

Adequação da técnica para obtenção de metáfases e número cromossômico de *Ucides cordatus* Linnaeus (Crustaceae, Brachyura, Ocypodidae)

Flavia Aparecida Ortolani¹; Marcia Fiorese Mataqueiro¹; José Roberto Moro¹ e Marcelo Antonio Amaro Pinheiro²

RESUMO

O caranguejo *Ucides cordatus* é uma espécie comum do ecossistema manguezal e pode ser encontrado em ambientes estuarianos. Por apresentar grande porte na fase adulta é utilizado como fonte de alimentação em várias regiões brasileiras, possuindo importância econômica. O número cromossômico dessa espécie, conhecida popularmente como caranguejo-uçá, foi determinado utilizando-se tecidos gonadais de 14 exemplares machos, coletados próximos à Barra de Icapara, Iguape, São Paulo, Brasil. Nos animais com largura cefalotorácica (LC) igual ou maior que 53 mm foi possível observar metáfases meióticas e mitóticas. O uso de colchicina 2 µg/g a 28°C por sete horas possibilitou melhor condensação e separação cromossômica. Das três regiões analisadas, os lobos anteriores foram os mais adequados à obtenção de metáfases. A espécie *Ucides cordatus* Linnaeus possui $n = 44$ e $2n = 88$ cromossomos com comprimento médio de $1,90 \mu\text{m} \pm 0,21$ e amplitude variando de $0,59 \mu\text{m}$ até $5,27 \mu\text{m}$. Esses resultados fornecem suporte a um melhor entendimento da citogenética de Brachyuros podendo subsidiar estudos de taxonomia e de manipulação cromossômica.

Palavras-chave: Citogenética, meiose, mitose.

Technique adaptation for obtaining of metaphases and chromosome number of *Ucides cordatus* Linnaeus (Crustaceae, Brachyura, Ocypodidae)

ABSTRACT

Crab *Ucides cordatus* is one of the commonest species in the mangrove ecosystem and can be found in estuarial ambient. For presenting great size in adult phase it is used as food in several Brazilian areas, having economic importance. The chromosome number of that species, popularly known as “crab-uçá”, was determined using gonadal tissue of 14 male specimens, collected in mangrove forest at Iguape, São Paulo, Brazil. In the animals with cephalotoracic width (LC) equal or larger than 53 mm was possible to observe meiotic and mitotic metaphases. The use of colchicine 2 µg/g in 28°C for seven hours provided a better chromosome condensation and separation. The specie *Ucides cordatus* Linnaeus showed $n = 44$ and $2n = 88$ chromosomes with general length average of $1.90 \mu\text{m} \pm 0.21$ and amplitude varying between $0.59 \mu\text{m}$ and $5.27 \mu\text{m}$. These results support to a better understanding of Brachyuros cytogenetic and can subsidize taxonomic and chromosome manipulation studies.

Key words: Cytogenetic, meiosis, mitosis.

1 - INTRODUÇÃO

Ucides cordatus Linnaeus, popularmente conhecido como caranguejo-uçá, é uma espécie da família Ocipodidae e, está amplamente distribuída na costa do Atlântico Ocidental, entre 25°N e 27°S (MELO, 1996). É um caranguejo semi-terrestre que vive em manguezais dentro de galerias escavadas no sedimento lodoso, com profundidade de até 1,50 m, exibe hábitos noturnos e é fitófago alimentando-se de folhas senescentes em decomposição (ALCÂNTARA FILHO, 1978; NASCIMENTO, 1993; PINHEIRO & FISCARELLI, 2001). Tem uma importante função ecológica na reciclagem de nutrientes no estuário (KOCK, 1999), sendo igualmente utilizado na alimentação humana (FAUSTO FILHO, 1968), pois, no Brasil, a captura desses animais é uma das atividades mais antigas de extrativismo nos manguezais e muitas comunidades ainda sobrevivem dessa prática (GEO BRASIL, 2002), sendo que a exploração desta espécie é realizada durante o ano todo (PASSOS & DI BENEDITTO, 2005).

