



# Método para obtenção de metáfases mitóticas de ostras para o estudo do cariótipo

Rafael Alves\*

Aimê Rachel Magenta Magalhães

Laboratório de Malacologia Experimental (LAMEX)  
Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias  
Universidade Federal de Santa Catarina  
Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88040-900, Florianópolis – SC, Brasil

\*Autor para correspondência  
rafael@cca.ufsc.br

Submetido em 30/08/2009  
Aceito para publicação em 10/12/2009

## Resumo

Atualmente a maricultura está em expansão no litoral de Santa Catarina e Florianópolis é a maior cidade produtora de ostras do Brasil, sendo cultivada a ostra japonesa *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Sobre as ostras nativas há necessidade de muitos tipos de estudo, incluindo aqueles que auxiliem a elucidar a complexa questão sobre o número de espécies brasileiras do gênero *Crassostrea*. Os estudos taxonômicos de ostras têm se baseado, quase que exclusivamente, na morfologia das conchas de indivíduos recentes e fósseis, a qual nem sempre tem sido suficiente para diferenciar as espécies. Informações citogenéticas podem ser importantes, como características adicionais, para auxiliar na taxonomia. O objetivo deste trabalho foi experimentar e adequar metodologias tradicionalmente empregadas em citogenética animal para a obtenção de metáfases mitóticas para o estudo do cariótipo de ostras. Foram utilizados espécimes coletados na Praia da Ponta do Sambaqui – Florianópolis/SC/Brasil. O método mais eficaz foi a utilização de brânquias obtidas de animais tratados por 12h em solução de colchicina a 0,005% em água do mar, com tratamento hipotônico de 30min em solução de água deionizada 1:1. Apresenta-se um método que permite obter metáfases em quantidades maiores, com número pequeno de cromossomos sobrepostos e morfologia cromossômica bem definida para análise.

**Unitermos:** Citogenética, *Crassostrea*, cromossomos, ostras, divisão celular

## Abstract

**Method of obtaining metaphase cells for oyster karyotyping.** Currently, mariculture is growing on the coast of Santa Catarina and Florianópolis is the largest producer of oysters in Brazil, cultivating the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). Regarding the native oyster, many types of study are needed, including those that help to elucidate the complex question of the number of species of the genus *Crassostrea*. Taxonomic studies of oysters have been based almost exclusively on the morphology of the shells of recent and fossil individuals, and they have not always been effective in differentiating between species. Cytogenetic information can be important, to provide additional features to aid in taxonomy. The aim of this study was to test and adapt methodologies traditionally applied in animal cytogenetics to obtain metaphase cells for oyster karyotyping. Specimens collected in Ponta do Sambaqui – Florianópolis/SC/Brazil. Were used the most effective

method was obtained using gills from animals treated for 12h in a solution of 0.005% colchicine in seawater, plus treatment with hypotonic solution for 30min with deionized water 1:1. This paper presents a method to obtain a greater number of metaphases, with few overlapping chromosomes and well-defined chromosome morphology.

**Key words:** chromosomes, *Crassostrea*, Cytogenetics, oysters, cell division

## Introdução

Os moluscos estão entre os invertebrados mais conhecidos, nos quais estão incluídos as ostras, os caramujos, as lesmas, os mexilhões, os polvos e as lulas. Segundo Barnes e Harrison (1994), os moluscos constituem o segundo maior grupo animal, estando os insetos em primeiro lugar em número de espécies. A classe Bivalvia, também conhecida por Pelecypoda, abrange moluscos comprimidos lateralmente e possuidores de duas valvas encaixadas dorsalmente (Ruppert e Barnes, 1996). Dentro desta classe encontramos o grupo das ostras, pertencentes à superfamília Ostracea, que representa uma importante parcela da epifauna dos costões rochosos, quase sempre possuindo a concha achatada, com a valva esquerda cimentada firmemente em substrato consolidados. Suas conchas possuem um padrão morfológico variado e irregular, quase sempre seguindo a conformação do substrato (Harry, 1985).

Segundo Rios (1994), o gênero *Crassostrea*, pertencente à família Ostreidae, ocupa no Brasil uma extensa área em ecossistemas costeiros, variando desde regiões de costão, onde formam estoques naturais nas regiões entre-marés e no infralitoral, até regiões de manguezal, nas raízes de *Rhizophora mangle* (Linnaeus, 1753).

