

Amanda Bonini¹; Gisele Orlandi Introíni^{1,3}; Lenita de Freitas Tallarico¹; Fabrício Marcondes Machado²; Flávio Dias Passos² e Shirlei Maria Recco-Pimentel¹

¹Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo; e-mail: amanda.s.bonini@gmail.com

²Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo

³Departamento de Ciências Básicas e da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Agência financiadora : CNPq/PIBIC

Palavras-Chave: *Caryocorbula*, Espermatozoide, Ultra-estrutura, gene RNAr 16S

Introdução

A sistemática da família Corbulidae baseada apenas em comparações morfológicas e em caracteres conquiológicos permanece confusa e controversa devido à grande plasticidade fenotípica das conchas. No presente trabalho, animais de dois morfotipos de *Caryocorbula* do litoral norte do Estado de São Paulo, foram analisados com o intuito de determinar se os espécimes pertenciam a espécies diferentes.

Material e Métodos

Os espécimes de *Caryocorbula caribaea* e *Caryocorbula* sp. foram coletados no litoral Norte do Estado de São Paulo, na Praia do Araçá em São Sebastião e na Praia do Engenho D'água em Ilhabela, respectivamente, na região infralitoral onde vivem enterrados em sedimentos arenolamosos.

Análise ultra-estrutural dos espermatozoides

Fragmentos pequenos (de 0,1-0,3 mm) das gônadas masculinas foram preparados para análise ultra-estrutural e os cortes ultrafinos foram observados em microscópio eletrônico de transmissão (ZEISS, LEO 906).

Análise das seqüências de DNA

Foram analisados fragmentos do gene RNAr 16S de cinco exemplares do gênero *Caryocorbula*. O DNA genômico foi isolado e amplificado usando os primers: 16SL2a (5'-CCAAACGAGCCTAGTGATAGCTGGT-3') e 16Sbr (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'). As seqüências dos genes RNAr 16S amplificadas por meio da técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR) foram editadas e alinhadas com o auxílio do programa BioEdit v. 7.0.9. O alinhamento das seqüências foi realizado com auxílio do aplicativo ClustalW.

