

Autofecundação e fecundação cruzada em *Australorbis glabratus**

por

W. Lobato Paraense

A autofecundação em caramujos da ordem Pulmonata parece ter sido assinalada pela primeira vez por Oken (1817) na *Lymnaea auricularia*. Na sua excelente monografia sobre o assunto, Larambergue (1939) fornece uma lista das espécies nas quais esse fenômeno foi observado. Com referência à família Planorbidae, verificações indiscutíveis de autofecundação, em indivíduos isolados precocemente de modo a evitar a cópula com outro indivíduo, foram feitas nas seguintes espécies: *Planorbis exacutis* e *P. parvus* (Colton 1918), *P. metidjensis* (Brumpt 1928), *P. corneus* (Allen 1935), *Indoplanorbis exustus* (Brumpt 1936), *P. boissyi* (Larambergue 1939) e *Australorbis glabratus* (Brumpt 1941). Esses autores foram os primeiros a observar a autofecundação nas espécies referidas.

No presente trabalho apresentamos um resumo de nossas observações sobre a autofecundação e a fecundação cruzada na espécie neotropical *Australorbis glabratus*.

OBSERVAÇÕES SOBRE A AUTOFECUNDAÇÃO

Nesta investigação usamos sete caramujos criados em isolamento a partir de uma placa de ovos de espécime capturado no campo em Belo Horizonte (Estado de Minas Gerais). Ao completarem cerca de um mês de idade e achando-se com 8 a 10 mm de diâmetro, depositaram as primeiras placas de ovos, que continham de 1 a 9 cápsulas. No período entre a eclosão e o início das posturas a temperatura ambiente variou de 19,5 a 26° C. A frequência das posturas foi irregular e o número de ovos produzidos durante os primeiros 30 dias variou de 199 a 589 por espécime, perfazendo o total de 2734. Dêstes ovos, 2141 (78,3%) evoluíram até a eclosão, e os restantes foram inviáveis.

* Trabalho realizado mediante cooperação entre o Instituto Oswaldo Cruz e o Serviço Especial de Saúde Pública, e entregue para publicação a 21 de Março de 1955.

Durante este último período de 30 dias a temperatura ambiente variou de 19 a 24° C.

Em 29 espécimes observados anteriormente a produção de ovos começou quando os caramujos contavam de 51 a 123 dias de idade e mediam de 6,5 a 7,5 mm de diâmetro.

OBSERVAÇÕES SOBRE O MODO HABITUAL DE REPRODUÇÃO

Como nas condições naturais os planorbídeos vivem em agregados coloniais, sendo encontrados freqüentemente indivíduos em cópula, procuramos investigar qual o modo habitual de reprodução do *A. glabratus* nas referidas condições.

Nos trabalhos de Crabb (1927a, b) sobre a *Lymnaea stagnalis* e de Larambergue (1939) sobre o *Bulinus contortus* encontramos pontos de vista opostos a respeito da importância relativa dos processos de autofecundação e de fecundação cruzada na reprodução dos pulmonados.

Na opinião de Crabb a fecundação cruzada não seria o modo normal de reprodução na *L. stagnalis*. Julga ele que os espermatozoides são incapazes de atravessar as substâncias viscosas excretadas nos canais genitais femininos pelas glândulas formadoras do albúmen, da membrana do ovo e da massa gelatinosa, de modo que não alcançariam o óvulo antes de ser este recoberto pelo albúmen. Entretanto, a própria existência de um aparelho copulador dotado de órgãos acessórios bastaria para invalidar essa opinião. Por outro lado devemos admitir a ocorrência, em uma mesma espécie animal, de uma adaptação estrita entre os seus espermatozoides e os meios mais ou menos viscosos a serem atravessados por eles ao longo dos canais genitais femininos. Uma disposição semelhante é encontrada nas aves, cujos espermatozoides, avançando através dos materiais secretados pelas glândulas da casca, das membranas e do albúmen, atingem os óvulos no segmento superior do oviduto.