Segundo Mantelatto & Fransozo (1996) a maturidade sexual pode ser observada por meio de mudanças nos indivíduos imaturos que deixam essa condição e passam a produzir gametas. A avaliação do tamanho dos indivíduos no momento em que atingem a maturidade tem sido feita de várias formas, baseando-se em análises morfológicas como: crescimento relativo, maturidade fisiológica, observações macroscópicas das gônadas e observações comportamentais (LIMA & OSHIRO, 2006). Estudos feitos por Pinheiro & Fiscarelli (2001) concluíram que o início da maturidade sexual da espécie *Ucides cordatus* dá-se quando o animal apresenta largura cefalotorácica superior a 53 mm. Assim, todo e qualquer estudo relacionado à análise de cromossomos, nos tecidos gonadais dessa espécie, deve levar em consideração esse dado que dita, nos machos, o início do processo de espermatogênese.

Os estudos citogenéticos podem atuar como importante instrumento auxiliar na identificação taxonômica de espécies, particularmente, nos casos onde as características fenotípicas, não são suficientes

para determinar a classificação da espécie e, geralmente, permitem esclarecer os fundamentos citológicos e genéticos da variabilidade (MARTINEZ, 1976).

Na literatura, o número de relatos sobre as estruturas cromossômicas dos crustáceos é significativamente menor quando comparado com outros artrópodes, especialmente os insetos (SALEMAA, 1979). Por muitos anos, os estudos relacionados aos cromossomos desse grupo atraíram a atenção de poucos pesquisadores, sobretudo porque os Brachyuros são caracterizados por um elevado número cromossômico (WHITE, 1973), sendo que a maioria desses cromossomos é pequeno, o que dificulta a visualização do centrômero (TRENTINI et al., 1992) e, conseqüentemente, a observação de um par cromossômico em particular.

Embora alguns artigos descrevam métodos para a obtenção de metáfases dentro da Infra-ordem Brachyura (SALEMAA, 1979; 1986; JUSTO et al., 1991; CHOW et al., 1990; THIRIOT-QUIÉVREUX & CUZIN-ROUDY, 1995; THIRIOT-QUIÉVREUX et al., 1998), ainda é necessário executar alguns ajustes para a determinação do número cromossômico do caranguejo-uçá, pois esta espécie é citogeneticamente desconhecida.

Além de adequar a técnica para a obtenção de metáfases objetivou-se, com este estudo, determinar os números cromossômicos meiótico e mitótico, bem como a biometria cromossômica em *Ucides cordatus* (Linnaeus) visando um melhor entendimento da citogenética dentro do grupo dos Brachyuros e fornecer subsídios para estudos taxonômicos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se 14 espécimes de machos *Ucides cordatus* (Linnaeus) que foram coletados em áreas de mangue, próximas à Barra de Icapara, Iguape (SP), Brasil. Esses exemplares foram mantidos em caixas plásticas com água salobra (15‰), sendo em seguida transferidos para o laboratório onde a largura cefalotorácica (LC) foi medida com o auxílio de paquímetro (0,05 mm) e o peso total de cada animal obtido em balança de precisão (0,01 g).

Para a determinação do número cromossômico foi injetada solução antimitótica na membrana de articulação entre o ísquio e o mero dos quelípodos. A solução salina estoque foi preparada utilizando-se 5 mg de colchicina, 90 mg de NaCl e 10 ml de água. O volume injetado em cada animal foi determinado pela fórmula $VI = (PA \times 2)/500$, onde VI = volume injetado e PA = peso do animal. Após a injeção, os caranguejos foram devolvidos às caixas plásticas, onde permaneceram sob aeração à temperatura de 28°C, controlada por um termostato com aquecedor. Após choque térmico em água gelada (10°C), cada espécime foi dessecado e suas gônadas foram removidas. Fragmentos dos lobos gonadais anterior, intermediário e posterior foram separados e encubados em solução hipotônica de KCl (0,01M) por 4 minutos à 25°C. Posteriormente, foram fixadas em solução Carnoy (3 etanol : 1 ácido acético glacial) e mantidas no refrigerador à 4°C. O material cortado em fragmentos com cerca de 2 mm, foi macerado em ácido acético 45% em lâmina escavada e gotejado sobre as lâminas utilizando-se uma pipeta automática fixada em um suporte universal. Após secagem, as lâminas foram coradas em solução Giemsa 2% por sete minutos e convertidas em lâminas permanentes utilizando bálsamo do Canadá.