De acordo com Absher (1989), especificamente no litoral sul do Brasil há citações da ocorrência de duas espécies do gênero *Crassostrea*: *C. rhizophorae* (Guilding, 1828), encontrada nas regiões de entre marés de costões rochosos e em raízes de *R. mangle* (Mangue Vermelho) e *C. brasiliiana* (Lamarck, 1819), somente encontrada no infralitoral. Absher (1989) utilizou como argumento para a diferenciação taxonômica dessas duas espécies resultados baseados em análises de iso-enzimas, informando ainda que as duas espécies apresentam morfologia muito semelhante. Porém, para autores como Rios (1994), a *C. brasiliiana* representa

uma sinonímia da *C. rhizophorae*. Magalhães et al. (1987), em levantamento das espécies de ostras realizado no litoral de Santa Catarina referem-se somente a *C. rhizophorae*, dentro do gênero *Crassostrea*.

A classificação das ostras sempre foi complexa e problemática, ocorrendo diversos erros e muitas sinonímias (Alves, 2007). O estudo taxonômico desse grupo tem se baseado quase que exclusivamente em observações morfológicas das conchas de representantes atuais e fósseis. Buroker et al. (1979) já afirmavam que apenas estes dados podem levar a conclusões errôneas quanto à posição de determinadas espécies em relações filogenéticas. Segundo Hedgecock e Okazaki (1984), as ostras do gênero *Crassostrea* mantêm afinidades sistemáticas incertas e semelhanças morfológicas muito intensas, o que dificulta muito a identificação, sugerindo que os métodos mais eficientes para esta distinção sejam aqueles que levem em consideração a estrutura ou sequências do DNA.

A afirmação de que o cariótipo de uma espécie pode ser considerado como a maneira pelo qual o DNA nuclear daquela espécie está organizado em cromossomos, sendo na maioria dos casos constante para todas as células do organismo (White, 1977), segue sendo válida, mesmo atualmente na era genômica. Sendo assim, a análise do cariótipo de uma espécie é muito informativa, sobretudo para estudos com objetivos de comparações interespecíficas, ou seja, citotaxonômicos, nos quais normalmente examinam-se o número, o tamanho e a forma (posição do centrômero e/ou presença e posição de constrições) dos cromossomos metafásicos, buscando encontrar diferenças e semelhanças entre espécies (Klaczko, 2000). Para tanto, o primeiro passo é a obtenção de boas preparações citológicas, ou seja, preparações onde a quantidade e a qualidade de metáfases sejam adequadas para sua avaliação. Thiriot-Quévieux e Ayraud (1982), Rodriguez-Romero e Oca (1998), Leitão et al. (1999) e Wang et al. (1999) basearam

seus estudos de citogenética de ostras em metodologias que não se consegue reproduzir adequadamente em laboratório. Sendo assim, a fim de contribuir, através de estudos citotaxonômicos, para a solução do problema da taxonomia das ostras nativas do gênero *Crassostrea* no litoral catarinense, o primeiro passo foi estabelecer um método de obtenção de metáfases mitóticas para a caracterização do cariótipo desses animais, adaptado às nossas condições laboratoriais.

## Material e Métodos

Foram utilizados espécimes de ostras nativas do gênero *Crassostrea*, coletados no costão da Ponta do Sambaqui (27°29'16"S - 48°32'24"O) no litoral da Ilha de Santa Catarina, Florianópolis, estado de Santa Catarina, Brasil, no período de agosto de 2001 a abril de 2002, totalizando 13 lotes com um total de oitenta animais. Nos lotes 1 a 12 foram utilizadas cinco ostras por lote e no lote 13 vinte ostras.

Os lotes de animais coletados foram acondicionados em um aquário com aeração constante e filtro biológico exclusivo para as ostras do experimento, onde permaneceram por um prazo de um a três dias para serem processadas.

O processo para obtenção de metáfases mitóticas foi realizado em cinco etapas que foram seguidas em todos os lotes: 01 – Preparação dos animais; 02 – Incubação em colchicina (paralisação da divisão celular na fase de metáfase); 03 – Tratamento hipotônico; 04 – Fixação; 05 – Preparação das lâminas.