A opinião de Larambergue, baseada em suas experiências com o *B. contortus*, é de que, apesar de se encontrarem normalmente reunidos num mesmo indivíduo os elementos dos dois sexos, os espermatozoides estranhos introduzidos durante a cópula podem atingir os ovócitos antes que estes sejam fecundados pelos espermatozoides do próprio animal (p. 185).

Como veremos em seguida, os resultados de nossas observações com o *A. glabratus* estão de acordo com a conclusão de Larambergue.

UTILIZAÇÃO DE CARAMUJOS ALBINOS NESTA EXPERIÊNCIA

Nesta pesquisa sobre o modo habitual de reprodução do *A. glabratus* utilizamos caramujos albinos nas experiências de cruzamento, exercendo aqui o albinismo a função de marcador genético para distinguir os espécimes produzidos por cruzamento daqueles produzidos por autofecundação. A fim de tornar mais compreensíveis estas observações com

albinos, apresentamos breve resumo de alguns resultados de experiências preparatórias.

O albinismo total nos planorbídeos é determinado por um gene recessivo, muito raro em relação ao seu alelo normal. Tratando-se de um fator recessivo, um caramujo albino será necessariamente homozigoto, e portanto produzirá exclusivamente albinos por autofecundação. Em nossas experiências, os primeiros 300 ovos depositados por três albinos criados isoladamente deram a seguinte descendência:

Albino 1:	284 albinos,	16 inviáveis.
Albino 2:	252 albinos,	48 inviáveis.
Albino 3:	250 albinos,	50 inviáveis.

Sendo o albinismo determinado pela ação de um par de alelos recessivos, qualquer caramujo pigmentado aparecido na descendência de um albino corresponde a um heterozigoto, cuja pigmentação decorre da dominância do alelo normal. Por conseguinte, ao reproduzir-se por autofecundação um destes heterozigotos comportar-se-á como se fôsse uma casal de heterozigotos reproduzindo-se por cruzamento. Dêsse modo, nos seus descendentes imediatos ocorrerá a segregação dos fatores dominantes e recessivos. Como exemplo do fenômeno de segregação mendeliana apresentamos os resultados da reprodução por autofecundação de três heterozigotos:

Híbrido 1:	616 pigmentados,	183 albinos,	118 inviáveis	(3,36 : 1).
Híbrido 2:	658 pigmentados,	243 albinos,	101 inviáveis	(2,71 : 1).
Híbrido 3:	706 pigmentados,	252 albinos,	65 inviáveis	(2,80 : 1).
	<hr/>	<hr/>	<hr/>	<hr/>
	1980 pigmentados,	678 albinos,	284 inviáveis	(2,92 : 1).

Os números entre parênteses correspondem às proporções mendelianas entre pigmentados e albinos, que ficaram em torno da proporção teórica de 3 : 1 observada nos casos de monohibridismo.

EXPERIÊNCIAS DE CRUZAMENTO

De posse dos dados sobre o comportamento genético do fator de albinismo, ficamos em condições de esclarecer o modo normal de reprodução do *A. glabratus*, se por autofecundação ou por fecundação cruzada. O método de investigação é muito simples. Coloca-se um espécime albino junto com um pigmentado homozigoto, ambos de tamanho aproximadamente igual. Como a frequência das desovas é muito maior durante a noite, êles são separados antes do anoitecer e novamente reunidos pela manhã. Assim podemos identificar as posturas de cada um, que são conservadas em pequenas placas de Petri com água e observadas ao microscópio estereoscópico. Para a finalidade deste trabalho

tôda a atenção é dada aos ovos do espécime albino, visto como os ovos do espécime pigmentado produzem exclusivamente embriões pigmentados. No caso de serem pigmentados, os embriões deixam ver nitidamente, em tôrno do 6.º dia à temperatura de cêrca de 22º C, um ponto negro na base de cada antena, correspondendo às manchas oculares, não apresentando mancha alguma no caso de serem albinos. O aparecimento precoce das manchas oculares nos embriões ainda dentro das cápsulas permite grande economia de tempo na obtenção dos resultados das provas de cruzamento. Na descendência de um caramujo albino os embriões pigmentados derivam de cruzamento, ao passo que os embriões albinos derivam de autofecundação.