A técnica aqui utilizada foi baseada em Justo et al. (1991), inicialmente, descrita para o lagostim *Macrobrachium rosenbergii*. No entanto, foram necessárias algumas adequações para ajustá-la para a espécie *U. cordatus*. As modificações foram feitas nos quesitos: tamanho dos espécimes (sete animais com LC \geq 53 mm e sete animais com LC $<$ 53 mm), concentração de colchicina (1 e 2 μ g/g), tempo de ação da colchicina (3, 5 e 7 horas), porção gonadal (anterior, intermediária e posterior) e altura de gotejamento (40 ou 50 cm).

A observação das lâminas foi realizada em microscópio ZEISS com aumento de até 1000x. Para a contagem dos cromossomos foram analisadas 50 metáfases no total e esse procedimento foi auxiliado pelo sistema de imagem IKAROS (Metasystems). A biometria cromossômica foi efetuada com o programa KS-300, versão 2.02 da Kontron Elektronik, utilizando-se 8 metáfases. Os comprimentos cromossômicos médios e seus respectivos desvios-padrão foram obtidos com a utilização do programa Excel (Microsoft).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das lâminas que apresentaram boas metáfases para contagem, 78% delas foram provenientes de caranguejos que possuíam LC \geq 53 mm. Já nos animais que possuíam largura inferior a 53 mm, esse índice foi menor (22%). Além disso, não foram observadas células haplóides neste último grupo. Esses resultados fornecem suporte aos dados publicados por Pinheiro & Ficarelli (2001) em que os autores descrevem que o início da maturidade sexual dá-se quando um indivíduo apresenta largura cefalotorácica superior a 53 mm. É justamente neste período que inicia-se a produção de gametas.

A melhor condensação e visualização dos cromossomos foram obtidas com o uso de colchicina 2 μ g/g durante sete horas.

Na porção anterior do lobo gonadal foi encontrado um maior número de metáfases. A altura do gotejamento de 50 cm apresentou maior eficiência no rompimento das membranas celulares (84,13%) quando comparada com a altura de 40 cm (57,21%), permitindo o adequado espalhamento dos cromossomos sobre as lâminas (Tabela 1).

Tabela 1. Eficiência dos tratamentos na obtenção de metáfases para *Ucides cordatus* (caranguejo-uçá).

Tratamento	Categoria	Total de lâminas preparadas (LP)		Lâminas com metáfases (LM)		Eficiência
		n ₁	%	n ₂	%	n ₂ x100/n ₁
Altura do gotejamento (cm)	40	222	39,93	127	31,13	57,21
	50	334	60,07	281	68,87	84,13
	Total	556	100	408	100	-
Lobo gonadal	anterior	294	52,88	266	95,68	90,48
	intermediário	107	19,24	7	2,52	6,54
	posterior	155	27,88	5	1,8	3,23
Total		556	100	278	100	-

De acordo com Chow et al. (1990), o maior número de metáfases está na região anterior porque, durante o processo reprodutivo, as porções gonadais apresentam diferentes estágios de maturação, ou seja, a maturação das células espermatogênicas está relacionada com uma região gonadal. Sendo assim, a região anterior apresenta um maior número inicial de

células em divisão por estar mais próxima ao testículo.

A maioria das metáfases mitóticas apresentou $2n = 88$ cromossomos (Figura 1). O tamanho médio geral dos cromossomos mitóticos é de $1,90 \mu\text{m} \pm 0,21$ com amplitude variando de $0,59 \mu\text{m}$ até $5,27 \mu\text{m}$ (Tabela 2).

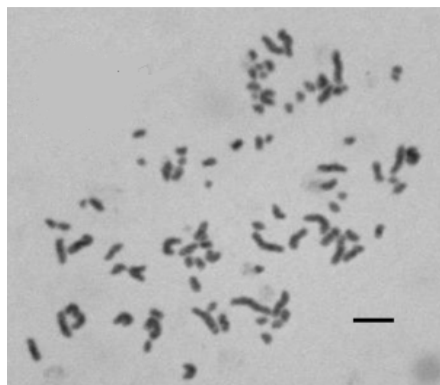


Figura 1. Metáfase mitótica de *Ucides cordatus* Linnaeus exibindo 88 cromossomos. Barra de $5,0 \mu\text{m}$.

