os números acima dos ramos (em azul) representam os valores de suporte para a análise de *Maximum Likelihood* (ML) e abaixo o suporte gerados, para a análise de Neighbor joining (NJ), a partir de 10.000 réplicações utilizando o modelo K2P.
Fonte: O autor, 2015.

O clado formado por distintas espécies de *Gundlachia* s.s com alto valor de suporte para ambas análises NJ e ML (figura 70). As espécies contidas nesse clado são as que apresentam pontuações irregulares na protoconcha, geralmente bem evidente e o ápice mais recurvado quando comparadas com o clado formado pelo complexo *G. radiata* + *Hebetancylus* spp. *Gundlachia ticaga* foi a espécie que apresentou o maior valor de divergência genética, variando de 6,4 a 9,0% dentre as espécies que compõem esse clado (Figura 70).

A menor divergência interespecífica observada dentro de *Gundlachia* foi entre *G. bakeri* e *G. lutzi* 4,4%. Enquanto que a distância entre *G. bakeri* e *G. leucaspis* foi maior (6,2%). Esse resultado difere do clado observado com base em dados morfológicos (Figura 63) que agrupou *G. bakeri* e *G. leucaspis* no mesmo clado.

Em contrapartida, *G. radiata* do rio Guandu, RJ apresentou uma menor

divergência genética (1,5%), quando comparada com *Gundlachia* n. sp. 1, do Acre; já quando a compara com *G. radiata* da Bahia a divergência aumenta (2,4%). Esse e os outros resultados estão de acordo com o que foi observado na análise morfológica.

Em geral, as topologias das árvores geradas com dados morfológicos e moleculares foram bem semelhantes. Algumas relações já conhecidas foram corroboradas, como a validade dos gêneros Neotropicais e algumas necessitam ser confirmadas como é o caso de *H. moricandi* e *Hebetancylus* sp.

5 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Considerações sobre as filogenias apresentadas: Segundo as descrições de Pilsbry (1924) em relação ao ápice da concha, o gênero *Uncancylus* é o que mais se distancia de *Gundlachia* por apresentar seu ápice pontiagudo, em forma de gancho e leves pontuações. Os gêneros *Hebetancylus* e *Anisancylus* possuem o ápice liso, arredondado e obtuso. Em relação à rádula, a de *Anisancylus* é a mais distinta, com quatro cúspides evidentes no dente central, enquanto que *Hebetancylus* possui o dente central um pouco menos assimétrico e uma placa basal mais larga do que *Gundlachia*.

Após a criação dos gêneros, Burch (1962) validou os quatro gêneros Neotropicais baseando-se nas impressões musculares. Alocou *Gundlachia* + *Hebetancylus* em Ferrissiinae e *Anisancylus* + *Uncancylus* em Laevapecinae.

A sinonimização entre *Gundlachia* e *Hebetancylus* já tinha cido proposta por outros autores. Hubendick (1964) propôs que os ancilídeos Neotropicais (*Gundlachia*, *Hebetancylus*, *Uncancylus* e *Anisancylus*), fossem sinonimizados com *Gundlachia*, por não apresentarem somente diferenças interespecíficas.

Fernández (1981) encontrou resultados semelhantes aos aqui encontrados, considerando somente três gêneros válidos (*Anisancylus*, *Hebetancylus* e *Uncancylus*). A autora argumentou que apesar de *Gundlachia* ter prioridade na sinonímia com *Hebetancylus*, este último apresenta uma descrição mais ampla e correta. Discordamos de ambas as propostas, mediante os dados até aqui apresentados, e conforme já proposto, acreditamos que a presença de pontuações na protoconcha não seja um caráter exclusivo de *Gundlachia*. Admitindo isso, as duas espécies de *Hebetancylus* analisadas (*Hebetancylus* sp. e *H. moricandi*) passariam a ser consideradas espécies de

Gundlachia. Todavia, antes de ser tomada essa decisão se faz necessária a revisão do material tipo de *H. moricandi*, assim como coletas na localidade-tipo, em Corrientes na Argentina, para a realização de análises moleculares.

Conforme vimos na matriz de distância genética (Tabela 10), a divergência entre as sequências de *Hebetancylus* spp. (UERJ 10410, 10412 e 10413) x *Gundlachia* foram semelhantes (6,3%), uma vez que a divergência entre as espécies de *Gundlachia* não ultrapassou 6,5%. Em contrapartida, a divergência entre *Gundlachia* x *H. excentricus* foi alta (11,6%, tabela 10). Isso reforça que "*Hebetancylus*" necessita ser melhor estudado.

Nossas análises moleculares (Figuras 66 e 68) corroboraram o resultado de Albrecht et al. (2004, 2007), demonstrando que *Burnupia* formou um clado fora de "Ancylidae" (=Ancylinae) e também de Planorbidae (=*Biomphalaria*). Segundo Albrecht et al. (2007) os demais taxa, considerados "Ancylidae", formaram um clado bem suportado, os Ancylini *s.l.*, através de dois clados: um incluindo *Ancylus* e (*Ferrissia* + *Pettancylus*) e outro com *Laevapex* (*Gundlachia* + *Hebetancylus*). Lacerda et al. (2015) verificaram que *Ferrissia* (*F. fragilis e F. rivularis*) + *Pettancylus* (GenBank [EF 012180]), pertencem ao mesmo clado e tendo uma pequena divergência genética entre esses genótipos, sugerindo que *Pettancylus* australiana utilizada é na verdade *F. fragilis*.

Nossos resultados com 16S (Figuras 65 e 66) corroboram o primeiro clado obtido por Albrecht et al. (2007) (*Ancylus* + *Ferrissia*). No entanto, discordamos do segundo clado, uma vez que *Gundlachia* (= *Gundlachia cf radiata* [EF 012181] da Costa Rica) utilizada pelos autores se agrupou no mesmo clado de *Hebetancylus excentricus* (Figura 68) em nossa analise. Portanto, conforme já discutido com base nos dados moleculares, os *H. excentricus* (Morelet, 1851) norte americanos, apresentam divergência genética suficiente para serem considerados um gênero fora de *Gundlachia* (Figura 65, 66 e 68). Contudo, os *Hebetancylus* spp. (*H. moricandi* e *Hebetancylus* sp.), com base em dados morfológicos e moleculares, colocam em dúvida a validae do grupo, uma vez que se agrupam no mesmo clado de *Gundlachia*, necessitando ser melhor investigado.

Acreditamos que inserindo os marcadores nucleares em conjunto com representantes das demais sub-famílias de Planorbidae, esse cenário pode ser modificado, o mais provável sendo a manutenção dos ancilídeos neotropicais na sub-família Ancylinae. Todavia uma segunda hipótese não pode ser descartada que é

Ancylinae ser elevada novamente a categoria de família, mediante a incorporação de novos representantes Sul-Americanos e marcadores nucleares, aos dados aqui estabelecidos.

CONCLUSÕES

Gundlachia é um gênero válido, claramente distinto dos demais gêneros de Ancylinae (*Anisancylus, Uncancylus, Laevapex, Ferrissia, Burnupia, Sineancylus* e Gênero n.), com base em dados morfológicos e moleculares.

A análise cladística e a molecular indicaram que *Hebetancylus moricandi e Hebetancylus* sp. seriam sinônimos de *Gundlachia radiata*. Todavia, este resultado necessita de estudos mais aprofundados.

A análise cladística demonstrou que *Uncancylus* é grupo-irmão de *Gundlachia.*

O gênero *Gundlachia* apresenta oito espécies, sendo seis já descritas (*G. radiata*, *G. leucaspis, G.lutzi, G. bakeri, G. ticaga* e *G. saulcyana*) e duas novas (*Gundlachia* n. sp. 1 e *Gundlachia* n. sp. 2).

