

## CARIÓTIPOS DE PUGILINA MORIO, LITTORINA ANGULIFERA, TIVELA MACTROIDES E ANADARA OVALIS DO LITORAL DA COSTA BRANCA, RN

Marcos Antonio Nobrega de Sousa<sup>1\*</sup>; Naama Jessica de Assis Melo<sup>2</sup>; Edigleyce de Lima Costa<sup>2</sup>, Eliezer Fernandes da Silva Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Docente Doutor. Departamento de Ciências Animais – DCAAn. Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

\*Correspondência: Avenida Francisco Mota, 572. Bairro Costa e Silva. Mossoró/RN. CEP: 59.625-900. E-mail: marcosousa@ufersa.edu.br

<sup>2</sup> Biotecnologistas, Discentes do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

### RESUMO

Moluscos bivalves e gastrópodes possuem grande importância econômica nas comunidades litorâneas, tanto para a alimentação quanto para a fabricação de adornos (zooartesanato). Essa situação não é diferente nos municípios de Grossos e Tibau, RN. Entre as espécies de moluscos utilizadas nesses locais, têm-se os bivalves *Tivela mactroides* e *Anadara ovalis* e os gastrópodes *Pugilina morio* e *Littorina angulifera*. Diante disso, objetivou-se caracterizar os cariótipos dessas espécies. Os exemplares foram coletados nos municípios de Grossos e Tibau, RN e levados ao laboratório de Genética e Evolução (UFERSA) para a preparação cromossômica. Para *P. morio* e *A. ovalis* utilizou-se a técnica de microcultura, enquanto que para *L. angulifera* e *T. mactroides* utilizou-se a técnica convencional. As lâminas foram analisadas e as melhores metáfases foram fotografadas em microscópio óptico com câmera digital. As melhores metáfases foram fotografadas e os cromossomos foram agrupados de acordo com a ordem decrescente de tamanho e morfologia. Os cromossomos foram recortados, agrupados e classificados de acordo com o índice centromérico para obtenção do número diploide (2n) e número fundamental (NF). Os cariótipos identificados para as espécies *P. morio*, *L. angulifera*, *T. mactroides* e *A. ovalis* foram: 2n=24 e NF=24; 2n=20 e NF=20; 2n=26 e NF=26; e 2n=16 e NF=16, respectivamente. São fornecidas informações de que os números cromossômicos para as espécies estudadas são inéditos e diferem dos de outras espécies das mesmas famílias.

**Descritores:** cromossomos, moluscos, praias, nordeste.

## KARYOTYPES OF PUGILINA MORIO, LITTORINA ANGULIFERA, TIVELA MACTROIDES ANADARA OVALIS OF COASTLINE OF WHITE COAST, RN

### ABSTRACT

Bivalve and gastropod molluscs have great economic importance in coastal communities, both for food and for the manufacture of ornaments (zooartesanato). This situation is no different in the municipalities of Grossos and Tibau, RN. Among the species of molluscs used in these places, there are the bivalves *Anadara ovalis* and *Tivela mactroides* and *Pugilina morio* and gastropods *Littorina angulifera*. Therefore, we aimed to characterize the karyotypes of these species. Specimens were collected in the municipalities of Grossos and Tibau, RN and taken to the laboratory of Genetics and Evolution (UFERSA) for chromosome preparation. *P. morio* and *A. ovalis* used the technique microculture, whereas for *L. angulifera* and *T. mactroides* used the conventional technique. Slides were analyzed and the best metaphases were photographed under a light microscope with digital camera. The best metaphases were photographed and chromosomes were grouped according to the descending order of size and morphology. The chromosomes were cut out, grouped and classified according to the centromeric index to obtain the diploid number (2n) and fundamental number (NF). Karyotypes identified to the species *P. morio*, *L. angulifera*, *T. mactroides* and *A. ovalis* were 2n = 24 and NF = 24; 2n = 20 and NF = 20; 2n = 26 and NF = 26; and 2n = 16 and NF = 16, respectively. Information that the chromosome numbers for the species studied are novel and differ from other species of the same families are provided.

**Keywords:** chromosomes, molluscs, beaches, northeast.

## INTRODUÇÃO

Os moluscos bivalves e gastrópodes são extremamente importantes na economia de diversos países. Isso ocorre porque servem como fonte de alimento rico em proteínas para a espécie humana. São coletados diretamente da natureza ou mesmo cultivados em fazendas de moluscos (1).