Quando são reunidos dois espécimes muito jovens, que ainda não iniciaram as posturas, os primeiros ovos do albino podem dar embriões pigmentados ou albinos, dependendo de ter ou não o espécime pigmentado atingido a maturidade sexual.

Quando são reunidos dois indivíduos que se acham em pleno período de reprodução por autofecundação, as primeiras placas de ovos depositadas pelo espécime albino em seguida ao acasalamento podem dar exclusivamente embriões pigmentados, traduzindo a utilização preferencial imediata dos espermatozóides estranhos. Na maioria dos casos, entretanto, aparecem alguns embriões pigmentados entre grande maioria de albinos, porém o número dos primeiros aumenta rapidamente nas posturas seguintes, as quais em pouco tempo só contêm embriões pigmentados. É óbvio que o aparecimento simultâneo de embriões albinos e pigmentados em uma placa de ovos indica que ela encerra uma mistura de produtos de autofecundação e de cruzamento.

As experiências de cruzamento aqui referidas demonstram o fato notável de que o *A. glabratus*, apto a reproduzir-se prontamente por autofecundação, passa a reproduzir-se exclusivamente por cruzamento quando reunido a outro indivíduo da mesma espécie. A fecundação cruzada continua a realizar-se com exclusividade enquanto os indivíduos permanecem reunidos, como verificamos em 10 casais até agora estudados.

MODO DE REPRODUÇÃO NAS CONDIÇÕES NATURAIS

Para demonstrarmos se nas condições naturais a reprodução por cruzamento é preferencial, como foi verificado no laboratório, observamos a descendência de 10 albinos capturados no campo, na cidade de Santa Luzia, situada a cêrca de 30 Km ao norte de Belo Horizonte. Todos os espécimes deram origem a produtos pigmentados, resultantes da fecundação de seus óvulos, no habitat natural, por espermatozóides de caramujos pigmentados homozigotos.

Esta breve referência é suficiente para demonstrar que a fecundação cruzada constitui o modo natural de reprodução do *A. glabratus*.

DURAÇÃO DA ATIVIDADE FECUNDANTE DOS ESPERMATOZÓIDES ESTRANHOS

Os espermatozóides introduzidos durante a cópula no canal genital de um caramujo são armazenados em algum ponto, conservando durante um prazo variável a sua capacidade fecundante. Este fato é demonstrado pela observação dos descendentes imediatos de um albino separado de seu par pigmentado, os quais apresentam-se pigmentados enquanto subsistem espermatozóides estranhos no progenitor albino.

Em nossas observações sobre este assunto utilizamos os espécimes referidos no tópico "Experiências de cruzamento", sendo os albinos separados depois de terem estado acasalados durante 22 a 56 dias. Os caramujos observados para verificação do "Modo de reprodução nas condições naturais" foram também usados nesta investigação. Verificamos ser de 25 dias após a separação o prazo mínimo para o aparecimento do primeiro embrião albino indicador do começo da autofecundação. Depois de aparecer o primeiro albino as posturas subsequentes apresentaram albinos em número sempre crescente, até o desaparecimento, mais ou menos rápido, dos embriões pigmentados. O prazo máximo requerido para o desaparecimento dos embriões pigmentados foi de 68 dias, que corresponde, portanto, ao máximo de sobrevivência dos espermatozóides estranhos verificado em nosso material.