A análise das relações de parentesco entre as espécies de *Gundlachia* demonstraram que *G. saulcyana* é a espécie mais basal: (*G. saulcyana* + (*Gundlachia* sp. nov. + *G. lutzi*) + (*G. leucaspis* + *G. bakeri*) + (*G. ticaga* + (*G. radiata*-GO + *G. radiata*-BA) + (*G. radiata*-RJ + *G. radiata*-AC) + (*Hebetancylus* sp. + (*H. moricandi*-10412 + *H. moricandi*-10410)))))))).

As análises moleculares corroboram os resultados da análise cladística, em parte. *Gundlachia* forma um clado monofilético, desde que se considere *Hebetancylus moricandi* sinônimo de *G. radiata*, fato que se baseia nas baixas divergências genéticas encontradas entre esses dois táxons. Segundo o método *Neighbor joining* geradas com o gene 16S do mtDNA, *Gundlachia* apresentou o clado formado por *Uncancylus* + *Anisancylus* como grupo-irmão.

Os resultados, com base nos dados moleculares, corroboram a posição sistemática de *Gundlachia* em Planorbidae, juntamente com *Uncancylus*, *Anisancylus*, *Laevapex*, *Ferrissia*, *Ancylus* e Gênero n.; formando um clado bem suportado, Ancylinae. Contudo, neste trabalho foi considerado a classificação tradicional Ancylidae, pois não foi testada esssa relação com base na morfologia.

Os caracteres com o maior índice de consistência (Ci=1,00) foram os seguintes: projeção do ápice, disposição da escultura na protoconcha, tamanho e profundidade da depressão apical da protoconcha, comprimento dos pelos periostracais, forma do pé, número de cúspides do dente raquidiano, forma dos ácinos do ovoteste e número de folículos da próstata.

Gundlachia radiata e *G. ticaga* são as espécies com distribuição geográfica mais ampla, ocorrendo em distintas bacias hidrográficas. *Gundlachia bakeri*, *G. lutzi*, *Gundlachia* n. sp. 1 e *Gundlachia* n. sp. 2 apresentaram distribuições mais restritas, com evidências de endemismo.

A diferenciação morfométrica associada aos dados morfológicos e moleculares para a maioria das espécies de *Gundlachia* corroboram a distinção e validade dos táxons aqui apresentados.

A associação de dados morfométricos, morfológicos e moleculares foi fundamental na distinção dos táxons e para a robustez dos mesmos.

REFERÊNCIAS

Adams H, Adams A 1858. Ancylinae. In: The Genera of Recente Mollusca. John van Voorst (ed.), London, 2: 265-268p.

Aguayo CG. 1938. Los moluscos fluviatilis cubanos. *Memórias da Sociedad Cubana Historia Natural* 12(3): 203-242.

Aguayo CG. 1946. *Gundlachia* y *Hebetancylus* en Cuba. *Revista de la Sociedad Malacologica "Carlos de La Torre"* 4: 55-62.

Albrecht C, Wilke T, Kuhn K, Streit B. 2004. Convergent evolution of shell shape in freshwater limpets: the African genus *Burnupia*. *Zoological Journal of the Linnean Society* 140: 577–586.

Albrecht C, Kuhn K e Streit B. 2007. A molecular phylogeny of Planorboidea (Gastropoda, Pulmonata). *Zoologica Scripta* 36: 27– 39.

Albrecht C, Föller K, Hauffe T, Clewing C, Wilke T. 2014. Invaders versus endemics: alien gastropod species in ancient Lake Ohrid. *Hydrobiologia* 739: 163–174, http://dx.doi.org/10.1007/s10750-013-1724-1

Aleixo A. 2007. Conceitos de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. *Revista Brasileira de Ornitologia* 15: 229-242.

Aleixo A. 2009. Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. *Megadiversidade* 5(1-2) 87-95.

Alroy J. 2003. Taxonomic inflation and body mass distributions in North American fossil mammals. *Journal of Mammalogy* 84: 431-443.

Amaral CRL, Brito PM, Silva DA, Carvalho EF. 2013. A new cryptic species of South American freshwater pufferfish of the genus *Colomesus* (Tetraodontidae), based on both morphology and DNA data. *PLoS ONE* 8(9): e74397, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0074397

Ancey MCF. 1901. Notes sur divers mollusques de L'Amérique du Sud accompagnées de descriptions d'espéces nouvelles**.** *Le Naturaliste* 23: 103-104.

Arango HG. 2005. *Bioestatística: Teórica e Computacional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 423p.

Arif IA, Khan HA. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal biodiversity and Conservation* 32: 9-17.

Barbosa FAR. 2001. Nova abordagem para a ecologia e conservação no Brasil: Programa Integrado de Ecologia (PIE) e Pesquisa Ecológicas de Longa Duração (PELD). In: Garay I & Dias B, editores. Conservação da biodiversidade em

ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento. Petrópolis: Editora Vozes. p 43-58.

Barbosa AB, Santos SB. 2014. Morphology of the shell of *Happiella* cf. *insularis* (Gastropoda: Heterobranchia: Systrophiidae) from three forest areas on Ilha Grande, Southeast Brazil. *Zoologia* 31(3): 230-238.

Basch PF. 1959. Status of the genus *Gundlachia* (Pulmonada, Ancylidae). *Occasional Papers, Museum of Zoology of the University of Michigan* 602: 1-9.

Benthem-Jutting WSS van. 1943. Über eine Sammlung nichtmariner Mollusken aus dem niederschlagsarmen Gebiete Nordost-Brasiliens. *Archiv fur Hydrobiologie* 39: 458-489.

Basch PF. 1963. A review of the recent freshwater limpet snails of North America. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College* 129: 401-461.

Benaim NP, Absalão RS. 2011. Deep sea *Yoldiella* (Pelecypoda: Protobranchia: Yoldiidae) from Campos Basin, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 91(2): 513-529.

Bouchet P, Rocroi JP. 2005. Classification and nomenclator of gastropods families. *Malacologia* 47(1-2): 1-396.

Bourguignat JR. 1853. Catalogue des espèces du genre *Ancylus*. *Journal de Conchyliologie* 4: 169-199.

Bourguignat JR. 1862. *Les Specileges Malacologiques*. Paris: Bailliers e Fils. 276 p.

Burch JB. 1962. Notes on the classification of freshwater limpets. *Annual Report of the American Malacological Union*: 8-9.

Burch JB. 1975. Scanning electron microscope studies of the shell apices of freshwater limpets. *Malacological Review* 7: 117-118.

Burch JB. 1982. Family Ancylidae. *In* DJ Klemm (ed.). Freshwater Snails (Mollusca: Gastropoda) of North America. *U. S. Environmental Protection Agency*, Cincinnati. 188-193p.

Cantanhede SPD, Fernandez MA, Mattos AC, Montresor LC, Silva-Souza N, Thiengo S. 2014. Freshwater gastropods of the Baixada maranhense microregion, na endemic área for schistosomiasis in the State of Maranhão, Brazil: I- qualitative study. *Revista Brasileira de Medicina tropical* 47(1): 79-85.

Castellanos ZA. 1982. Estado Actual de Ancylidae neotropicales. *Neotropica* 28: 101–102.

Castellanos ZA, Landoni NA. 1995. Mollusca Pelecypoda y Gastropoda. In: Lopretto EC, Tell G (eds). Ecosistemas de aguas continentales. *Metodologías para su estudio* La Plata: Ediciones Sur. 2: 759-801p.

Castellanos ZA, Miquel SE. 1991. Distribución de los Pulmonata Basommatophora. Fauna de Agua Dulce de la República Argentina, PROFADU (CONICET): Buenos Aires. 15(9): 3-11.

Chaves ACS. 2014. Análise de marcadores do DNA mitocondrial em anuros da Mata Atlântica. 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade do Estado do Rio de Janeiro, *Programa de Pós-Graduação em Biociências Nucleares*, Rio de Janeiro, 84p.