Resultados

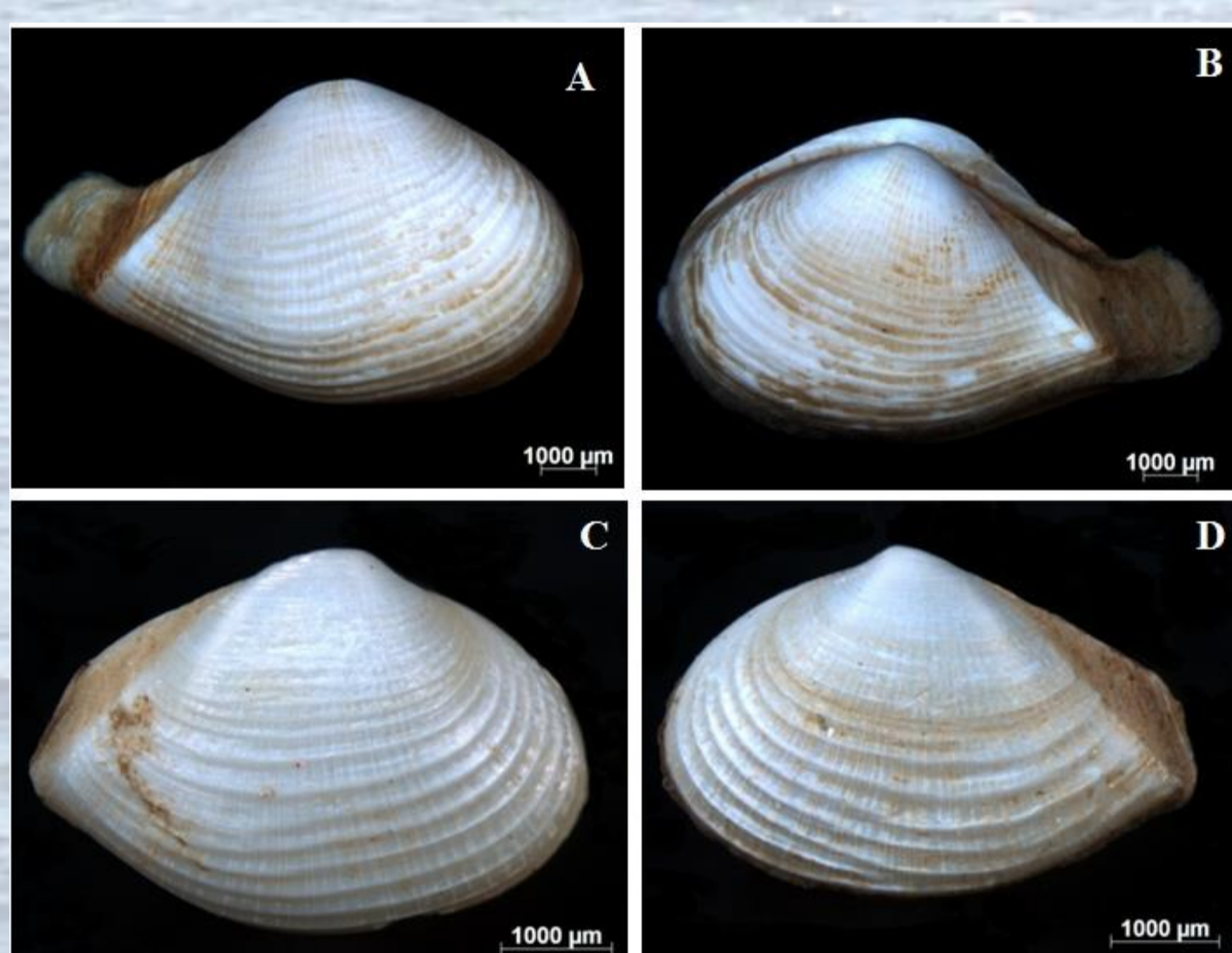


Fig.1: *Caryocorbula caribaea*: vista externa da valva direita (A) e da esquerda (B). *Caryocorbula* sp.: vista externa da valva direita (C) e da esquerda (D).