COMENTÁRIOS

Um único espécime de *A. glabratus* é capaz de produzir por autofecundação uma colônia de numerosos indivíduos. Como vimos, o menos prolífero entre os nossos espécimes autofecundados começou a desovar aos 30 dias de idade, produzindo ao fim de mais 30 dias 199 ovos, dos quais 180 foram viáveis. Supondo que no 30.º dia de idade cada um dos seus descendentes atingisse a maturidade sexual e que cada um deles puzesse o mesmo número mínimo de 180 ovos viáveis em 30 dias, distribuídos da maneira registrada em nossos protocolos para o espécime inicial, ao completar este último 120 dias de idade ou 90 dias de postura teria produzido cerca de 11.500.000 descendentes viáveis, sem contar os milhões de indivíduos produzidos por ele e por seus descendentes após o 30.º dia de postura. O efeito supressivo da resistência ambiental, controlando a efetuação do potencial biótico, não permitirá naturalmente tal superprodução de indivíduos. Podemos concluir, com base nestes dados, que nos criadouros tratados com planorbicidas bastará um único espécime sobrevivente para renovar a população de caramujos.

Foi visto como, apesar da alta capacidade de autofecundação do *A. glabratus*, ele revelou absoluta preferência pela reprodução por cruzamento. Devemos daí concluir que as suas colônias (como também com toda probabilidade as dos outros planorbídeos) constituem populações mendelianas, no sentido de comunidades reprodutivas de indivíduos que participam de um "pool" genético comum (Dobzhansky 1950). Esta preferência dada à hibridação intra-específica permanece

difícil de explicar. Nos planorbídeos os óvulos e espermatozóides são formados lado a lado nas paredes epiteliais dos mesmos divertículos do ovoteste, em cuja luz são lançados em conjunto, migrando juntos pelas mesmas vias hermafroditas. Esta disposição parece apropriada para aumentar as probabilidades de autofecundação. De fato, os mesmos gametas que num caramujo isolado conjugam-se prontamente, tornam-se mutuamente indiferentes logo que em presença de espermatozóides de outro indivíduo da mesma espécie, os quais passam a ter absoluta primazia como elementos fecundantes. O significado evolucionário dêste fato merece ser realçado. Garante a espécie dessa maneira a sua própria preservação, mediante o fluxo de genes e as recombinações que lhe conferirão a necessária provisão de variabilidade gênica.

Em regiões expostas a enxurradas não é raro que muitas populações de planorbídeos sejam quase inteiramente aniquiladas na estação chuvosa de cada ano, e muitas vezes ainda ocorre um segundo ciclo de destruição na estação fria ou durante a seca, de acordo com as regiões. Em certas áreas é mesmo impossível encontrar-se um planorbídeo nas épocas referidas. A reconstituição das populações nesses casos é feita à custa dos poucos indivíduos sobreviventes, que representam o elo entre as populações precedente e subsequente. Estes poucos indivíduos, nos quais se concentram todos os atributos que constituirão a estrutura genotípica da nova população, devem ser considerados como a "população geneticamente efetiva". Se acontecer que eles sejam portadores de caracteres hereditários atípicos, estes últimos podem predominar na nova população, que os herdará mediante mero acaso. Como resultado dêste fenômeno de oscilação genética os indivíduos de uma colônia podem diferir de tal modo dos de outra colônia ainda que próxima, ao ponto de poderem ser considerados como pertencentes a espécies diferentes. A oscilação genética opera de preferência em populações que se fragmentam em pequenas subpopulações ou colônias isoladas cuja grandeza está sujeita a fortes depressões em certas estações do ano, como é o caso dos planorbídeos.

Não devem constituir exceção os casos extremos de reconstrução de colônias a partir de um único indivíduo residual, ou de organização de nova colônia a partir de um indivíduo extraviado pelas correntes de água. Um dêstes indivíduos poderá fundar pequena colônia inicial por autofecundação, prosseguindo a multiplicação dos seus descendentes por cruzamento. Este fato explicaria a ocorrência de algumas colônias com características próprias e pequena variação individual.