Crosse H. 1890. Faune malacologique terrestre et fluviatile de I' ile de Cuba. *Journal de Conchyliologie* 38: 173-335. (Citado em Santos, 1995).

Cuvier JLNF. 1817. *Le Régne Animal distribué d'après son organisation.* Paris: Libraire Déterville. 653p. (Citado em Mordan e Wade 2008).

Dance SP. 1966. *Shell collecting – Na illustrated history*. Faber and faber, 24 Russell Square, London. 374p.

Darrigran GA. 1999. Longitudinal distribution of molluscan communities en the Rio de La Plata estuary as indicators of enviromental conditions. *Malacological Review* (Suppl.8): 1-12.

Durrant PM. 1977. Some factors that affect the distribution of *Ancylus fluviatilus* (Müller) in the rivers systems of Great Britain. *Journal of Molluscan Studies* 43: 67-78.

Dornellas APS, Simone LRL. 2011. Annotated list of type specimens of mollusks deposited in Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brazil. Arquivos de *Zoologia* 42(1): 1-81.

Duncan C J. 1960. The evolution of the pulmonate genital system. *Proceedings of the Zoological Society of London* 134 (4): 601-609.

Engelman K. 1997. *SYSTAT 7.0*, 7ª edition. Chicago: SPSS Inc press. 421 p.

Fernández D. 1981. Mollusca Gasteropoda Ancylidae. In*:* Ringuelet R A, editor. Fauna de água doce de la República Argentina**.** Buenos Aires: Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura. p 100-109.

Fernandez MA, Mattos AC, Silva EF, Santos SB, Thiengo SC. 2014. A malacological survey in the Manso Power Plant, State of Mato Grosso, Brazil: new records of freshwater snails, including transmitters of schistosomiasis and exotic species. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 47(4):498-506.

Figueiredo FJ, Rizzo AE, Santos HRS. 2013. Zooglossário. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books. vol. 1. 337p.

Fischer 1883. Hygrophila. In: Manuel de Conchyliologie et de Paléontologie Conchyliologique. Paris, 3: 503-512p.

Fittkau EJ. 1981. Armut in der Vielfalt-Amazonien als Lebensraum für Weichtiere.

Mitteillungen Zoologische Gesellschaft Brannau 3: 329-342.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299.

Golding GB, Hanner R, Hebert PDN. 2009. Preface. *Molecular Ecology Resources* 9 (Suppl. s1): iv-vi, http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02654.x

Goodrick C,Van Der Schalie H. 1937. Mollusca of Péten and North Alta Vera Paz, Guatemala. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan* 34: l-50.

Gregoric GD, Nuñez V, Rumi A, Roche MA. 2006. Freshwater Gastropods from del Plata Basin, Argentina. Checklist and new locality records. *Comunicaciones de La Sociedad Malacológica del Uruguay* 9(89): 51-60.

Guilding L. 1828. Observations on the zoology of the Caribbean Islands. *Zoological Journal* 3: 527-544.

Gutiérrez Gregoric DE. 2012. *Anancylus rosanae* (Gastropoda: Pulmonata), new genus and new species, from Iguazú National Park, Argentina. Malacologia 55: 107-115.

Haas F. 1939. Zur kenntnis der Binnen-Mollusken NO-Brasiliens. Senckenbergiana. 21 (2/3): 254-278.

Haas F. 1949a. Land und Süsswassermollusken aus dem Amazonas Gebiete**.** *Archiv für Molluskenkund* 78: 149-156.

Haas F. 1949b. On fresh water Mollusks from the Amazonian region. *Anales del Instituto de Biologia de Mexico* 20: 301-314.

Haas F. 1953. Mollusks from Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil. *Fieldiana, Zoology* 34: 203-209.

Hannibal H. 1912. A synopsis of the Recent and Tertiary freshwater Mollusca of the California Province, based upon an ontogenetic classification. *Proceedings of the Malacological Society of London* 10: 112-211.

Hannibal H. 1914. Note on the classification of the Ancylidae. *The Nautilus* 28: 23-24.

Harrison AD. 1983. Identity of *Ferrissia irrorata* and *Gundlachia radiata*, Guilding's species of Ancylidae from St. Vincent. W.I. *Archiv für Molluskenkunde* 113: 7-15.

Harry HW, Hubendick B. 1964. The freshwater pulmonate Mollusca of Puerto Rico. Göteborgs Kungl Vetenskaps- Och. *Vitterhets- Samhalles Handlingar* 9: 60-72.

Haszprunar G. 1985. The Heterobranchia – a new concept of the phylogeny of the higher Gastropoda. *Zeitchrift für Zoologische Systematik und Evoluntionsforschung* 23: 15- 37.

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

Henning W. 1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, Urbana, IL.

Hodgson AN, Healy JM. 1998. Comparative sperm morphology of the pulmonate limpets *Trimusculus costatus*, *T. reticulatus* (Trimusculidae) and *Burnupia stenochorias* and *Ancylus fluviatilis* (Ancylidae). *Journal of Molluscan Studies* 64: 447–460.

Hovingh P. 2010. Distribution of a unique limpet (Gastropoda: Ancylidae) in the Colorado river drainage basin western North America. *Western North American Naturalist* 70(4): 508-515.

Hubendick B. 1947. Phylogenetic relations between the higher limnic Basommatophora. *Zoologische Beitrage aus Uppsala* 25: 141-164.

HUBENDIC KB 1962 Studies on Acroloxus (Moll. Basomm.). *Göterborgs Kungliga Vetenkaps- och Vitterhets Samhälles Handlingar* 9(2): 5-66.

Hubendick B. 1964. Studies on Ancylidae. The subgroups. *Göteborgs Kungl Vetenskap-Och Vitterhets- Samhalles Handlinger* 9B(6): 1-72.

Hubendick B. 1967. Studies on Ancylidae. The Australian, Pacific and Neotropical formgroups. *Göteborgs Kungl Vetenskap-Och Vitterhets- Samhalles Handlinger Zool.* 1: 1-52.

Hubendick B. 1978. Systematics and Comparative Morphology of the Basommatophora. *In*: V. Fretter and Peake, editors. Pulmonates, Vol. 2 A, p 1-48.

Hylton Scott MI. 1953. El género *Hemisinus* (Melaniidae) en la costa fluvial Argentina (Mol. Prosobr.). *Physis* 20: 438-443.

ICZN 1999. International Code of Zoological Nomenclature, 4th edition. xxix, 306 pp. The International Trust for Zoological Nomenclature, London.

Irmler U. 1975. Ecological studies of aquatic soil invertebrates in three inundation forests of Central-Amazonia. *Amazoniana* 5: 337-409.

Isaac NJB, Mallet J, Mace GM. 2004. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 464-469.

Jacobs, D.S., Eick, G.N., Schoeman, M.C. & Matthee, C.A. (2006) Cryptic species in an insetivorous bat, *Scotophilus dinganii*. *Journal of Mammalogy* 87: 161–170.

Jöger KM, Stöger I, Kano Y, Fukuda H, Knebelsberger T, Schrödl M. 2010. On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. *BMC Evolutionary Biology* 10: 1-20.

Jørgensen A, Kristensen TK, Stothard JR. 2004. An investigation of the ‘‘Ancyloplanorbidae’’ (Gastropoda, Pulmonata, Hygrophila): preliminary evidence from DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 778-787.

Klecka WR. 1982. *Discriminant Analysis*. Sage University Paper Series on Quantitative Applications in the Social Sciences, 07-0119. California: Sage Publications. 72 p.

Klussmann-Kolb A, Dinapoli A, Kuhn K, Streit B, Albrecht C. 2008. From sea to land and beyond - New insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). *BMC Evolutionary Biology* 8: 1-16.