Lote 01: As valvas do animal foram afastadas, sendo inserida uma pequena cunha de plástico entre elas para mantê-las entreabertas. A ostra assim permaneceu durante 3h em um béquer de vidro com uma solução de colchicina em água do mar a 0,005%. Em seguida, as brânquias foram dissecadas e incubadas durante 30min em uma solução de citrato de sódio 0,9% para hipotonização. As brânquias foram picotadas com o auxílio de uma pequena tesoura e centrifugadas por 5min a 1000rpm em uma solução fixadora, contendo metanol absoluto e ácido acético glacial na proporção de 3:1. O procedimento de fixação do material foi repetido

três vezes, descartando-se o sobrenadante. A suspensão celular obtida foi gotejada em quatro lâminas, sendo uma seca, uma úmida com álcool e duas úmidas com água destilada. Depois de secas as preparações foram coradas com Giemsa a 4% em tampão fosfato de pH 6,8 (1:20) por 10min e, em seguida, lavadas em água de torneira e secas à temperatura ambiente.

Lote 02: Foi repetido o procedimento do lote 01, alterando o tempo de incubação em colchicina a 0,005% para 40h.

Lote 03: A valva esquerda de cada animal foi retirada e os animais permaneceram durante 12h em recipiente de vidro, no escuro, em uma solução de colchicina a 0,005%, com aeração constante. As brânquias foram dissecadas, incubadas durante 30min em solução de água do mar a 25% para hipotonização, e posteriormente fixadas através de três banhos de 30min em uma solução de ácido acético glacial e metanol absoluto na proporção de 1:3. Logo após a fixação, as brânquias foram fragmentadas com o auxílio de uma pequena tesoura e ressuspendidas com pipeta Pasteur em uma solução de ácido acético a 50% até a completa dissolução do tecido; esta suspensão foi posteriormente gotejada em duas lâminas, sendo uma seca e outra úmida com água destilada. Depois de secas, as lâminas foram coradas com Giemsa a 4% em tampão fosfato de pH 6,8 (1:20) por 10min e posteriormente lavadas com água de torneira e secas à temperatura ambiente.

Lote 04: Foi repetido o procedimento do lote 03, alterando o choque hipotônico, de água do mar a 25%, para uma incubação da brânquia dissecada por 1h em água destilada à temperatura ambiente.

Lote 05: Foi repetido o procedimento do lote 03, alterando o choque hipotônico, que consistiu de incubação por 1h em água deionizada (milli Q) a temperatura ambiente.

Lote 06: Neste lote foi repetido o procedimento do lote 05, sendo que a brânquia foi fragmentada em oito pedaços e cada fragmento permaneceu em tratamento hipotônico com água deionizada (milli Q) por tempos diferentes: 05, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40min.

Lotes 07 e 08: Foi repetido o procedimento do lote 06, alterando para seis fragmentos e os tempos do choque

hipotônico com água deionizada (milli Q) para 10, 20, 30, 40, 50 e 60min.

Lotes 09 e 10: Foram repetidos os procedimentos dos lotes 07 e 08, alterando o choque hipotônico por uma incubação de 10, 20, 30, 40, 50 e 60min em uma solução de água deionizada (milli Q) e água destilada na proporção de 1:1, mantida refrigerada a 4°C.

Lotes 11, 12 e 13: Foram repetidos os procedimentos dos lotes 09 e 10, alterando o choque hipotônico para uma incubação de 10min em uma solução de água deionizada (milli Q) e água destilada na proporção de 1:1 mantida refrigerada a 4°C e aquecendo as lâminas a 44°C antes do gotejamento da suspensão celular, de acordo com o seguinte método:

01 – Coletar as ostras, escovar a concha externamente e retirar as incrustações biológicas;

02 – Colocar os animais em aquário com água do mar do local de coleta, devendo permanecer assim por, no máximo, 24h;

03 – Preparação dos animais: Retirar a valva esquerda do animal (descolar o músculo adutor da mesma com auxílio de bisturi) e lavar o indivíduo com água do mar;

04 – Incubação em colchicina (paralisação da divisão celular na fase de metáfase): Preparar uma quantidade de solução de colchicina a 0,005% diluída em água do mar suficiente para recobrir o animal no recipiente onde for feita a incubação; Manter o animal na solução de colchicina, aerada com pedra porosa, por 12h, em temperatura ambiente e no escuro;

05 – Tratamento hipotônico: Preparar uma solução de água deionizada (milli-Q)/água destilada, 1:1; Retirar o animal da colchicina e lavá-lo com água do mar filtrada; Dissecar as brânquias; Colocar as brânquias em um recipiente com a solução hipotônica por 10min, refrigerada a 4°C;

06 – Fixação: Preparar uma solução de metanol absoluto e ácido acético glacial, 3:1; Colocar as brânquias em um recipiente contendo a solução de metanol/ácido acético; Aguardar 30min; Substituir o fixador mais duas vezes, aguardando 30min entre as trocas;

**Observação:** a partir desta etapa o tecido fixado poderá ser armazenado sob refrigeração, a 4°C, em recipiente tampado contendo o fixador, até o momento da preparação das lâminas.