Tabela 2. Valores do comprimento total dos cromossomos de metáfases mitóticas de *Ucides cordatus* Linnaeus.

Par			Par			Par		
Cromossômico	*CM	σ	Cromossômico	*CM	σ	Cromossômico	*CM	σ
1	4,30	0,97	16	2,15	0,36	31	1,28	0,14
	4,07	0,99		2,10	0,33		1,28	0,14
2	3,95	1,01	17	2,06	0,35	32	1,27	0,14
	3,82	0,86		1,99	0,37		1,24	0,17
3	3,63	0,76	18	1,95	0,35	33	1,23	0,15
	3,54	0,77		1,89	0,32		1,23	0,16
4	3,45	0,75	19	1,86	0,32	34	1,23	0,15
	3,26	0,49		1,82	0,35		1,22	0,15
5	3,18	0,45	20	1,79	0,33	35	1,16	0,10
	3,16	0,45		1,76	0,35		1,16	0,11
6	3,07	0,43	21	1,72	0,34	36	1,14	0,10
	3,01	0,39		1,68	0,28		1,14	0,11
7	2,93	0,43	22	1,65	0,30	37	1,11	0,12
	2,90	0,42		1,60	0,23		1,11	0,13
8	2,88	0,42	23	1,57	0,23	38	1,04	0,11
	2,86	0,41		1,56	0,23		1,02	0,11
9	2,82	0,42	24	1,53	0,21	39	0,99	0,12
	2,79	0,43		1,52	0,22		0,99	0,13
10	2,75	0,42	25	1,49	0,22	40	0,99	0,13
	2,71	0,42		1,48	0,20		0,97	0,14
11	2,63	0,48	26	1,47	0,18	41	0,96	0,15
	2,60	0,45		1,45	0,20		0,91	0,12
12	2,55	0,42	27	1,45	0,20	42	0,85	0,15
	2,49	0,40		1,43	0,17		0,85	0,15
13	2,44	0,39	28	1,43	0,17	43	0,80	0,14
	2,36	0,33		1,38	0,17		0,80	0,14
14	2,32	0,35	29	1,38	0,15	44	0,73	0,12
	2,27	0,40		1,35	0,14		0,65	0,06
15	2,25	0,37	30	1,33	0,13			

	2,18	0,35	1,31	0,15	
Tamanho médio dos cromossomos (μm)					1,90
Desvio-padrão médio					0,21

*CM = comprimento médio dos cromossomos (μm); σ = desvio-padrão.

As metáfases meióticas, geralmente, mostraram $n = 44$ cromossomos (Figura 2).

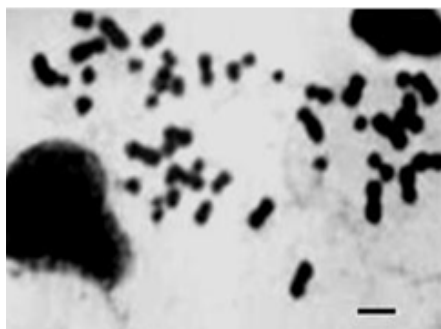


Figura 2. Metáfase meiótica de *Ucides cordatus* Linnaeus exibindo 44 cromossomos. Barra de 5,0 μm .

Tanto na meiose quanto na mitose foi observado uma ampla variação na contagem do número cromossômico havendo células que possuíam $2n = 85, 88, 90, 92, 101$ ou 105 cromossomos (Figura 3) e $n = 36, 37, 40, 42, 44, 50$ ou 52 cromossomos (Figura 4).