Kotzian CB, Amaral, AMB. 2013. Diversity and distribution of mollusks along the Contas river in a tropical semiarid region (Caatinga), Northeastern Brazil. Biota Neotropica13(4):http://www.biotaneotropica.org.br/v13n4/en/abstract?inventory+bn03313042013
Krebs JC. 1998. *Ecological Methodology*. New York: Benjamin Cummings. 620 p.

Lacerda LEM 2011. Ancylidae (Mollusca, Heterobranchia, Pulmonata, Basommatophora) do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: morfologia, sistemática e distribuição geográfica. 2011. *Dissertação de Mestrado*. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 104 p.

Lacerda LEM, Miyahira IC, Santos SB. 2011. Shell morphology of the freshwater snail *Gundlachia ticaga* (Gastropoda, Ancylidae) from four sites in Ilha Grande, southeastern Brazil. *Zoologia* 28(3): 334–342.

Lacerda LEM, Miyahira IC, Santos SB. 2013. Mollusca, Gastropoda, Ancylidae, *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828): Distribution extension and first record to the state of Rio de Janeiro. *Check List* 9(1): 125-128.

Lacerda LEM, Santos SB. 2011. Mollusca, Gastropoda, Heterobranchia, “Ancylidae”, *Burnupia ingae* Lanzer, 1991: current distribution in Brazil. *Check List* 7(6): 862-864.

Lacerda LEM, Richau CS, Amaral CRL, Silva DA, Carvalho EF, Santos SB. 2015. *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863): a freshwater snail cryptic invader in Brazil revealed by morphological and molecular data. *Aquatic Invasions* 10(2): 157-168. doi: http://dx.doi.org/10.3391/ai.2015.10.2.04

Lanzer RM. 1991. Duas novas espécies de Ancylidae (Gastropoda: Basommatophora) para o sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 51: 703-719.

Lanzer RM. 1996. Ancylidae (Gastropoda: Basommatophora) na América do Sul: sistemática e distribuição. *Revista Brasileira de Zoologia* 13: 175-210.

Lanzer RM, Schäfer A. 1985. Padrões de distribuição de moluscos dulceaquícolas como indicadores de condições tróficas em lagoas costeiras do sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 45: 535-545.

Lima LC. 1995. Famílias Chilinidae, Ancylidae, Physidae e Lymnaeidae. In*:* Barbosa FS, organizador. Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p 80-89.

Lydeard C, Cowie RH, Ponder WF, Bogan AE, Bouchet P, Clark AS, Cummings KS, Frest TJ, Gargominy O, Herbert DG, Hershler R, Perez KE, Roth B, Seddon M, Strong EE, Thompson FG. 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience* 54(4): 321-330.

Malek EA. 1985. Freshwater and terrestrial snails of Saint Lucia, West Indies. *Nautilus* 100(4): 143-147.

Marcus E, Marcus E. 1962. On *Uncancylus ticagus*. *Boletim da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, Zoologia* 24: 217-245.

Mattos AC, Boaventura MFF, Fernandez MA, Thiengo SC. 2013. Larval trematodes in freshwater gastropods from Mato Grosso, Brazil: diversity and host-parasites relationships. Biota Neotropica 13(4): http://www.biotaneotropica.org.br/v13n4/en/abstract?article+bn00613042013

McMahon RF. 2004. A 15-year study of interannual shell shape variation in a population of freshwater limpets (Pulmonata: Basommatophora: Ancylidae). *American Malacological Bulletin* 19: 101-109.

McMahon RF, Whitehead BE. 1987. Environmental induction of shell morphometric variation in the European stream limpet, *Ancylus fluviatilis* (Müller) (Pulmonata: Basommatophora). *American Malacological Bulletin* 5: 105-124.

Meier-Brook C. 1979. The planorbid genus *Gyraulus* in Eurasia. Malacologia, Ann Arbor (18): 67-79.

Miquel SE. 1988. Estudio anatomohistológico del complejo peniano de dos especies de *Gundlachia* Pfeiffer, 1849 (Mollusca, Pulmonata, Ancylidae). *Memórias Sociedad de Ciencias Naturales La Salle* 48: 127–131.

Mirolli M. 1960. Morfologia, biologia e posizione sistemática di *Watsonula wautieri*, n.g., n.s. (Basommatophora, Ancylidae). *Memorias Instituto Italiano di Idrobiologia* 12: 121-162.

Miyahira IC, Lacerda LEM, Santos SB. 2009a. How many species are introduced every day? Some insights from a tropical insular stream in Brasil. *Tentacle* 18: 30-32.

Miyahira IC, Lacerda LEM, Santos SB. 2009b. Dispersão ativa de *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774) e sua influência no processo de invasão. *Informativo SBMa* 167: 3-5.

Mordan P, Wade C. 2008. Heterobranquia II: The Pulmonata. In*:* Ponder WF, Lindberg DR, editors. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. California: University of California Press. p 409-426.

Morgan JAT, DeJong RJ, Jung Y, Khallaayoune K, Kock S, Mkoji GM, Loker ES. 2002. A phylogeny of planorbid snails, with implications for the evolution of Schistosoma parasites. *Molecular phylogenetics and evolution* 25: 477-488.

Marrone F, Lo Brutto S, Arculeo M. 2011. Cryptic invasion in Southern Europe: The case of *Ferrissia fragilis* (Pulmonata: Ancylidae) Mediterranean populations. *Biologia* 66(3): 484-490.

Marrone F, Naser MD, Amaal GhY, Sacco F, Arculeo M. 2014. First record of the North American cryptic invader *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) (Mollusca: Gastropoda: Planorbidae) in the Middle East. *Zoology in the Middle East* 60(1): 39-45.

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

Ohlweiler FP, Lanzer RM. 1993. Morfologia da concha, rádula e mandíbula de *Gundlachia obliqua* (Broderip & Sowerby, 1832) como uma contribuição à sistemática de Ancylidae. *Biociências* 1: 121-149.

Ovando XMC, Lacerda LEM, Santos SB. 2011. Mollusca, Gastropoda, Heterobranchia, Ancylidae, *Gundlachia radiata* (Guilding, 1828): First record of occurrence for the Northwestern region of Argentina. *Check List* 7(3): 263-266.

Ovando XMC, Lacerda LEM, Santos SB. 2014. Taxonomy, morphology and distribution of Ancylinae (Gastropoda: Pulmonata: Planorbidae) in Argentina. *Journal of Conchology* 41(6): 707-730.

Palumbi SR. 1996. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Molecular Systematics, Hillis DM, Moritz C, Mable BK (Eds), Sinauer & Associates Inc., Sunderland, Massachusetts. p 205-247.

Paraense WL. 1981. Gastropoda. In*:* Hurlbert SH, Rodriguez G, Santos ND, editors. Aquatic Biota of Tropical South America 2: Anarthropoda. Califórnia: San Diego State University. p 200-207.

Pfeiffer L. 1849. Neue Molluskengattungen. *Zeistschrift für Malakozoologie* 6: 97-105.

Pfeiffer L. 1852. Bemerkungen über *Gundlachia*, *Latia* und *Ancylus. Zeistschr. F. Malakozool*. (9): 179-184.

Pfenninger M, Staubach S, Albrecht C, Streit B, Schwenk K. 2003. Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O.F. Müller, 1774). *Molecular Ecology* 12: 2731–2745.

Pilsbry HA. 1913. Notes on *Gundlachia* Pfr. Appendix to Fred Baker's paper on the land and fresh-water mollusks of the Stanford Expedition to Brazil. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 65: 668-671.

Pilsbry HA. 1924. South American land and freshwater mollusks. Notes and descriptions. II- The South American genera of Ancylidae. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 76: 54-59.

Pointier JP. 1976. Répartition locale et biogeography des mollusques dulçaquicoles de la Guadeloupe (Antilles françaises). *Malacological Review* 9: 85-103.

Poole KE, Downing JA. 2004. Relationships of declining mussel biodiversity to stream-reach and watershead characteristics in the agricultural landscape. *Journal of North American Benthological Society* 23(1): 114-125.

Primack RB, Rodrigues E. 2001. Biologia da Conservação. Londrina: Editora Vida. 328 p.

Ridgway R. 1912. Color Standards and Color Nomenclature. Washington, D.C. 44p.

Romero P, Ramíres R. 2011. Intraspecific divergence and DNA barcodes in *Systrophia helicycloides* (Gastropoda, Scolodontidae). *Revista Peruana de Biología* 18(2): 201-208.

Rumi A, Gútierrez Gregoric DE, Nuñez V, Darrigran G. 2008. Malacología Latinoamérica. Moluscos de agua dulce de Argentina. *Revista de Biología Tropical* 56(1): 77-111.

Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD. 2005. Zoologia dos Invertebrados – Uma abordagem funcional-evolutiva. Editora Roca: São Paulo. 1145p.

Russel-Hunter WD, McMahon RF. 1976. Evidence for functional protandry in a fresh-water basommatophoran limpet, *Laevapex fuscus*. *Transactions of the American Microscopical Society* 95: 174-182.

Santos SB. 1995. Estudo crítico dos "ancilideos" neotropicais como uma contribuição à sistemática de Ancylidae. (Mollusca: Gastropoda: Basommatophora). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 185 p.

Santos SB. 1999. A família "Ancylidae" na América do Sul: identificação e distribuição geográfica dos gêneros e suas implicações para a biogeografia e filogenia da família. In: Resúmenes del IV Congresso Latinoamericano de Malacología. Chile, Coquimbo. p 20-21.

Santos SB. 2000. Morfologia do sistema muscular e do sistema reprodutor de *Anisancylus obliquus* (Broderip & Sowerby) do Chile, como contribuição à sistemática de Ancylidae (Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora). *Revista Brasileira de Zoologia* 17: 995-1006.

Santos SB. 2003. Estado atual do conhecimento dos ancilídeos na América do Sul. (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata, Basommatophora). *Revista de Biologia Tropical* 50(Suppl. 3): 191-224.

Santos SB, Magalhães-Fraga SAP, Braun BS, Moulton TP. 2003. The first list of freshwater molluscs in the "Pedra Branca State Park", Rio de Janeiro, Brazil. *Biociências* 11(2): 185-186.

Santos SB, Miyahira IC, Lacerda LEM. 2007. First record of *Melanoides tuberculatus* (Müller, 1774) and *Biomphalaria tenagophila* (d'Orbigny, 1835) on Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brazil. *Biota Neotropica* 7: 361-364.

Santos SB, Lacerda LEM, Miyahira IC. 2009. *Uncancylus concentricus* (Mollusca, Lacerda Gastropoda, Ancylidae): New ocurrence in state of Rio de Janeiro, Brazil. *Check List* 5(3): 513-517.

Santos SB, Rodrigues CL, Nunes GKM, Barbosa AB, Lacerda LEM, Miyahira IC, Viana TA, Oliveira JL, Fonseca FC, Silva PSC. 2010. Estado do conhecimento da fauna de invertebrados não-marinhos da Ilha Grande (Angra dos Reis, RJ). *Oecologia Australis* 14(2): 490-532.

Schomburgk RH. 1848. A list of molluscous animal or shells found at Barbados and among the West Indians islands generally; p. 659-664. *In* R.H. Schomburgk (ed.). *The history of Barbados*. London: Longman, Brown, Green and Longmans, XXI + 722 p.

Sereno P. 2007. Logical basis for morphological charcters in phylogenetics. Cladistics 23: 565-587.

Shirokaya A, Röpstorf P. 2004. Morphology of ali-mentary system and shell adductor muscles in some species of endemic Baikalian Acroloxidae (Pulmonata, Basommatophora). *Ruthenica* 14(1): 57-70.

Simone LRL. 2006. Land and freshwater molluscs of Brazil. *EGB, Fapesp,* São Paulo: 390 p.

Simone LRL, Bunioto TC, Avelar WEP, Hayashi C. Biological aspects of *Gundlachia ticaga* from S.E. Brazil (Gastropoda: Basommatophora: Ancylidae). Archiv für Molluskenkund 141(1): 21-30.

Smith EA. 1896. A list of land and freshwater Mollusca of Trinidad. *Journal of Conchology* 8: 231-245.

Son MO. 2007. North American freshwater limpet *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) (Gastropoda: Planorbidae) – a cryptic invader in the northern black sea region. *Aquatic Invasions* 2(1): 55-58.

Son MO (2007) North American freshwater limpet *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) (Gastropoda: Planorbidae) – a cryptic invader in the northern black sea region. *Aquatic Invasions* 2(1): 55-58.

Strong EE, Gargominy O, Ponder WF, Bouchet P. 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia* 595: 149-166.

Sowerby GB, Fulton HC. 1911. Recent Mollusca: a catalogue of Cephalopoda, Pteropoda, Gastropoda and Scaphopoda:4-5.

Tate R. 1870. On the land and fresh-water Mollusca of Nicaragua. *American Journal of Conchology* 5: 151-162.

Thiele J. 1931. Handbuch der Systematiche Weichtieckunde. Gustav Fisher. 778 p.

Thiengo SR. 1995. Técnicas malacológicas: coleta; remessa de exemplares vivos; fixação e dissecção. *In*: Barbosa FS, organizador. Tópicos em Malacologia Médica. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. p 255-259.

Thiengo SC, Fernandez MA, Boaventura MF, Grault CE, Silva HFR, Mattos AC, Santos SB. 2001. 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.

Thiengo SC, Fernandez MA, Boaventura MF, Santos SB, Mattos AC. 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.

Thiengo SC, Fernandez MA, Boaventura MF, Magalhães MG, Santos SB. 2002b. 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.

Thiengo S C, Mattos A C, Boaventura M F & Fernandez M A. 2004a. 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.

Thiengo SC, Mattos AC, Boaventura MF, Loureiro MS, Santos SB, Fernandez MA. 2004b. Freshwater snails and schistosomiasis mansoni in the state of Rio de Janeiro, Brazil: V – Norte Fluminense mesoregion. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99(Suppl.1): 99-103.

Thiengo SC, Santos SB, Fernandez MA. 2005. Malacofauna límnica da área de influência do lago da usina hidrelétrica de Serra da Mesa, Goiás, Brasil. I Estudo qualitativo. *Revista Brasileira de Zoologia* 22(4): 867-874.

Thiengo SC, Mattos AC, Fernandez MA, Santos SB. 2006. 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.

Thompson FG. 2008. An annotated checklist and bibliography of the land and freshwater snails of Mexico and South America. *Gainesville: University of Florida*, 903 p.

Younés T. 2001. Ciência da biodiversidade: questões e desafios. In: Garay I & Dias B. Conservação da biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento. Petrópolis: Editora Vozes. p. 29-42.

Wägele H, Klussmann-Kolb A, Vonnemann V, Medina M. 2008. Heterobranquia I: The Ophisthobranchia. *In*: Ponder WF, Lindberg DR, editors. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. California: University of California Press. p 385-407.

Walker B. 1917. A new *Gundlachia* from Guatemala. *Nautilus* 31(2): 51- 53.

Walker B. 1918. A synopsis of the classification of the freswater Mollusca of North America, north of Mexico and a catalogue of the more recently described species, with notes. *Miscellaneous publications University of Michigan. Museum of Zoology* 6: 1-213.

Walker B. 1921. *Ancylus obscurus* Haldeman and species referred to it. *Nautilus* 34(3): 73-76.

Walker B. 1923. *The Ancylidae of South Africa***.** London: Edição do autor. 82 p.