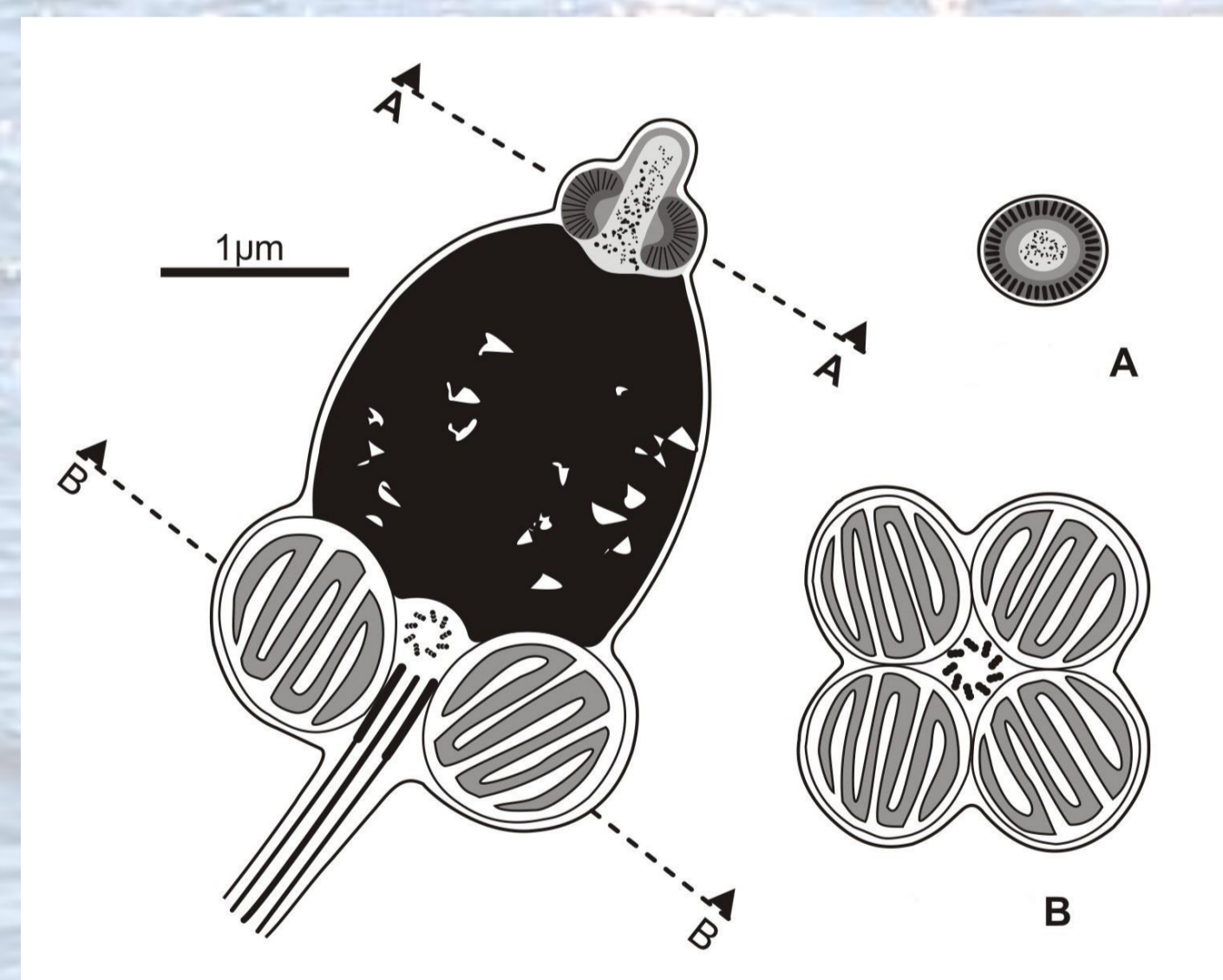


Fig.2: Esquema geral do espermatozoide do gênero *Caryocorbula*.

Medidas das estruturas dos gametas de *C. caribaea* e *Caryocorbula* sp.

Espécimes	Comprimento do acrossomo + área subacrossomal	Largura da base do acrossomo	Comprimento do núcleo	Largura da região mediana do núcleo
<i>C. caribaea</i>	0,4±0,01	0,48±0,04	1,27±0,06	1,21±0,27
<i>Caryocorbula</i> sp.	0,51 ± 0,09	0,51 ± 0,05	1,40± 0,11	1,23±0,05