07 – Preparação das lâminas: Retirar a brânquia do fixador; Cobri-la com uma solução de ácido acético 50%; Triturar o tecido com o auxílio de uma tesoura e ressuspender o líquido com uma pipeta Pasteur várias vezes, até a completa dissolução do mesmo; Aquecer as lâminas de vidro (previamente lavadas com detergente neutro) a 44°C; Pingar algumas gotas da suspensão celular sobre a lâmina, limpa e aquecida, de maneira uniforme; Deixar secar à temperatura ambiente; Corar com Giemsa a 4%, em tampão fosfato de pH 6,8 (1:20) por 10min; Lavar com água de torneira e secar à temperatura ambiente.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus modelo CX-31, e as metáfases mitóticas foram fotografadas em um microscópio óptico Olympus modelo BH-2.

## Resultados

Do lote 1 ao 8, um total de 575 preparações foram obtidas de 40 animais, nas quais não foram observadas metáfases; somente a partir do lote 9 é que foi possível a observação das primeiras metáfases, tendo sido encontradas quatro metáfases em 150 preparações. No lote 10 foram visualizadas seis metáfases em 150 preparações, no lote 11 foram 37 metáfases em 25 preparações, no lote 12 obteve-se 17 metáfases em 25 preparações e no lote 13 foram 197 metáfases em 100 preparações.

A partir do lote 9 foi utilizada para tratamento hipotônico das brânquias uma solução de água deionizada (milli Q) e água destilada na proporção de 1:1, gelada, a qual se mostrou a melhor das soluções hipotônicas testadas, pois esse tratamento proporcionou metáfases mitóticas com baixo número de cromossomos sobrepostos e sem ganhos ou perdas de cromossomos. Na bateria de testes com seis tempos diferentes de tratamento, foi possível visualizar metáfases somente na preparação 01 (Figura 1A), que equivale ao tempo de 10min de

hipotonização. Nos outros tempos de hipotonização as células se romperam muito violentamente e os cromossomos se dispersaram.

No lote 10 foi repetido o experimento com os mesmos tempos do lote 9 e resultados semelhantes foram obtidos, ou seja, metáfases na preparação 01 (Figura 1B), com material tratado 10min na solução hipotônica.

A partir dos resultados obtidos no lote 11, foi repetido o experimento, utilizando somente o tempo de 10min na solução hipotônica. Nestes animais, obteve-se uma quantidade maior de metáfases (Figura 1C a 1F) e com bases nestes resultados foi elaborado o protocolo final para análise cariotípica de ostras (Tabela 1).

TABELA 1: Método para obtenção de metáfases mitóticas de ostras.

Etapa 1
01 – Coletar e escovar a concha externamente, retirando as incrustações biológicas;
02 – Colocar os animais em aquário com água do mar do local de coleta, devendo permanecer assim por, no máximo, 24h;
03 – Preparação dos animais: Retirar a valva esquerda do animal (descolar o músculo adutor da mesma com auxílio de bisturi) e lavar o indivíduo com água do mar;
04 – Incubação em colchicina (paralisação da divisão celular na fase de metáfase): Preparar uma quantidade de solução de colchicina a 0,005% diluída em água do mar suficiente para recobrir o animal no recipiente onde for feita a incubação; Manter o animal na solução de colchicina, aerada com pedra porosa, por 12h, em temperatura ambiente e no escuro;
05 – Tratamento hipotônico: Retirar o animal da colchicina e lavá-lo com água do mar filtrada; Dissecar as brânquias; Colocar as brânquias em um recipiente com a água deionizada e água destilada 1:1 por 10min, refrigerada a 4°C;
06 – Fixação: Preparar uma solução de metanol absoluto e ácido acético glacial, 3:1; Colocar as brânquias em um recipiente contendo a solução de metanol/ácido acético; Aguardar 30min; Substituir o fixador mais duas vezes, aguardando 30min entre as trocas;
<b>Observação:</b> a partir desta etapa o tecido fixado poderá ser armazenado sob refrigeração, a 4°C, em recipiente tampado contendo o fixador, até o momento da preparação das lâminas.
Etapa 2
07 – Preparação das lâminas: Retirar a brânquia do fixador; Cobri-la com uma solução de ácido acético 50%; Triturar o tecido com o auxílio de uma tesoura e ressuspender o líquido com uma pipeta Pasteur várias vezes, até a completa dissolução do mesmo; Aquecer as lâminas de vidro (previamente lavadas com detergente neutro) a 44°C; Pingar algumas gotas da suspensão celular sobre a lâmina, limpa e aquecida, de maneira uniforme; Deixar secar à temperatura ambiente; Corar com Giemsa a 4%, em tampão fosfato de pH 6,8 (1:20) por 10min; Lavar com água da torneira e secar à temperatura ambiente.

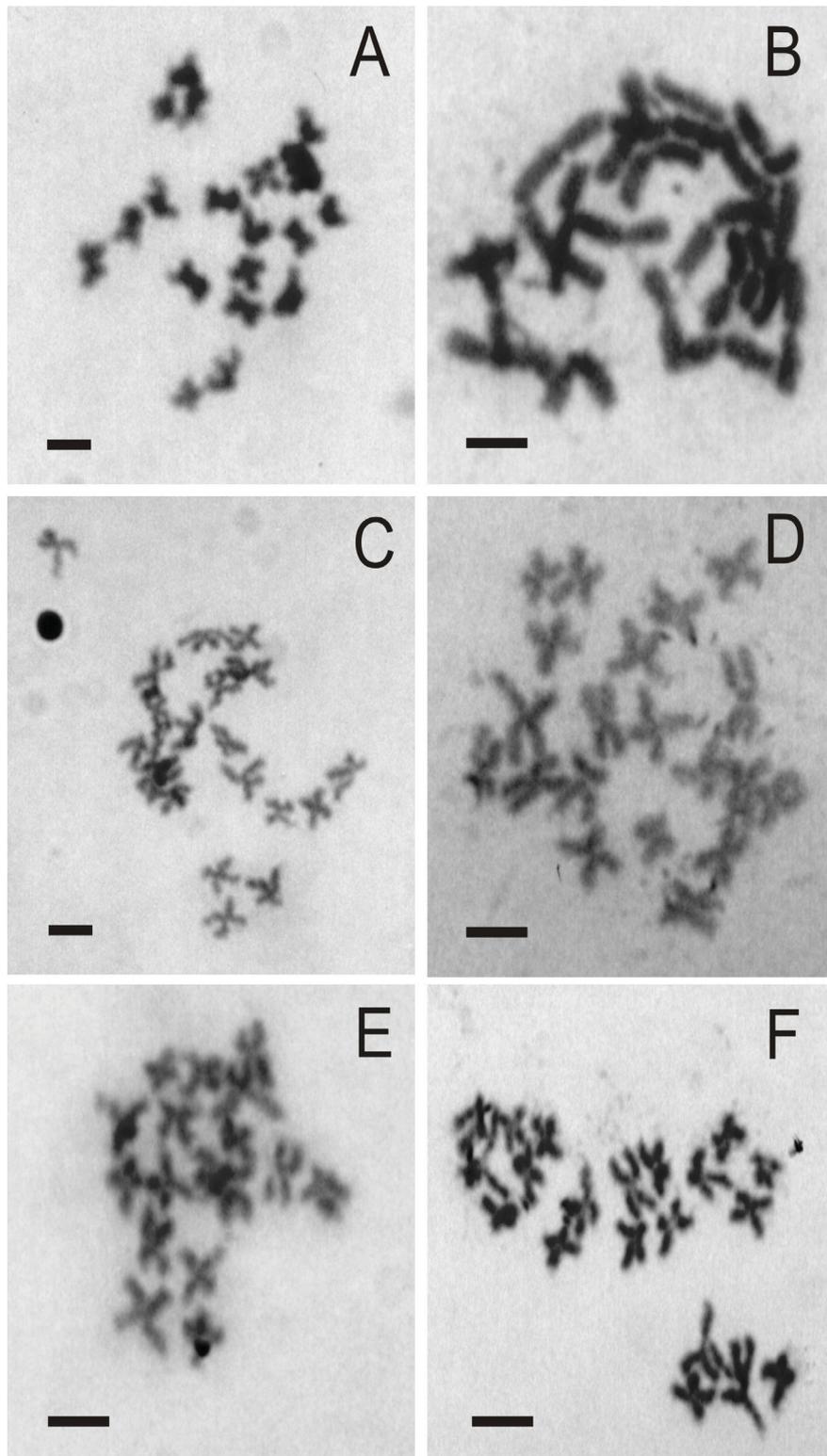


FIGURA 1: Metáfases mitóticas de ostras do gênero *Crassostrea*, obtidas de brânquias tratadas com solução de colchicina a 0.005% em água do mar, durante 12h, à temperatura ambiente, com solução hipotônica (água deionizada e água destilada-1:1), por 10 min, a 4°C, fixadas com metanol e ácido acético (1:1), e dissociadas em ácido acético 50% para obtenção de suspensão celular. A e B- Lotes 09 e 10, respectivamente, cujas suspensões celulares foram gotejadas sobre lâminas secas, à temperatura ambiente; C a F- Lotes 10 a 13, respectivamente, cujas suspensões celulares foram gotejadas sobre lâminas secas, à temperatura de 44°C. Barras: 5µm.

## Discussão

Nos animais dos lotes 01 e 02, as valvas foram afastadas e, no espaço entre elas, foi acondicionada uma pequena cunha de plástico, o que impediu os animais de se fecharem. Assim, as brânquias ficaram em contato constante com a solução de colchicina 0,005%. Todavia, nesta condição, não foram encontradas metáfases. A partir do lote 03 foi adotada a sugestão de Thiriot-Quévieux e Ayraud (1982), com relação a retirar por completo a valva superior do animal.

Desde o lote 01 foi utilizada a concentração de 0,005% para a colchicina, conforme utilizado por Thiriot-Quévieux e Ayraud (1982), Guevara et al. (1996), Rodriguez-Romero e Oca (1998), Leitão et al. (1999) e Wang et al. (1999), com um tempo de 12h de incubação (Thiriot-Quévieux e Ayraud, 1982), com exceção do lote 02 onde o tempo de incubação foi de 40h.

Segundo Costa (1985), as ostras nativas do gênero *Crassostrea* suportam variações de salinidade de 7‰ a 37‰, sendo o ótimo na faixa de 15‰ a 36‰. Guzenski (1996) salientou que ambientes de baixa salinidade são considerados fatores positivos ao bom crescimento da ostra do mangue. Esse autor acrescentou que a salinidade não é um fator limitante ao desenvolvimento desses animais, pois há várias citações de ostra do mangue vivendo nas mais diversas salinidades.

Boveda e Rodriguez (1987) conduziram uma série de experimentos para determinar a capacidade de sobrevivência da *C. rhizophorae* em diferentes condições de estresse ambiental. Um dos experimentos consistia em submeter a ostra a diminuições bruscas de salinidade, não observando mortalidade até 15‰. Este resultado confirmou a tolerância das ostras do gênero *Crassostrea* nativas às baixas salinidades, evidenciando a presença de mecanismos de osmorregulação muito eficientes.

Beiguelman (1974) citou que vários meios hipotônicos podem ser utilizados para obtermos um melhor espalhamento dos cromossomos, sendo que normalmente se utiliza o citrato de sódio 1% ou o cloreto de potássio 0,075M, mas, em alguns casos, a utilização de água destilada pode fornecer bons resultados.

Nos lotes 01 e 02 utilizou-se como meio hipotônico o citrato de sódio a 0,9% (Leitão et al., 1999). Porém, na observação das lâminas preparadas, percebeu-se que as células não haviam respondido de maneira satisfatória, e os cromossomos não se espalharam. Thiriot-Quévieux e Ayraud (1982), para bivalves marinhos, recomendaram utilizar água do mar em uma concentração de 25% por 1h, como choque hipotônico.

Assim, com base na sugestão de Beiguelman (1974) e nas características do animal, utilizou-se, no lote 04, a água destilada como solução hipotônica. Porém, os resultados continuavam desfavoráveis. Continuando nessa linha de raciocínio, no lote 05 foi utilizada água deionizada, obtida através do sistema de ultra purificação de água da Millipore (Milli-Q) por 1h, como meio hipotônico. Nesse lote, o resultado obtido foi inverso dos anteriores, pois as lâminas apresentavam muitos cromossomos, ou seja, metáfases muito dissociadas, em decorrência da ação violenta do meio hipotônico. Com base nisto, no lote 06, foi feita uma bateria de testes, onde se variou o tempo e a cada 5min era feita uma amostragem de material submetido ao meio hipotônico, porém mesmo no menor tempo (5min), os cromossomos continuavam muito espalhados; repetiu-se este mesmo procedimento para os lotes 07 e 08, alterando-se somente o intervalo de amostras para cada 10min, e ainda assim os resultados não foram bons. Considerando estes resultados, no lote 09 empregou-se uma solução de água deionizada com água destilada na proporção de 1:1, aplicada em uma bateria de 10min de amostragem, onde o primeiro tempo mostrou resultados positivos, apresentando duas metáfases completas. O experimento foi completamente repetido no lote 10 para conferir a técnica em animais de costão, obtendo também resultado positivo no primeiro tempo.

Nas baterias 11, 12 e 13, foi repetido o mesmo procedimento do lote 09, porém utilizando somente o tempo de 10 min para o tratamento hipotônico, obtendo, a partir deste momento, sempre resultados positivos.

A fixação por metanol e ácido acético 3:1, é um processo de duas etapas. A primeira consiste na fixação do pH intracelular de forma que os grupos ácidos  $-\text{COO}^-$  passem para  $-\text{COOH}$ , fixando as macromoléculas. A segunda etapa consiste de uma desidratação em meio

ácido. Este procedimento demanda muita energia química, porém seu resultado é muito eficiente, pois uma célula devidamente desidratada apresenta um espalhamento melhor quando gotejada na lâmina de vidro (Holmquist e Motara, 1987).

Thiriot-Quiévreux e Ayraud (1982), Rodriguez-Romero e Oca (1998), Leitão et al. (1999) e Wang et al. (1999) sugeriram a utilização de etanol absoluto com ácido acético glacial na proporção de 3:1 como fixador. Porém, a pesquisadora Angela Maria de Souza Bueno (comunicação pessoal) sugeriu a substituição do etanol pelo metanol, o que torna a solução do fixador mais estável quando mantida sob refrigeração, preservando assim a qualidade do material por mais tempo. Assim, o metanol com ácido acético tem sido utilizado frequentemente nas preparações citogenéticas e foi aqui também empregado como fixador desde o lote 01.

Nos lotes 01 e 02 as brânquias foram mergulhadas no fixador por 20min e centrifugadas a 1000rpm, durante 5min, procedimento repetido três vezes para troca do fixador, para que as células contidas nas brânquias fossem liberadas. Porém, a dissociação manual do tecido com ácido acético 50%, formando uma suspensão, se mostrou mais eficiente e optou-se por este procedimento. Então, a partir do lote 03 as brânquias passaram a ser fragmentadas em uma solução de ácido acético a 50% para a separação das células.

A superfície do vidro é muito importante para a obtenção de uma boa preparação cromossômica. O óxido de silício, que forma o vidro, atrai hidroxilas livres, tornando a superfície da lâmina hidrofílica e carregada negativamente, o que pode vir a dificultar o espalhamento dos cromossomos. Uma possível solução seria cobrir a lâmina com óleo, tornando a superfície hidrofóbica, porém este recobrimento dificultaria ainda mais o espalhamento dos cromossomos (Holmquist e Motara, 1987). Thiriot-Quiévreux (via correio eletrônico) sugeriu manter a umidade afastada das lâminas através do aquecimento a 44°C. Então, a partir do lote 11, as lâminas passaram a ser aquecidas antes do gotejamento da suspensão celular, o que não resultou em diferenças na qualidade das metáfases. Todavia pode-se constatar uma diminuição significativa na quantidade de bactérias sobre a lâmina, situação que vinha sendo um problema até então.

O método para a obtenção de metáfases de espécies de *Crassostrea* sp. aqui estabelecido auxiliará na continuidade destes estudos, buscando um melhor entendimento da citotaxionomia de ostras nativas da Ilha de Santa Catarina.

## Agradecimentos

Agradecemos sinceramente à Prof. Dra. Ângela Maria de Souza Bueno pelo grande apoio na realização desse trabalho de pesquisa.

## Referências

- Absher, T. M. 1989. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento.** Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 185pp.
- Alves, R. 2007. A problemática da classificação das ostras nativas. **Panorama da Aqüicultura**, **103**: 44-45.
- Barnes, R. D.; Harrison, F. W. 1994. Introduction to the Mollusca. In: Harrison, F. W. & Kohn, A. J. (Eds). **Microscopic anatomy of invertebrates.** Wiley Liss, New York, USA, p.1-12.
- Beiguelman, B. 1974. **Genética Médica. v. 1 – Citogenética Humana.** EDART/USP, São Paulo, Brasil, 199pp.
- Boveda, J. V. P.; Rodriguez, R. J. 1987. Supervivencia de la ostra de mangle *Crassostrea rhizophorae* (Gilding, 1828) a las variaciones de temperatura, salinidad y pH. **Memoria – Sociedad de Ciencias Naturales La Sale**, **127**: 217-231.
- Buroker, N. E.; Hershberger, W. K.; Chew, K. K. 1979. Population genetics of the Family Ostreidae. II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. **Marine Biology**, **54**: 171-184.
- Costa, P. I. 1985. Ostricultura: Biologia e tecnologia para o cultivo de ostras. In: Brasil Ministério da Marinha – Instituto Nacional de Estudos do Mar (Ed.). **Manual de Maricultura.** Cap.VI. Parte B. Brasil Ministério da Marinha – Instituto Nacional de Estudos do Mar, Rio de Janeiro, Brasil, p.1-36.
- Guevara, B. L.; Winkler, F.; Rodríguez-Romero, F.; Palmas-Rojas, C. 1996. The karyology of four American oysters species. **The Veliger**, **39**: 260-266.
- Guzenski, J. 1996. **Comparação do efeito da salinidade e concentração de substâncias químicas no crescimento de *Crassostrea rhizophorae* (Gilding, 1828).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 101pp.
- Harry, H. W. 1985. Synopsis of the supraspecific classification of living oysters (Bivalvia: Gryphaeidae and Ostreidae). **The Veliger**, **28**: 121-158.
- Hedgecock, D.; Okazaki, N. B. 1984. Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). **Malacologia**, **25**: 535-549.
- Holmquist, G. P.; Motara, M. A. 1987. The magic of cytogenetic technology. In: Obe, G. & Baster, A. (Eds). **Cytogenetics basic and**

**applied aspects.** Springer-Verlag Berlin, Germany, p.30-47.

Klaczko, L. B. 2000. **Avaliação do estado atual do conhecimento sobre a biodiversidade genética no Brasil.** Ministério do Meio Ambiente, Brasília, Brasil, 55pp.

Leitão, A.; Boudry, P.; Labat, J. P.; Thiriot-Quiévreux, C. 1999. Comparative karyology of cupped oysters species. **Malacologia**, **41**: 175-186.

Magalhães, A. R. M.; Poli, C. R.; Silveira, N.; Silva, F. C.; Poli, A. T. B. 1987. Viabilidade de cultivo de ostras no litoral de Santa Catarina – I. Distribuição geográfica das espécies de importância comercial no estado. **Anais do 1º Seminário sobre Ciências do Mar da UFSC**, Florianópolis, Brasil, p.165.

Rios, E. C. 1994. **Seashells of Brazil.** 2<sup>nd</sup> ed. Editora da FURG, Rio Grande, Brasil, 368pp.

Rodríguez-Romero, F.; Oca, M. G. M. 1998, Chromosomes of the experimental hybrid of *Crassostrea virginica* Gmelin 1791 and *Crassostrea rhizophorae* Guiding 1828 (Pseudolamellibranchiata: Ostridae). **Ciencias Marinas**, **24**: 55-63.

Ruppert, E. E.; Barnes, R. D. 1996. **Zoologia dos invertebrados.** 6<sup>a</sup> ed. Editora Roca, São Paulo, Brasil, 1029pp.

Thiriot-Quiévreux, C. ; Ayraud, N. 1982. Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et gastéropodes Marins. **Marine Biology**, **70**: 165-172.

Wang, Z.; Guo, X.; Allen, S. K. ; Wang, R. 1999. Aneuploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg) as incidentals from triploid production. **Aquaculture**, **173**: 347-357.

White, M. J. D. 1977. **Os cromossomos.** Companhia Editora Nacional/USP, São Paulo, Brasil, 196pp.