Walker B. 1925. Notes on South American Ancylidae I. *Occasional Papers, Museum of Zoology of the University of Michigan* 157: 1-7.

Walther AC, Lee T, Burch JB, Ó Foighil D. 2006a. Confirmation that the North American ancylid *Ferrissia fragilis* (Tryon, 1863) is a cryptic invader of European and East Asian freshwater ecosystems. *Journal of Molluscan Studies* 72(3): 318-321.

Walther AC, Lee T, Burch JB, Ó Foighil D. 2006b. *Acroloxus lacustris* is not an ancylid: A case of misidentication involving the cryptic invader *Ferrissia fragilis* (Mollusca: Pulmonata: Hygrophila). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 271–275.

Walther AC, Lee T, Burch JB, Ó Foighil D. 2006c. *E Pluribus Unum*: a phylogenetic and phylogeographic reassessment of *Laevapex* (Pulmonata: Ancylidae), a North American genus of freshwater limpets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 501–516.

Walther AC, Burch JB, Ó Foighil D. 2010. Molecular phylogenetic revision of the freshwater limpet genus *Ferrissia* (Planorbidae: Ancylinae) in north america yields two species: *Ferrissia* (*Ferrissia*) *rivularis* and *Ferrissia* (*Kincaidilla*) *fragilis*. *Malacologia* 53(1):25-45.

Wautier J, Hernandez ML, Richardot M. 1966. Anatomie, histologie, et cycle vital de *Gundlachia wautieri* (mirolli) (Mollusque Basommatophore). *Annales des Sciences Naturelles* 12(8): 495-566.

Wethington AR, Lydeard C. 2007. A molecular phylogeny of Physidae (Gastropoda: Basommatophora) based on mitochondrial DNA sequences. *Journal of Molluscan Studies* 1-17. doi:10.1093/mollus/eym021

Wullschleger EB, Jokela J. 2002. Morphological plasticity and divergence in life-history traits between two closely related freshwater snails; *Lymnea ovata* and *Lymnaea peregra*. *Journal of Molluscan Studies* 68: 1-5.

Wurtz CB 1951 Catalogue of Ancylidae of South and Central America and the West Indies, with descrip-tion of new species. The Nautilus 64: 123-131.

Zar J H. 1999. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall. 663 p.

Zetek J. 1918. Los moluscos de la Republica del Panama. Panama: *Imprenta Nacional*. 80 p.

Zilch, A. 1960. Ancylidae. *In* Wenz, W. Handbuch der Paläozoologie: Gastropoda, Euthyneura. V. 6, pt. 2,128 pp. Gebruder Borntraeger. Berlin.

ANEXO A - Protocolo de extração de DNA adaptado para moluscos.

Objetivo

Digestão do tecido para o isolamento do DNA genômico.

Material

- Amostra (identificada, ex. 20 GR)
-Placa de petri
-Pipeta automática (20 µL e 1000µL)
-Pinça de ponta fina
-Estante
-Tubo eppendorf
-Banho-Maria (56° C)
-Bisturi e lâmina (+ descarte)
-Kit (QIAmp DNA FFPE Tissue – QIAamp MinElute column)

Procedimento

1) Coloque a amostra na placa de petri, descarte o álcool e macere a amostra com o uso de um bisturi (amostras de tamanhos muito pequenos só transportar para o eppendorf já identificado).

2) Pegue o Kit e ressuspenda o pellet em 180 µL de tampão ATL e adicione 20 µL de proteinase K e dê um vortex.

3) Incube a 56° C por 1:30 min (protocolo de anfíbios deixa over night).

4) Adicione 200 µL do tampão AL na amostra e dê um vortex.

5) Volte ao banho 56° C, por um rápido momento.

6) Adicione 200 µL de etanol (álcool absoluto), faça um vortex novamente e uma breve centrifugação (30 segundos).

7) Transfira o lisado para a coluna (acoplada ao tubo de 2 ml).

8) Centrifugue 8000 rpm por 1 min e transfira a coluna para um tubo novo.

9) Adicione 500 µL de tampão AW1 e centrifugue por 2 min a 8000 rpm. Após a centrifugação transfira a coluna para outro tubo novo.

10) Adicione 500 µL de tampão AW2 e centrifugue por 2 min a 8000 rpm. Após a centrifugação transfira a coluna para outro tubo novo (descarte o líquido).

11) Centrifugue a 14000 rpm por 50 min para secar a membrana (= coluna) completamente.

12) Coloque a membrana em um eppendorf e coloque 60 µL de tampão ATE no centro da membrana para ressuspender o DNA.

13) Incube por 2 min à temperatura ambiente e depois centrifugue na velocidade alta (14000 rpm) por 1 min.

14) Resultado final (± 20 µL de DNA extraído) pronto para quantificação.

ANEXO B - Quantificação do DNA genômico

Objetivo

Verificar a quantidade de DNA genômico extraído. Etapa realizada no 2º andar do PHLC, dentro do Departamento de genética no Laboratório de Biologia Molecular-Citogenética (sala 200A).

Material

-Amostra (2 µL de DNA extraído)

-Pipeta e ponteiras (0,5-10 µL)

-Água Milli-Q

-Bandeja

- Tampão ATE

-Papel toalha (pedaço)

- Aparelho NanoDrop 2000

Procedimento

1) Verificar se o computador está ligado e abrir o programa NanoDrop 2000.

2) Selecionar ácido nucléico.

3) Colocar 2 µL de tampão ATE.

4) Limpar o tampão ATE do aparelho usando o papel.

5) Adicionar 2 µL da amostra.

6) Apertar "mensure" e anotar os resultados.

Obs: No resultado da minha primeira amostra analisada (20 GR) quantificou 45 ng/µL de DNA.

ANEXO C - PCR (iniciador mitocondrial - 16S)

Objetivo

Realizar a amplificação do fragmento de DNA genômico específico.

Material

-Tampão Platinum [4x]
-Primer F (10 µM)16 Sar
-Primer R (10 µM) 16Sbr
-Água nucleasse free
-Taq Platinum (0,8 µL)
-Amostra de DNA 5 GB
-Amostra (identificada, ex. 20 GR)
-Pipeta automática (10 µL, 20 µL e 200 µL)
-Estante
-Tubo eppendorf (1 grande para MIX e 4 pequenos para amostra)
- Capela
- Ponteiras (10µl, 20 µL e 200 µL)

Procedimento

- Diluição do Primer 16 Sbr:

1)Fazer um Spin para homogeinizar o primer;

2) Colocar em um eppendorf 19µl H_20 nuclease free (pipeta 20µL) e 1µL Primer 16 Sbr (pipeta 10µl).

Cálculo para a diluição do *primer*:

$C_{inicial} \times V_{inicial} = C_{final} \times V_{final}$

200µM X Vi = 10µM X 20µL (volume desejado, ou seja, pode ser alterado)

Vi= 1µL

- **Atividade na capela:**

1) Pegue um tubo grande para preparar o MIX, retire-o sem tocar nos demais tubos dentro do pote.
2) Pegue 4 tubos pequenos de 0,2 (1 amostra + 1 controle positivo + 1 controle negativo + 1 para caso de erro)
3) Faça um MIX com volume total=72,8µl

- 44 µL H_2O nuclease free
- 20µl tampão platinum
- 4µl Primer 16 Sar e 16 Sbr
- 0,8µl TAQ platinum

Reagente	**1 tubo**	**4 tubos**
Tampão platinum	**5 µL**	**20 µL**
Primer F (10 µL)	**1 µL**	**4 µL**
Primer R (10 µL)	**1 µL**	**4 µL**
H_20 nuclease free	**11 µL**	**44 µL**
TAQ platinum	**0,2 µL**	**0,8 µL**
DNA	**2 µL**	**-**

4) Coloque 18,2µl de MIX + 2µl da amostra 20Gr no eppendorf do controle positivo.

5) Coloque 18, 2µl de MIX + 2 µL da amostra 5 Gb nos eppendorf da amostra, do controle negativo e no erro.

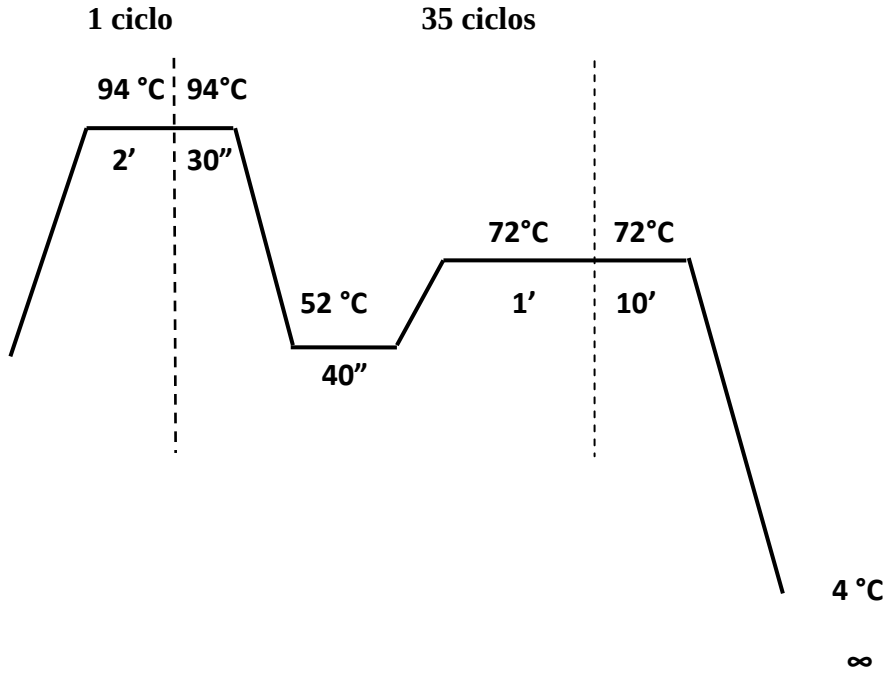
6) Passe álcool na capela e nas pipetas, assim como ligar o UV.

7) Anote no caderno e coloque os três tubos de PCR no termo ciclador.

8) Pegue uma caixa de ponteira 10µl dentro do armário da sala do sequenciador capilar e coloque uma fita de identificação.

9) Selecionar o método PCR_16S_Molusco (duração 1:45min).

Gráfico representativo do programa de ciclagem PCR_16S_Molusco:



10) Retire as amostras do termo ciclador e leve para visualização no gel de agarose.

Obs.:

1- O controle positivo foi realizado com uma amostra que já foi amplificada, a qual deverá conter os mesmos fragmentos amplificados anteriormente, indicando a realização correta do procedimento.

2- O controle negativo foi realizado com H_2O nuclease free, para não constar na amplificação o que garante a não contaminação da amostra.

ANEXO D - PCR (iniciador mitocondrial - COI)

(Fragmento entre 1100 F e 700 R pb)

Objetivo

Realizar a amplificação do fragmento de DNA genômico específico.

Material

-Tampão Platinum [4x]
-Primer F (10 µM) LCO 1490
-Primer R (10 µM) HCO 2198
-Água nucleasse free
-Taq Platinum (0,8 µL)
-Amostra de DNA 5 GB
-Amostra (identificada, ex. 20 GR)
-Pipeta automática (10 µL, 20 µL e 200 µL)
-Estante
-Tubo eppendorf (1 grande para MIX e 4 pequenos para amostra)
- Capela
- Ponteiras (10µl, 20 µL e 200 µL)

- **Atividade na capela:**

1) Pegue um tubo grande para preparar o MIX, retire-o sem tocar nos demais tubos dentro do pote.

2) Pegue 4 tubos pequenos de 0,2 (1 amostra + 1 controle positivo + 1 controle negativo + 1 para caso de erro)

3) Faça um MIX com volume total=72,8µl

- 31,2 µL H2O nuclease free
- 20µl tampão platinum
- 4µl Primer LCO 1490 e HCO 2198
- 0,8µl TAQ platinum

Reagente	1 tubo	4 tubos
Tampão platinum	5 µL	20 µL
Primer F (10 µL)	1 µL	4 µL
Primer R (10 µL)	1 µL	4 µL
H20 nuclease free	7,8 µL	31,2 µL
TAQ platinum	0,2 µL	0,8 µL
DNA	5 µL	-

4) Coloque 18,2µl de MIX + 2µl da amostra 20Gr no eppendorf do controle positivo.

5) Coloque 18, 2µl de MIX + 2 µL da amostra 5 Gb nos eppendorf da amostra, do controle negativo e no erro.

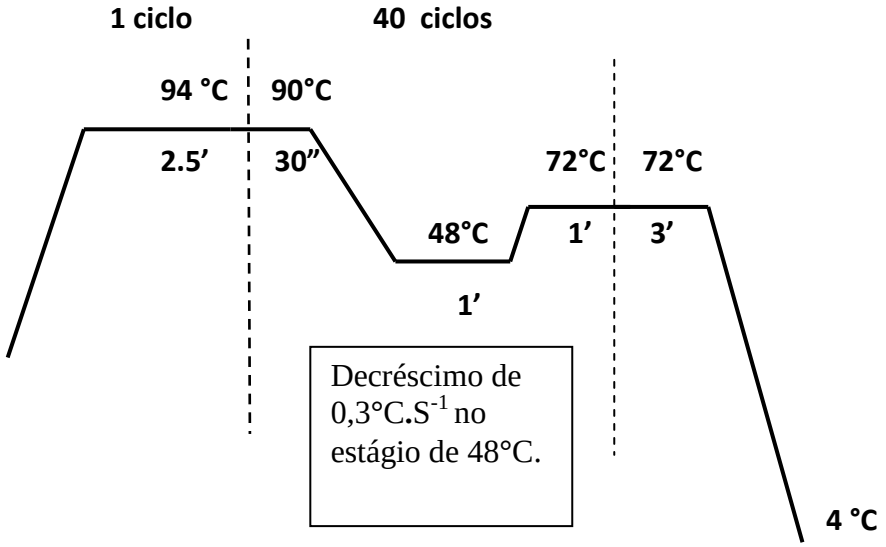
6) Passe álcool na capela e nas pipetas, assim como ligar o UV.

7) Coloque os três tubos de PCR no termo ciclador.

8) Coloque uma fita de identificação.

9) Selecionar o método nomeado PCR_Molusco (duração 1:45min), conforme ilustrado abaixo.

Programa de ciclagem para o *primer* COI_Molusco:



10) Retire as amostras do termo ciclador e leve para visualização no gel de agarose.

Obs.:

1- O controle positivo é efetuado com uma amostra a qual já foi amplificada, a qual deverá conter os mesmos fragmentos amplificados anteriormente, indicando a realização correta do procedimento.

2- O controle negativo é efetuado com H2O nuclease free, para não constar na amplificação o que garante a não contaminação da amostra.

ANEXO E - Preparo do gel de agarose 2%

Objetivo

Preparar o gel de agarose 2% no qual se aplicará o material genético para por meio da eletroforese, visualizar o tamanho do produto de amplificação da PCR.

Material

-Tampão TAE [1 X]
- Agarose em pó
- Papel alumínio (pedaço)
- Balança de precisão

OBS: Se o gel já estiver pronto, use o micro-ondas por 3 min. Cubra com plástico o erlenmayer e faça um furo. Resfrie com água corrente e aplique na cuba de eletroforese já com o pente inserido.

Procedimento de preparo do gel

1) Coloque o papel alumínio sobre a balança, tare e insira as 2 gramas de Agarose 2% em pó.

2) Despeje a agarose no erlenmayer e coloque 100ml de tampão.

3) Leve ao micro-ondas por 3 min para homogeneização (não balance o frasco para evitar a formação de bolhas).

ANEXO F - Eletroforese

Objetivo

Visualizar o tamanho do produto de amplificação da PCR, por meio da corrida em gel. Método baseado na repulsão das cargas elétricas e no tamanho do fragmento de DNA.

Material

- Base para o gel que vai para a cuba de eletroforese
- Cuba de eletroforese
- Controle positivo [5 µL]
- Controle negativo [5 µL]
- Amostra [5 µL]
- Azul de bromofenol [3 µL]
- Pipeta (10 µl)
- Ponteira 10 µl
- Ladder [3 µL]

Procedimento de eletroforese

1) Monte a placa para o gel de agarose (colocar o pente), despeje a agarose e espere-o esfriar (20').

2) Retire o pente e com uma espátula transfira o gel da placa para a cuba de eletroforese.

3) Aplique o corante azul de bromofenol numa placa lisa e depois as amostras (Ex. 20GR, C+ ,C- e Ladder).

4) Homogeneize e aplique cada amostra nos respectivos poços, ligue os eletrodos e selecione a voltagem baixa (75v).

5) Aguarde 40 min para a completa corrida do gel, não o deixe ultrapassar a linha roxa pois será perdido desta forma.

6) Após a corrida, desligue o aparelho e retire o gel.

ANEXO G - Visualização do gel de agarose

Objetivo

Verificar se houve a amplificação correta do PCR.

Material

- Brometo de etídio

-Água destilada

- Aparelho FM Bio II

Procedimento

1) Leve o gel ao brometo de etídio por 20’ e depois na água destilada por 8’.

2) Coloque o gel sobre o vidro e leve-o a máquina FM Bio II (Multi-View).

3) Selecionar o programa FM Bio II, dentro deste procurar Read Mage V. 1.5 ➔ New➔retirar (FM Bio II) autofoco e canal 1.

4) Visualize o canal 2 ➔Pre Read➔Selecione o gel.

5) Escanear canal 1 ➔Read➔Salve.

6) Salvar na pasta de arquivo.

7) File➔horizontal e para imprimir salvar em TIFF.

ANEXO H - Purificação Exosap

Objetivo

Retirar os reagentes da reação de amplificação.

Material

- Exosap

-Produto de PCR (DNA)

Procedimento

1) Separar eppendorfs PCR (0,2 ml).

2) Identificar com amostra EXO.

3) Colocar primeiro 5µl da amostra e depois 2µl do exosap.

4) Leve ao aparelho e selecione o programa de ciclagem 37°C por 15’ e 85°C por 15’.

5) Retire o material e faça o sequenciamento

OBS: O controle negativo não é incluído por já estar com o resultado correto, sem qualquer contaminação.

ANEXO I - PCR de sequenciamento - Big Die

Objetivo

Introduzir os ddNTPs marcados com fluorescência.

Material

- Big Die
- Tampão
- Primer F
- Primer R
- Pipeta
- tubo coletor (0,5 ml)
- eppendorf (0,2 ml)
- Máquina de PCR
- Amostra

Obs.: A composição do MIX é dada pelo Big Dye e pelo Tampão.

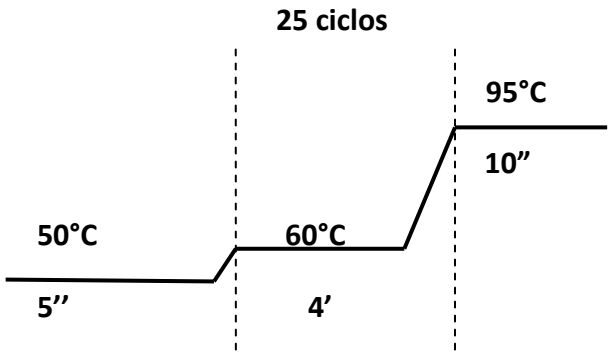
Reagente	1 tubo	5 tubos
Big Dye	2 µL	10 µL
Tampão	2 µL	10 µL
Primer F	3 µL	6 µL
Primer R	3 µL	6 µL
Amostra	3 µL	

Diluição do Primer:
Primer original [200 µM]
Ci X Vi = Cf X Vf
200 µM X Vi = 10 µM X 20 µL
Vi = 200/200
Vi= 1 µL de primer + 19 µL de nuclease free = 20 µL de primer diluído

Procedimento

1) Marque a máquina de PCR.
2) Separe e identifique os eppendorf (0,2 mL) para sequências Forward e Reverse.
3) Separe dois tudos de 0,5 mL para preparar o MIX, sendo um para o Primer F e outro para o Primer R.
4) Separe o Big Dye e o Tampão.
5) Separe os Primers.

Programa de ciclagem do PCR sequenciamento: BigDie.



ANEXO J - Purificação por Sephadex G-50

Objetivo:

Retirada do excesso de reagentes da reação de sequenciamento por exclusão em coluna de gel de filtração.

Material:

- Centrífuga
- Pipeta (10 µL, 1000 µL)
- Coluna com resina
- Sephadex G-50 (3,3 g)
- Água mili Q (50 mL)
- Tubo coletor

Procedimento:

1) Primeiramente, pipete 750 mL de água mili Q para uma coluna com filtro e centrifugue duas vezes por 90 segundos na velocidade 5.500 x, a fim de lavar as colunas.
2) Jogue a água mili Q fora, mas segurando a coluna entre os dedos.
3) Marque na planilha do LDD, na parede em cima da centrífuga, o dia e o número de amostras.
4) Agite o Sephadex e coloque 750 µL na coluna.
5) Centrifugue por 90 segundos na velocidade 1 (6500 rpm).
6) Descarte a água que o Sephadex perdeu, segurando a coluna entre os dedos e jogando-a fora do tubo e centrifugue por 90 segundos.
7) Separe quatro eppendorf de 1,5 mL e numere-os.
8) Pipete 10 µL da amostra bem no meio da resina
9) Centrifugue por 180 segundos com a tampa da coluna voltada para baixo.
10) Retire a coluna da centrífuga, jogue a resina fora e lave a coluna quatro vezes com a água mili Q depois a guarde na caixa de colunas lavadas, guarde a amostra.
11) Limpe a centrífuga com álcool 70%.

ANEXO K - Sequenciamento automático - ABI 3500

Objetivo

Determinar a sequência exata dos nucleotídeos que compõem o fragmento de DNA, através da eletroforese capilar.

Material

- Amostra sequenciada (06 µL)
- Formamida (08 µL)
- Água milliQ
- Placa do sequenciador automático

Procedimento

1) Aplique as amostras na placa, anote qual o nome e o número de amostras na planilha, que estará plastificada e com marcações para os poços.
2) Aplique 6 µL da amostra, seguido de 8 µL de formamida em cada poço.
   Obs.: caso a coluna da placa esteja incompleta completar o restante com água mili Q 14 µL.
3) Identifique as amostras no programa 3500 no *Plate View*.
4) Seleção dos parâmetros de corrida.

Assays → *Actions* → *add from Library* → *standert sequency* POP 7 → BT BDTV 3.1_PA_*Protocol* → *Add to plate*.

File name conventions → *Action* → *add to Library* → *add to plate*.

Result groups → *add to library* → *add to plate* → *save plate* (barra de ferramentas) → *plate*.

Gravando as sequências:

1- Trazer um DVD → *Roxio Creator Home* → *Data* → *Datadisc* → *Add Data* → *Pasta Pesquisa* → *Nome da placa* → *OK* → *Click button to continue* (finalização da gravação das sequências).

2- Levar para Bio informática (*BIO EDIT Version 7.1.3.0* e *MEGA 5.2 Version*).