*Pugilina morio* é um gastrópode melongenídeo comumente encontrado em áreas estuarinas da costa Atlântica (de Trindade e Tobago até o sudeste do Brasil e oeste da África). No Brasil, sua distribuição geográfica está registrada para os Estados do Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (2). Esta espécie é comum em estuários do Nordeste brasileiro e também frequentemente observados nas zonas de baixa salinidade (3). Os animais desta espécie possuem carne muito saborosa, a qual se assemelha no paladar à do camarão (4).

O gastrópode *Littorina angulifera* é um notável habitante de manguezais e regiões estuarinas de áreas tropicais e subtropicais. Os indivíduos dessa espécie são micrófagos, se alimentando primariamente de algas, esponjas, microrganismos incrustados em rochas e detritos que retiram do substrato com suas rádulas (5).

A espécie de molusco bivalve *Tivela mactroides* pertencente à família Veneridae tem ampla distribuição em várias comunidades bentônicas do Caribe (Venezuela), distribuindo-se desde as Índias Ocidentais até o Brasil. É popularmente conhecida como “berbigão”, “marisco-de-areia”, “sapinhauá”, crioulo, e “guacuco”. Esta espécie possui também uma relevante importância sócio-econômica sendo comercializada por comunidades litorâneas, principalmente na alimentação familiar ou na fabricação de adornos. No entanto, há poucos registros de estudos dessa espécie, sendo mais comum seu envolvimento em estudos sistemáticos ou em listagem de biodiversidade (6).

A espécie bivalve *Anadara ovalis* ocorre ao longo da costa atlântica da América do Norte, que vai desde Massachusetts para as Índias Ocidentais até o Brasil (7). Essa espécie habita em profundidades que variam desde a linha da maré baixa até três metros, podendo ser encontradas no infralitoral em substrato móvel (8). Todas as espécies possuem um periostraco bastante grosso e esculturas radiais bem definidas (9).

Todas as espécies citadas anteriormente possuem mercado estabelecido no Nordeste brasileiro, como ocorre nas praias do município de Grossos e Tibau, RN. No entanto, não existem estudos citogenéticos para estas espécies. O conhecimento de suas características genéticas podem contribuir para estudos citotaxonômicos. Além de

gerar subsídios para projetos futuros de conservação e monitoramento desses animais. Dessa forma, este trabalho buscou identificar o cariótipo das espécies de moluscos gastrópodes *P. morio* e *L. angulifera* e dos bivalves *T. mactroides* e *A. ovalis*, de acordo com o número de cromossomos e sua morfologia.

## MATERIAL E MÉTODOS

A coleta dos exemplares de *P. morio* e *A. ovalis* foi realizada no mês de abril de 2012 na praia de Alagamar (4°53'21,11"S 37°12'20,55"O), no município de Grossos, RN. *L. angulifera* e *T. mactroides* foram coletadas no mês de setembro de 2010 nas praias de Alagamar, no município de Grossos, RN, e das Emanuelas (4°49'51,20"S 37°14'36,48"O), no município de Tibau, RN.

Os espécimes com tamanho entre 1,5 a 3 cm de comprimento (adultos) foram coletados na maré baixa (0,0 a 0,9), manualmente, em substratos arenosos. Quatro espécimes foram coletados para que, pelo menos, um ou dois indivíduos permanecessem vivos até a fase de laboratório.

Os organismos foram colocados em recipientes plásticos, com aberturas nas tampas, com água do mar retirada do próprio local de coleta, foram acondicionados em caixas térmicas e transportados até o laboratório de Genética e Evolução (LAGENE) na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Para a preparação cromossômica de *P. morio* e *A. ovalis* foi utilizada a técnica de microcultura (obtenção de células *in vitro*), segundo Fenocchio (10) com modificações. Os exemplares foram anestesiados com o auxílio do anestésico Benzocaína na concentração de 1ml/litro de água (11), para que não sofressem dor.

As brânquias foram dissecadas (tecido com maior taxa de divisão celular) e suas células suspensas em mistura Ham's F-12 (mistura comercial de sais enriquecido com aminoácidos, vitaminas e outros componentes essenciais para o crescimento celular).

As células foram incubadas em meio de cultura RPMI1640, acrescido com soro fetal bovino, antibióticos, antimicóticos e agentes indutores da divisão celular (fitohemaglutinina), por duas horas, a 28°C. Na suspensão celular foi aplicada uma solução de colchicina 0,005%, por 45 minutos. Que foi centrifugada por 10 minutos e tratada por 40 minutos em água destilada (solução hipotônica) e fixado em uma mistura de álcool metílico e ácido acético (3:1) com três trocas, uma a cada 10 minutos.