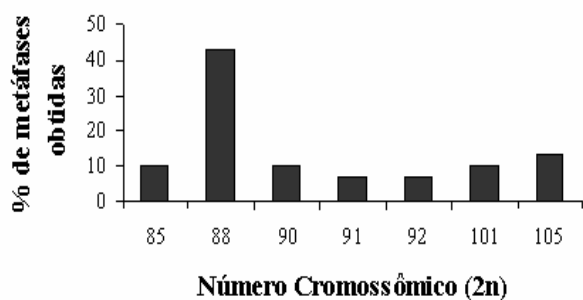


Figura 3. Variação do número cromossômico diplóide ($2n$) encontrado nas gônadas de *Ucides cordatus* Linnaeus.

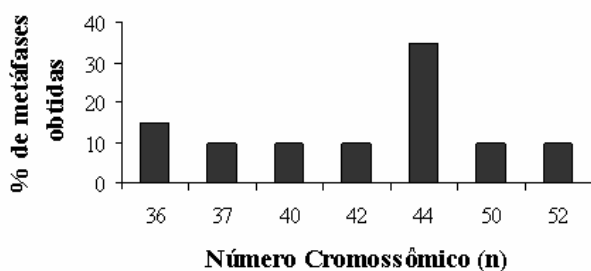


Figura 4. Variação do número cromossômico haplóide (n) encontrado nas gônadas de *Ucides cordatus* Linnaeus.

Na infra-ordem Brachyura não há um número básico haplóide predominante. Conforme White (1973) esse número pode variar de $n = 27-60$ cromossomos. Trentini et al. (1992) definiram o número cromossômico para as espécies *Carcinus mediterraneus* ($2n = 88$; $n = 44$) com biometria variando de 0,7 até 2,0 μm . Segundo os autores, geralmente, os cromossomos são pequenos impossibilitando a classificação dos mesmos baseado no índice centromérico. Esse relato é semelhante ao encontrado no presente trabalho para a espécie *Ucides cordatus*, com exceção de que o caranguejo-uçá pode apresentar tanto cromossomos maiores quanto menores quando comparado ao *C. mediterraneus*.

Na literatura, alguns trabalhos relatam o alto número cromossômico em crustáceos: *Liocarcinus maculatus* com $2n = 80$ e $n = 40$ (TRENTINI et al., 1992), isópodos como *Idotea báltica* Pallas e *Idotea chelipes* Pallas apresentam $2n = 58$ cromossomos. Algumas espécies dos gêneros *Mysis* e *Praunus sp* possuem $2n = 90-100$ cromossomos (SALEMMA, 1986). De acordo com Chow et al. (1990), alguns crustáceos do gênero *Penaeus* também apresentam $n = 44$ cromossomos.

Justo et al. (1991) também encontraram essa variação quando pesquisaram a carilogia do lagostim de água doce *Macrobrachium rosenbergii*. Esta espécie apresentou $2n = 102, 106, 110, 114$ ou 118 e $n = 53, 56, 59, 62$ ou 65 . Essa contagem errônea pode ser explicada pelo alto número de cromossomos e o pequeno tamanho dos mesmos. Além disso, as sobreposições cromossômicas e a falta de visualização dos centrômeros em alguns cromossomos dificultam a exata contagem cromossômica em algumas metáfases, bem como o reconhecimento de um par cromossômico em particular. Segundo esses autores os machos de *M. rosenbergii* possuem $2n = 118$ e $n = 59$ cromossomos.

4 - CONCLUSÃO

Além do interesse teórico-científico, as informações citogenéticas obtidas nesse trabalho, contribuem para um melhor entendimento das diferenças citotaxonômicas encontradas em crustáceos e fornecem suporte para estudos de genealogia e taxonomia em *U. cordatus*. Também podem atuar como embasamento para futuras pesquisas de manipulação dos cromossomos, bem como a produção de progênie híbrida para fins comerciais, sendo de interesse para citogeneticistas, taxonomistas e melhoristas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA FILHO, P. Contribuição ao estudo da biologia e ecologia do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda, Brachyura), no Manguezal do Rio Ceará (Brasil). *Arquivos de Ciências do Mar*, v. 18, n. 1/2, p. 1-41, mar. 1978.
- CHOW, S.; DOUGHERTY, W. J.; SANDIFER, P. A. Meiotic chromosome complements and nuclear DNA contents of four species of shrimps of the genus *Penaeus*. *Journal of Crustacean Biology*, v. 10, n. 1, p. 29-36, feb. 1990.
- FAUSTO FILHO, J. Crustáceos decápodos de valor comercial ou utilizados como alimento no nordeste brasileiro. *Boletim da Sociedade Ceraense Agrônômica*, v. 9, p. 27-28, dez. 1968.
- GEO BRASIL. *Perspectivas do Meio Ambiente*. 1.ed. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Brasília, Brasil. 2002, 447 p.
- JUSTO, C. C.; MUROSFUSHI, M.; AIDA, K.; HANYU, I. Karyological studies on the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, v. 97, p. 327-334, jun. 1991.
- KOCK, V. *Epibenthic production and energy flow in the Caeté mangrove estuary, North Brazil*. ZMT Bremen Contribution, Center for Tropical Marine Ecology of Bremen, Germany, 1999, 97 p.
- LIMA, G. V.; OSHIRO, L. M. Y. Maturidade sexual do caranguejo *Armases rubripes* (Rathbun) (Crustaceae, Brachyura, Sesamidae) na Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 23, n. 4, p. 1078-1086, dez. 2006.
- MANTELATTO, F. L. M.; FRANZOSO, A. Size at sexual maturity in *Callinectes ornatus* (Brachyura, Portunidae) from the Ubatuba region (SP), Brazil. *Nauplius*, v.4, p.29-38, dez. 1996.
- MARTINEZ, A. P. Procedimento para facilitar el estudio de cromosomas en materials vegetales dificiles. *Cuadernos G. Biologica*, v. 5, p. 53-60, sep. 1976.
- MELO, G. A. S. *Manual de apoio à fiscalização do caranguejo-uçá (Ucides cordatus)*. 1.ed. Centro de Pesquisas e Gestão dos Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste e Sul do Brasil/IBAMA, Itajaí, Brasil, 1996. 43 p.
- NASCIMENTO, S. A. *Biologia do caranguejo-uçá (Ucides cordatus)*, Petrobrás – Adema, 1993, 48 p.
- PASSOS, C. A.; DI BENEDITTO, A. P. M. Captura comercial do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (L., 1763), no Manguezal de Gargaú, RJ. *Biotemas*, v. 18, n. 1, p. 223-231, jan. 2005.
- PINHEIRO, M. A. A.; FISCARELLI, A. G. *Manual de apoio a fiscalização do caranguejo-uçá (Ucides cordatus)*. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA)/ Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Sudeste e Sul (CEPSUL), 1.ed., ISBN 85-88570-02-5, Itajaí, 2001. 43 p.
- SALEMAA, H. The chromosomes of *Asellus aquaticus* (L.) – A technique for isopod karyology. *Crustaceana*, v. 36, n. 3, p. 316-318, sep. 1979.

SALEMAA, H. Karyology of the northern Baltic peracaridan Crustaceae. *Sarsia*, v.71, p.17-25, jan. 1986.

THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; CUZIN-ROUDY, J. Karyological study of the mediterranean krill *Meganyctiphanes norvegica* (Euphausiacea). *Journal Crustacean Biology*, v. 15, n. 1, p. 79-85, jan. 1995.

THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; LEITÃO, A.; CUZIN-ROUDY, J. Chromosome diversity in Mediterranean and Antarctic euphausiid species (Euphausiacea). *Journal Crustacean Biology*, v. 18, n. 2, p. 290-297, mar. 1998.

TRENTINI, M.; CORNI, M. G.; FROGLIA, C. The chromosomes of *Carcinus mediterraneus* (Czerniavsky, 1884), *Liocarcinus maculatus* (Risso, 1827) and *Necora puber* (L. 1767) (Decapoda, Brachyura, Portunidae). *Zoologischer Anzeiger*, v. 228, n.½, p. 39-44, apr. 1992.

WHITE, M. D. J. *Animal Cytology and Evolution*. London and New York, Cambridge University Press. 1973. 961 p.

¹Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Jaboticabal, Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária – Via Prof. Paulo Donato Castellane, s/n – 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: fortol@ig.com.br

²Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus Litoral Paulista, Unidade São Vicente – Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos (CRUSTA) – Praça Infante Dom Henrique, s/n – 11330-900, São Vicente, SP, Brasil.