Terminando estas considerações, desejamos realçar a utilidade do emprego de um método tão simples de marcação genética, por meio do fator de albinismo, na experimentação genética aplicada à sistemática. Segundo um conceito genético, as espécies são "grupos de populações entre os quais a permuta de genes é limitada ou impedida na natureza por um mecanismo ou por uma combinação de vários mecanismos de isolamento reprodutivo" (Dobzhansky 1953, p. 262). Em consequência desta definição, a caracterização biológica de uma espécie (bio-espécie) deve basear-se no seu nível de isolamento reprodutivo.

Nos planorbídeos, entretanto, a ocorrência da autofecundação poderá falsear a interpretação das provas de cruzamento. O emprêgo de espécimes albinos nestas provas permitirá afirmar com segurança a ocorrência ou não de hibridação interespecífica e conhecer o número de híbridos eventualmente produzidos.

SUMÁRIO

Um espécime de *A. glabratus* criado isoladamente é capaz de reproduzir-se perfeitamente bem por autofecundação. Entretanto, quando em companhia de outro indivíduo da mesma espécie, reproduz-se exclusivamente por cruzamento.

A possibilidade da formação de uma população a partir de um único indivíduo permite explicar a ocorrência de certas colônias de planorbídeos com características peculiares e pequena variação individual, além de explicar a reconstituição de populações tratadas com planorbicidas, desde que um único indivíduo possa escapar à destruição.

Utilizando o fator de albinismo como marcador genético em experiências de cruzamento, torna-se fácil distinguir na geração F_1 os produtos resultantes de fecundação cruzada daqueles produzidos por autofecundação.

O emprêgo de espécimes albinos na experimentação genética aplicada à sistemática permitirá uma caracterização biológica segura das espécies, reforçando assim o critério morfológico.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, C.
1935. Self-fertilization. *J. Conchology* 20 : 126 (cit. por Larambergue).
- BRUMPT, E.
1928. Étude de l'autofécondation du mollusque aquatique pulmoné, *Bullinus contortus*. *C.r.Acad.Sci.*, Paris, 186 (15) : 1012-1015.
- BRUMPT, E.
1936. *Schistosoma mansoni* et *Schistosoma bovis* ne sont pas transmis par *Planorbis (Indoplanorbis) exustus*. Observations biologiques concernant ce Planorbe (autofécondation, érosion de la coquille, élevage, etc.). *Ann.Parasit.* 14 (5) : 464-471.
- BRUMPT, E.
1941. Observations biologiques diverses concernant *Planorbis (Australorbis) glabratus* hôte intermédiaire de *Schistosoma mansoni*. *Ann.Parasit.* 18 (1-3) : 9-45.
- COLTON, H. S.
1918. Self-fertilization in the air-breathing pond snails. *Biol.Bull.* 35 (1) : 48-49.
- CRABB, E. D.
1927a. Anatomy and function of the reproductive system in the snail, *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Biol.Bull.* 53 (2) : 55-56.
- CRABB, E. D.
1927b. The fertilization process in the snail, *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Biol.Bull.* 53 (2) : 67-108.

DOBZHANSKY, T.

1950. Mendelian populations and their evolution. *Amer. Nat.* 84 (819) : 401-418.

DOBZHANSKY, T.

1953. *Genetics and the origin of species*. 3rd rev. ed., Columbia Univ. Press, New York.

LARAMBERGUE, M. de

1939. Étude de l'autofécondation chez les gastéropodes pulmonés. Recherches sur l'aphallie et la fécondation chez *Bullinus (Isidora) contortus* Michaud. *Bull. Biol.* 73 (1-2) : 19-231.

OKEN, L.

1817. Schneckenjung ohne Begattung. *Isis*, p. 319 (cit. por Larambergue).