Para a preparação cromossômica dos exemplares de *L. angulifera* e *T. mactroides* foi utilizada a metodologia de Sousa (12), com modificações. Os animais foram incubados em uma solução de colchicina a 0,0005% preparada com água do mar

por 4-5 horas. Após esse tempo foram anestesiados com o auxílio de Benzocaína na concentração de 1ml/litro de água (13).

Em seguida as brânquias foram dissecadas através da técnica de esmagamento. A suspensão celular resultante foi tratada por 20 minutos em uma solução hipotônica de cloreto de potássio (KCl) 0,075 M diluída em água destilada. O material foi fixado em uma mistura de álcool metílico e ácido acético (3:1) com três trocas, uma a cada 10 minutos.

Para todos os exemplares de moluscos estudados foi realizada a técnica de coloração convencional. As lâminas foram hidrolisadas em HCl 1 N, a 60°C, por 7 minutos e lavadas em água destilada, coradas em solução de Giemsa 1:30 diluída em solução tampão fosfato pH 6,8 por 7 minutos e depois foram lavadas com água destilada e colocadas pra secar ao ar.

As lâminas foram analisadas através de um microscópio óptico com a observação de 10 metáfases por exemplar para estabelecimento do número diploide modal. As melhores metáfases coradas, com boa definição morfológica e nítida contagem dos cromossomos foram fotografadas com uma câmera digital com resolução de 12 megapixels. As fotografias foram editadas no programa de edição gratuito Gimp para corrigir densidade, contraste, recortar os cromossomos e agrupá-los de acordo com a ordem decrescente de tamanho e morfologia.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram utilizadas dois tipos de metodologia diferentes: para *P. morio* e *A. ovalisfoi* utilizada microcultura e para *L. angulifera* e *T. mactroides*,foi utilizada a preparação direta, utilizada comumente para mamíferos, com adaptações, pois a técnica de microcultura não apresentou resultados eficientes para essas últimas espécies.

O cariótipo para a espécie *P. morio*, inédito na literatura, apresentou número diploide  $2n=24$  e número fundamental  $NF=24$ , composto por 11 pares acrocêntricos médios e um par acrocêntrico diminuto, dispostos em ordem decrescente de tamanho, de acordo com o índice centromérico (Figura 1). Não foram distinguidos morfologicamente os cromossomos sexuais. Outro fato a observar é o pequeno tamanho dos cromossomos, mesmo no microscópio com aumento de 1000x.

O único membro da família Melongenidae que possui seu cariótipo descrito é a espécie *Volemapyrus*, segundo Ebied *et al.* (14), com espécimes coletados no Egito e número diploide  $2n=56$ , composto por 15 pares metacêntricos, seis submetacêntricos,

três subtlocêntricos e quatro telocêntricos, sem distinção morfológicas dos cromossomos sexuais.

A diferença contrastante dos números diploides encontrados para esta espécie pode ocorrer devido à grande distância geográfica entre os dois locais de estudo (15). Contudo, a ausência de cromossomos sexuais em ambos os trabalhos pode indicar a inexistência deste tipo de cromossomo especializado em *P. morio*.



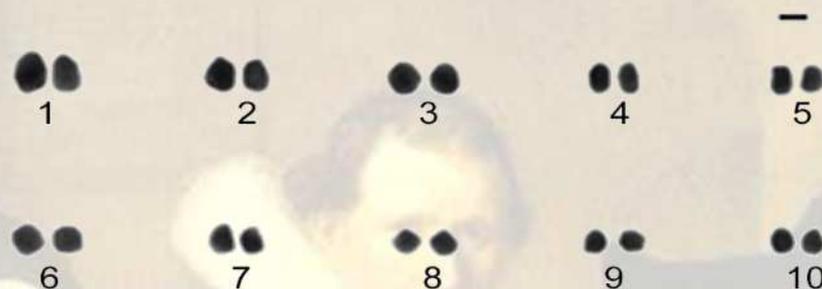
**Figura 1.** Cariótipo em coloração convencional de *Pugilina morio* ( $2n=24$ ,  $NF=24$ ). Barra = 1  $\mu$ m. Fonte: autoria pessoal.

Em *Littorina angulifera*, o número diploide encontrado foi  $2n=20$  e  $NF=20$ , sendo o cariótipo composto por 10 pares acrocêntricos médios dispostos em ordem decrescente de tamanho de acordo com o índice centromérico. Não foram distinguidos morfológicamente os cromossomos sexuais (Figura 2). Também se observa nesta espécie o tamanho diminuto dos cromossomos.

Os indivíduos da família Littorinidae possuem, em geral,  $2n=34$  e número fundamental variando de  $NF=54$  a  $NF=68$  (16). Não há nenhum registro de análise citogenética da espécie *L. angulifera*.

Mas outras espécies do mesmo gênero já foram estudadas. As espécies estudadas são provenientes do Espanha, Estados Unidos, Itália, Reino Unido, Rússia e Suécia. O provável motivo para a diferença cariotípica entre os dados encontrados para *L. angulifera* nesse trabalho e os dados já existentes para as espécies da mesma família e gênero na literatura são as correntes marítimas que podem ter separado populações

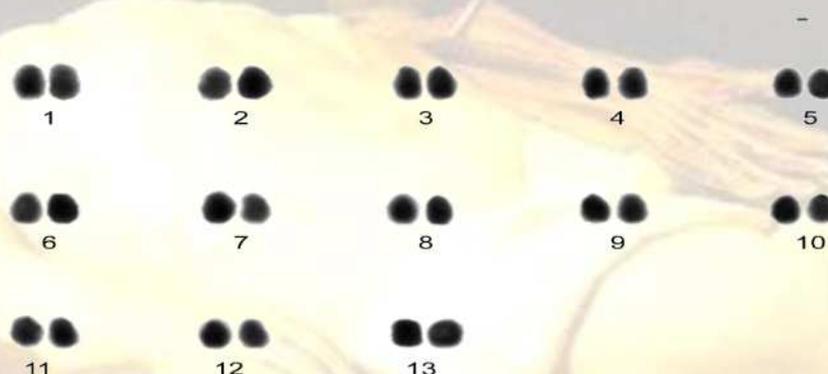
de espécimes semelhantes e ocasionado, provavelmente, uma especiação cromossômica (15).



**Figura 2.** Cariótipo em coloração convencional de *Littorina angulifera* ( $2n=20$ ,  $NF=20$ ). Barra = 1  $\mu$ m. Fonte: autoria pessoal.

O número diploide ( $2n$ ) encontrado para *Tivela mactroides* foi  $2n=26$  e o número fundamental ( $NF$ ) foi  $NF=26$ , composto por 13 pares de cromossomos, de tamanho médio, acrocêntricos, dispostos em ordem decrescente de tamanho, de acordo com o índice centromérico (Figura 3). Também não foram distinguidos morfologicamente os cromossomos sexuais desta espécie. Estes dados citogenéticos também fornecem informações inéditas na literatura.

O número cromossômico mais frequente na família Veneridae é  $2n=38$ . Enquanto que o número fundamental ( $NF$ ) não é indicado nos estudos que caracterizam geneticamente as espécies da família Veneridae (16). A única informação de número fundamental para esta família é o da espécie *Mercenaria mercenária*, com  $NF=76$  (17-18).



**Figura 3.** Cariótipo em coloração convencional de *Tivela mactroides* ( $2n=26$ ,  $NF=26$ ). Barra=1 $\mu$ m. Fonte: autoria pessoal.

Para *Anadara ovalis*, o número diploide encontrado foi  $2n=16$  e o número fundamental foi  $NF=16$ , com oito pares de cromossomos acrocêntricos, dispostos em ordem decrescente de tamanho (Figura 4). Não foram distinguidos morfologicamente os cromossomos sexuais desta espécie.

Os resultados dos cromossomos sexuais são condizentes com os das espécies *Anadara granosa* e *Anadara antiquata* encontradas na Indonésia (19).

O número cromossômico mais frequente na família Arcidae é  $2n=38$  e o número fundamental varia entre  $NF=42$  a  $NF=44$  (16). As diferenças no número diploide entre as espécies estudadas e os dados descritos na literatura das espécies até então caracterizadas citogeneticamente, provavelmente ocorre devido à grande distância geográfica entre as populações de bivalves dos continentes analisados e as correntes marinhas (20).



**Figura 4.** Cariótipo em coloração convencional de *Anadara ovalis* ( $2n=16$ ,  $NF=16$ ). Barra=1 $\mu$ m. Fonte: autoria pessoal.

## CONCLUSÕES

Os números cromossômicos encontrados para as espécies estudadas são inédito se diferem dos de outras espécies do mesmo gênero ou família, além de fornecerem subsídios para novas pesquisas em citogenética de moluscos brasileiros.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amaral ACZ, Jablonski S. Conservação da biodiversidade marinha e costeira no Brasil. Megadiversidade. 2005; 1 (1): 43-51.
2. Kosyan AR, Kantor YI. Morphology, taxonomic, status and relationships of Melongenidae (Gastropoda: Neogastropoda). Ruthenica. 2004; 14 (1): 9-36.
3. Ângulo RJ, Souza MC, Reimer PJ, Sasaoka SK. Reservoir effect of the southern and southeastern brazilian coast. Radiocarbon. 2005; 47 (1): 67-73.
4. Alves MS, Silva MA, Melo Júnior M, Paranaguá MN, Pinto SL. Zooartesanato comercializado em Recife, Pernambuco, Brasil. Zoociências. 2006; 8 (2): 99-109.

5. Bande K. Studies of Littorinidae from the Atlantic. *Veliger*. 1974; 17: 92-114.
6. Marques CG. Aspectos Reprodutivos do Berbigão *Tivela mactroides* (Born, 1778) (Bivalvia; Veneridae) na Enseada de Caraguatatuba, São Paulo – Brasil. [Monografia]. São Paulo: Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos; 2004.
7. Walker RL, Power AJ. Growth and gametogenic cycle of the crested oyster, *Ostrea equestris* (Say, 1834), in coastal Georgia. *Journal of Shellfish Research*. 2001; 20: 945-949.
8. Mello R, Tenório DAA. Malacofauna. In: Barros HM, Eskinazi-leça E, Macedo SJ, Lima T. Gerenciamento Participativo de Estuários e Manguezais. Recife: Editora Universitária da UFPE; 2000. p. 103-117.
9. Chanley P, Andrews JD. AIDS for identification of bivalve larvae of Virginia. *Malacologia*. 1971; 11 (1): 45-119.
10. Fenocchio AS, Venere PC, Cesar ACG, Dias AL, Bertollo LAC. Short term culture from solid tissues of fishes. *Caryologia*. 1991; 44: 161-166.
11. Araújo AF. Avaliação de anestésicos para a ostra perliífera nativa *Pteria hirundo* (Linné, 1758). [Monografia]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.
12. Sousa MAN. Pequenos mamíferos (Didelphimorphia, Didelphidae e Rodentia, Sigmodontinae) de algumas áreas da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Brejo de Altitude do Brasil: Considerações citogenéticas e geográficas. [Tese]. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2005.
13. Ebied AM, Hassan HA, Abu-Almaaty AH, Yaseen AE. Cytogenetic studies on metaphase chromosomes of eight gastropod species of orders Mesogastropoda and Neogastropoda from the Red Sea (Prosobranchia–Mollusca). *Journal of the Egyptian German Society of Zoology*. 2000; 33: 317–336.
14. Robert T, Dillon JR. Geografic distance, environmental difference, and divergence between isolated populations. *Systematic Biology*. 1984; 33 (1): 69-82.
15. Libertini A, Trisolini R, Edmands SA cytogenetic study of the periwinkle *Littorina keenae* Rosewater, 1978 (Gastropoda: Littorinidae). *Journal of Molluscan Studies*. 2004; 70: 299-301.
16. Thiriot-Quievreux C. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. *Cah. Biol. Mar*. 2002. 43: 17-26.
17. Zhi-Hua L, Zhen-Ming L, Xue-Liang C, Jun F, Jiong-Ming Z. Karyotypes of diploid and triploid *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus). *Journal of Shellfish Research*. 2008; 27 (2): 297-300.
18. Wang Y, Guo X. Chromosomal mapping of major ribosomal rRNA genes in the hard clam (*Mercenaria mercenaria*) using fluorescent *in situ* hybridization. *Marine Biology*. 2007; 150 (6): 1183-1189.
19. Arruda CCB, Beasley CR, Vallinoto M, Marques-Silva NS, Tagliaro CH. Significant genetic differentiation among populations of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791): A bivalve with planktonic larval dispersion. *Genetics and Molecular Biology*. 2009; 32 (2): 423-430.
20. Afiati N. Hermaphroditism in *Anadara granosa* (L.) and *Anadara antiquata* (L.) (Bivalvia: Arcidae) from central Java. *Journal of Coastal Development*. 2007; 10: 171-179.