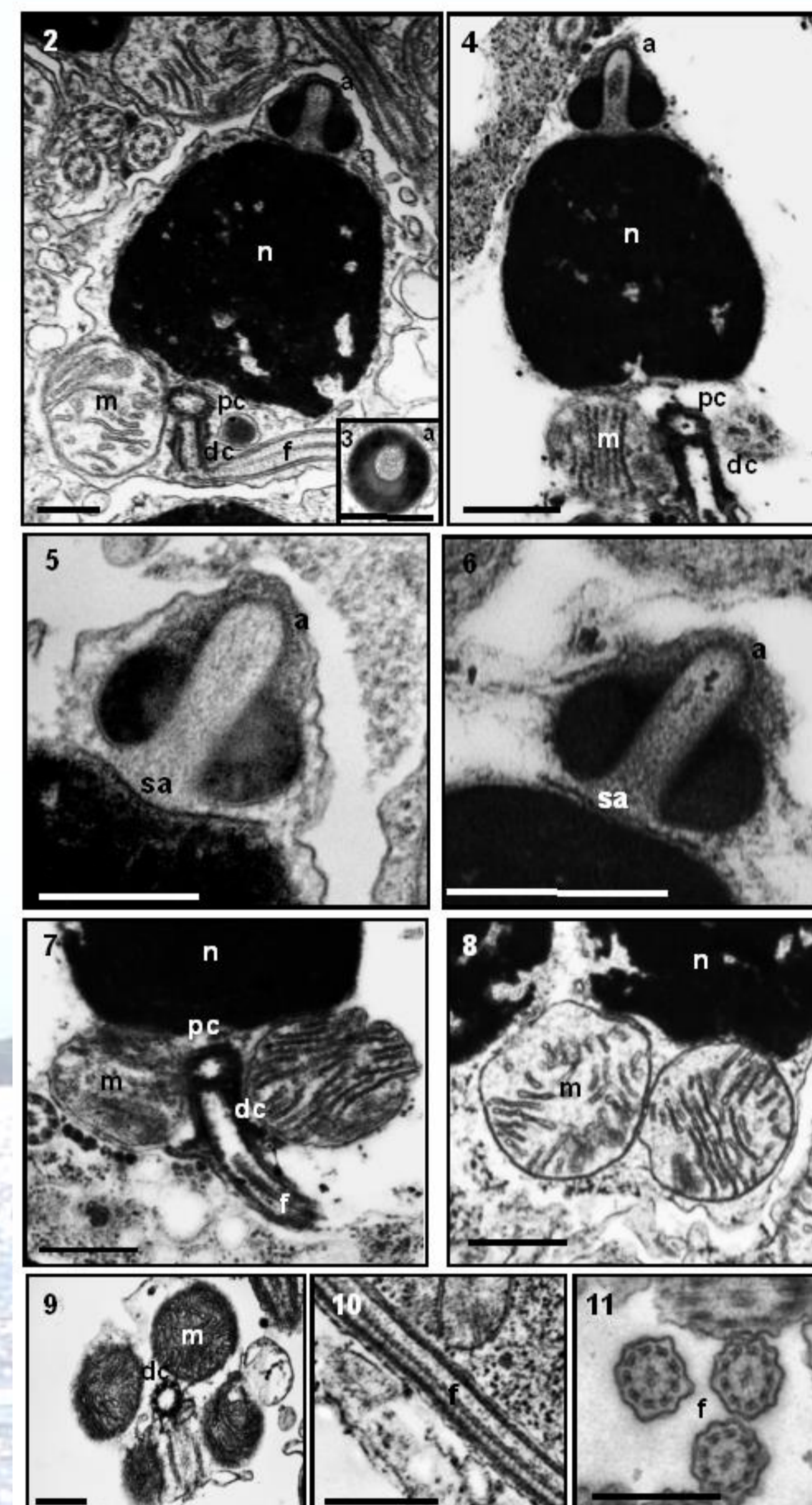


Fig.3: imagens das estruturas do espermatozoide de *C. caribaea* e *Caryocorbula* sp. figs 3.2 e 3.4: corte longitudinal do gameta de *C. caribaea*, e *caryocorbula* sp respectivamente, mostrando o acrossomo, o núcleo em forma de "barril" e a peça intermediária. A cromatina não é fortemente condensada, evidenciando os espaços entre os cordões cromatínicos. Fig 3.3: Corte transversal do acrossomo de *C. caribaea*. Figs 3.5 e 3.6: corte longitudinal do acrossomo de *C. caribaea* e *Caryocorbula* sp respectivamente. Em ambos os casos o acrossomo é curto e cônico, sendo a base arredondada nas extremidades laterais e composta por um material elétron-denso, o ápice é abaulado e a área subacrossomal é elétron-lúcida composta por material difuso. Fig. 3.7: Corte longitudinal da peça intermediária de *Caryocorbula* sp, evidenciando os centríolos proximal e distal. Fig. 3.8: Corte longitudinal da peça intermediária de *C. caribaea*, evidenciando as mitocôndrias. Fig 3.9: Corte transversal da peça intermediária de *C. caribaea*, evidenciando o centríolo distal. Fig 3.10: Corte longitudinal do flagelo de *Caryocorbula* sp. Fig 3.11: Corte transversal do flagelo de *Caryocorbula* sp evidenciando a estrutura de microtúbulos 9+2.

a: acrossomo, dc: centríolo distal, f: flagelo, m: mitocôndria, n: núcleo, pc: centríolo proximal. Escala figs. 3.2 a 3.11: 0,5 µm.

Análises moleculares

Os fragmentos do gene RNAr 16S amplificados, foram de aproximadamente 910 pares de base de nucleotídeos a partir do DNA genômico dos cinco organismos de *Caryocorbula*. Os espécimes de *Caryocorbula caribaea* mostraram similaridade de 100% quando comparados entre si. Já os espécimes de *Caryocorbula* sp. apresentaram índice de similaridade entre 92% e 98% quando comparados a *C. caribaea*. Deve-se destacar que nenhuma seqüência do gene RNAr 16S de *Caryocorbula* foi encontrada no GeneBank para ser incluída nesta análise.

Conclusão

1. Os espécimes de *Caryocorbula caribaea* e *Caryocorbula* sp. se mostraram muito semelhantes em relação a ultra- estrutura do gameta masculino e em relação às seqüências de DNA comparadas, que foi acima de 90%, portanto é possível concluir que os mesmos correspondem a uma única espécie, se mantendo celular e geneticamente conservados apesar da grande plasticidade da concha.

2. A variação da concha provavelmente ocorre devido a fatores ambientais e temporais ou até mesmo devido a diferentes estágios de desenvolvimento. Acredita-se que indivíduos jovens e adultos de Corbulidae possam apresentar a mesma altura, o que muda com o passar do tempo é a espessura da concha (Eliane Pintor de Arruda - comunicação pessoal). Esse padrão de crescimento sugere que exemplares de *Caryocorbula* sp. sejam jovens (mais ativos) de *Caryocorbula caribaea*. Possivelmente, a mancha clara a partir do umbo (presente nas etapas juvenis) se esvaneca na medida em que a espessura das valvas torna-se maior.

Agradecimentos: