

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA

BRUNA MARIA CAZNOK

REVISÃO SISTEMÁTICA DE CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA CYRENIDAE:
INFERÊNCIAS EM POPULAÇÃO DE *Corbicula aff. fluminea* (BIVALVIA: VENERIDA)
DO RIO TIBAGI – PARANÁ, BRASIL

PONTA GROSSA
2021

BRUNA MARIA CAZNOK

REVISÃO SISTEMÁTICA DE CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA CYRENIDAE:
INFERÊNCIAS EM POPULAÇÃO DE *Corbicula* aff. *flumineana* (BIVALVIA: VENERIDA)
DO RIO TIBAGI – PARANÁ, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Susete Wambier Christo.

PONTA GROSSA

2021

C386 Caznok, Bruna Maria
Revisão sistemática de citogenética da família Cyrenidae: inferências em população de *Corbicula* aff. *fluminea* (Bivalvia: Venerida) do Rio Tibagi - Paraná, Brasil / Bruna Maria Caznok. Ponta Grossa, 2021.
66 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni.
Coorientadora: Profa. Dra. Susete Wambier Christo.

1. Mollusca. 2. Bivalve invasor. 3. Cariótipo. 4. Ploidia. I. Artoni, Roberto Ferreira. II. Christo, Susete Wambier. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. IV.T.

CDD: 574

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 08/2021/UEPG

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pelo(a) candidato(a) **Bruna Maria Caznok**.

Aos trinta e um dias do mês de agosto de dois mil e vinte e um, sob a presidência do(a) Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni em sessão pública por sessão remota, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **Bruna Maria Caznok**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Prof. Dr. Cristian Andres Araya-Jaime (Universidad de La Serena, Instituto Multidisciplinar em Ciencia y Tecnología (Chile)), Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG), Prof. Dr. Jonathan Pena Castro (SEED-PR) – Suplente. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o(a) candidato(a) passou a defesa de sua dissertação intitulada: “Revisão Sistemática de Citogenética da Família Cyrenidae: Inferências em População de Corbicula aff. fluminea (Bivalvia: Venerida) do Rio Tibagi – Paraná, Brasil”. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou a candidata **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador, assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim não

Novo título: _____

Ponta Grossa, 31 de agosto de dois mil e vinte e um.

Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni (UEPG)



Prof. Dr. Cristian Andres Araya-Jaime (Universidad de La Serena, INMCyT (Chile))



Profa. Dra. Mara Cristina de Almeida Matiello (UEPG)



Dedico esse trabalho aos
meus pais, Gessi e Irineu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Santo Antônio, por sempre me protegerem. Aos meus pais Gessi Pacheco dos Santos e Irineu Caznok que sempre me apoiaram, me ajudaram muito, sendo possível eu fazer o mestrado com auxílio deles e todo o carinho e amor que me dão, possibilitaram eu me tornar mestre. Amo vocês demais! Agradeço meu namorado Gustavo Felipe Fila por todo o apoio, amor, ter me apoiado a não desistir dos meus sonhos e objetivos profissionais, por toda a ajuda em ideias, corrigindo textos. Por em momentos muito difíceis estar do meu lado e conseguir me acalmar, amo muito você. Também agradeço a família do meu namorado por ter me ajudado e me apoiado. Não seria possível sem vocês esse trabalho.

Agradeço meus orientadores, professor Dr. Roberto Ferreira Artoni e professora Dra. Susete Wambier Christo por toda paciência, carinho e atenção comigo, agradeço muito ao professor Roberto por não ter desistido de mim e sempre acreditado no meu potencial.

Ao técnico do laboratório de Genética Evolutiva da UEPG, senhor Miguel Airton Carvalho por sempre ser prestativo em ajudar em assuntos do laboratório.

Agradeço o doutorando Augusto Ferreira Junior, por ter sido um amigo e também por ter coletado todos os animais utilizados nesse trabalho, por ter sido paciente comigo me ensinando sobre os moluscos, tentando me ajudar em tudo do meu trabalho, por ter feito as técnicas de citometria de fluxo e por todos os conselhos.

Agradeço ao Jonathan Pena Castro por me ensinar muitas técnicas de citogenética clássica e auxiliar em suas execuções, e mesmo agora na pandemia sempre me ajudou em todos os testes de protocolos mesmo de longe.

À secretária do programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Zoli Oliveira, por ter me ajudado várias vezes antes mesmo de eu fazer parte da Pós e também por sempre ser muito prestativa. Você faz falta na secretaria, Zoli.

Aos demais colegas e amigos de laboratório, Fran Kerniske, Raylen Pereira de Ramos, Jhon Alex Dziechciarz, Fernanda Lima, Luiza Beatriz Mayer de Lima, Bruno Begha, Edna Amaral, Luz Elena De la Ossa Guerra, por mesmo em meio a pandemia estarem indo ao laboratório, ajudaram-me muito em dúvidas, questões sobre protocolos e até na execução de práticas. Muito obrigada.

Agradeço ao professor Doutor George Shigueki Yasui e ao doutorando Andreoli

Correia Alves por terem auxiliado na técnica de citometria de fluxo no Laboratório de Biotecnologia de Peixes de Pirassununga-SP, forneceram todo o apoio e estrutura.

Agradeço a ajuda da professora Dra. Mara Cristina de Almeida e o professor Dr. Mateus Henrique Santos, que muitas vezes no laboratório me auxiliaram em práticas, dúvidas ou até em problemas com equipamentos.

Obrigada a todos os meus colegas de mestrado, Bruno Piotrovski Begha, Caroline Rosa Silva, Edna Maria Amaral, Fernanda Ceres Toczec Elias, Franciele Fernanda Kerniske, Gabriel Staichak, Lucieli Moreira Garcia e Stephane Carolenn Quadros Schott que foram parceiros nas disciplinas, também sempre conversando e tirando dúvidas nem que seja pelo grupo no whatsapp.

Agradeço os professores do programa de Pós-Graduação de Biologia Evolutiva, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência diversas vezes, por terem feito aulas diferenciadas com seminários, saídas de campo.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva pela infraestrutura fornecida, principalmente o laboratório de Genética Evolutiva que tinha todos os equipamentos e materiais suficientes para os diversos testes.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos professores da banca de qualificação e defesa, pelas contribuições ao meu trabalho.

Agradeço por último a todos que não foram mencionados mas que de alguma maneira me auxiliaram na execução desse trabalho.

“Uma criança, cega de nascença, só sabe
de sua cegueira se alguém lhe conta.”
Stephen King

RESUMO

Na Biologia Evolutiva pode-se destacar os estudos cromossômicos, a estrutura e às funções de genes nos grupos de seres vivos. Dentre os grupos animais que possuem escassez de informações cariotípicas está o Filo Mollusca. Uma das famílias que faz parte deste grupo é a família Cyrenidae, a qual possui seis gêneros vivos, com 176 espécies. O gênero *Corbicula* está presente em distintas localidades do mundo com presença de populações poliploides ($2n = 36$, $2n = 38$, $3n = 54$ e $4n = 72$). Esse gênero tem atualmente 69 espécies no mundo. No Brasil há a presença de quatro representantes exóticos deste gênero: *Corbicula fluminea*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula largillierti* e *Corbicula. sp.*, introduzidas em 1980. Sendo assim, os objetivos desse trabalho são: uma revisão sistematizada do estado da arte da citogenética e ploidia da família Cyrenidae, para efetuar uma análise qualitativa destas informações, assim como o teste dessas metodologias em uma população de *Corbicula aff. fluminea*. Para isto foi efetuado uma busca de artigos disponíveis digitalmente em bases de dados científicas (*Google Acadêmico*, *Scopus e Web of Science*) até o ano de 2021. Este estudo recuperou dados desde o ano de 1987 até o presente e permitiu relacionar informações cariotípicas. Dos 1124 artigos encontrados, apenas 13 tinham relação direta com o tema da pesquisa. Em relação à caracterização cariotípica da população de *Corbicula aff. fluminea* do Alto Rio Tibagi, encontrou-se $2n = 54$ cromossomos, em que por meio da citometria de fluxo foi observado que os indivíduos são diploides. Esse trabalho traz à luz o incipiente nível de conhecimento acerca da citogenética desta família de moluscos, alguns dos quais invasores e com relatos de poliploidia pouco elucidada em suas origens.

Palavras-chave: Mollusca; Bivalve invasor; Cromossomos; Ploidia.

ABSTRACT

In Evolutionary Biology, chromosomal studies, the structure and functions of genes in groups of living beings can be highlighted. Among the animal groups that have scarcity of karyotype information is the Phylum Mollusca. One of the families that is part of this group is the Cyrenidae family, which has six living genera, with 176 species. The genus *Corbicula* is present in different locations around the world with the presence of polyploid populations ($2n = 36$, $2n = 38$, $3n = 54$ and $4n = 72$). This genus currently has 69 species in the world. In Brazil there are four exotic representatives of this genus: *Corbicula fluminea*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula largillierti* and *Corbicula* sp., introduced in 1980. Therefore, the objectives of this work are: a systematic review of the state of the art of cytogenetics and ploidy of the Cyrenidae family, to carry out a qualitative analysis of this information, as well as the test of these methodologies in a population of *Corbicula* aff. *fluminea*. For this purpose, a search for digitally available articles in scientific databases (Google Academic, Scopus and Web of Science) was carried out until the year 2021. This study retrieved data from 1987 to the present and allowed us to relate karyotype information. Of the 1124 articles found, only 13 were directly related to the research topic. Regarding the karyotype characterization of the population of *Corbicula* aff. *fluminea* from the Upper Rio Tibagi, $2n = 54$ chromosomes were found, in which through flow cytometry it was observed that the individuals are diploid. This work brings to light the incipient level of knowledge about the cytogenetics of this family of molluscs, some of which are invasive and with reports of poorly understood polyploidy in their origins.

Keywords: Mollusca; Invading Bivalve; Chromosomes; Ploidy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas para a realização de uma Revisão Sistemática.....	23
Figura 2 – Local de coleta dos espécimes de <i>C. fluminea</i> (circulo vermelho). Em ‘A’ observa-se a América do Sul com ênfase no Brasil, sendo ‘a’ o Paraná. Em ‘B’ a malha hidrúca mostrando os Rios que fazem parte dessa Região, na coloração azul-escuro no ‘b’ há o Rio Tibagi. Em ‘C’ há o Rio Tibagi, mostrando em ‘c’ margem direita do rio, em ‘d’ margem esquerda do rio. Setas vermelhas indicam indivíduos da população amostrada em substrato arenoloso.....	27
Figura 3 – Gráfico de acumulado dos trabalhos sobre Citogenética relacionados à família Cyrenidae.....	34
Figura 4 – Fluxograma sobre busca sistemática de literatura.....	34
Figura 5 – Caracterização conquiológica de <i>Corbicula</i> aff. <i>fluminea</i> . (A) Vistas externa (a esquerda) e interna (a direita) da concha. (B) Visão lateral da concha. L – comprimento (do inglês <i>length</i>); H – altura (do inglês <i>height</i>); W – largura (do inglês <i>width</i>). Escala: = 5 mm.....	50
Figura 6 – Caracterização do número cromossômico obtido em 69 metáfases encontradas em sete indivíduos de <i>Corbicula</i> aff. <i>fluminea</i> do rio Tibagi, Paraná – Brasil. Moda = 54 cromossomos.....	52
Figura 7 – (A) Cromossomos metafásicos e respectivo cariótipo (A e B) de <i>Corbicula</i> aff. <i>fluminea</i> proveniente do Rio Tibagi, Paraná – Brasil. Barra=10µm.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Técnicas de citogenética clássica utilizadas nos artigos de revisão sistemática da família Cyrenidae.....	35
Tabela 2 – Técnicas de citometria de análise de ploidia utilizadas nos artigos de revisão sistemática da família Cyrenidae.....	39
Tabela 3 – Dados morfométricos de conchas de <i>Corbicula</i> aff. <i>fluminea</i> do rio Tibagi, Paraná – Brasil.....	51
Tabela 4 – Cariótipos de <i>Corbicula fluminea</i> encontrados no mundo.....	51

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1 AMBIENTES AQUÁTICOS.....	12
1.2 MOLLUSCA.....	12
1.2.1 Classe Bivalvia.....	13
1.2.2 Ordem Venerida.....	13
1.2.3 Família Cyrenidae (Gray, 1840).....	14
1.3 ANÁLISES DE CITOGENÉTICA EM CYRENIDAE.....	16
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	21
2.1 JUSTIFICATIVA.....	21
2.2 OBJETIVOS.....	22
2.2.1 Objetivo Geral.....	22
2.2.2 Objetivos Específicos.....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 REVISÃO SISTEMÁTICA.....	23
3.1.1 Estratégia de pesquisa.....	24
3.1.1.1 Critérios de seleção dos trabalhos.....	24
3.1.1.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	25
3.1.2 Coleta e Análise de Dados.....	25
3.2 ANÁLISES CARIOTÍPICA E CITOMETRIA DE FLUXO.....	26
3.2.1 Espécimes Amostrados.....	26
3.2.2 Testes Experimentais e Análises Citogenéticas.....	26
3.2.3 Análises de Ploidia.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 ARTIGO 1 – REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA CYRENIDAE.....	29
4.2 ARTIGO 2 – CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE <i>Corbicula</i> aff. <i>fluminea</i> (BIVALVIA: VENERIDA) PROVENIENTE DO RIO TIBAGI – BRASIL.....	45
5 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A – PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DE METÁFASES DE <i>Corbicula</i> <i>fluminea</i>	66

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 AMBIENTES AQUÁTICOS

Os ambientes aquáticos são formados por ambientes marinhos e continentais, os quais abrigam uma vasta diversidade de seres vivos (NELSON, 1994). Essa biodiversidade tem um papel fundamental à manutenção do meio e para que tudo ocorra de maneira organizada e sustentável (DOS SANTOS, 2010). Sendo necessária a conservação desses ambientes para a manutenção de sua diversidade, protegendo o ecossistema aquático para assim manter suas condições naturais (ESTEVES, 1998).

Nos últimos séculos, os ecossistemas aquáticos estão sendo alterados significativamente devido a muitos impactos ambientais causados por ações antrópicas diretas e indiretas, tais como: construção de represas e barragens em ambientes aquáticos; atividades mineradoras; desvios do curso natural de rios; lançamento de resíduos domésticos e industriais não tratados; exploração de recursos de pesca; desmatamento; uso inadequado do solo próximo a regiões aquáticas e introdução de espécies exóticas (GOULART JÚNIOR; CALLISTO, 2003; SOUZA *et. al.*, 2008). Essas alterações podem apresentar como consequência o desequilíbrio ambiental, extinção de espécies e ou introdução de espécies, mudanças ecológicas, entre outros.

1.2 MOLLUSCA

Nos ambientes aquáticos observa-se uma grande diversidade de invertebrados, dentre esses, os moluscos. Estes animais são ativos filtradores, de vida praticamente sésil (MANSUR; PEREIRA, 2006). Os primeiros representantes do Filo Mollusca surgiram no Pré-Cambriano (Vendiano), há mais de 540 milhões de anos, mas no período Cambriano grande parte dos grupos atuais já existia. Os moluscos habitam quase todos os ambientes, estando presentes em fossas abissais e até em desertos tórridos, ocupando também ambientes marinho, dulcícola e terrestre (SALVADOR *et al.*, 1998). Na atualidade, esses animais vivem da região equatorial até os polos do Ártico e da Antártica (ABSHER; FERREIRA JUNIOR; CHRISTO, 2020). São estimados em 100.000 espécies marinhas, 35.000 espécies terrestres e 5.000 de água doce (BRUGGEN, 1995).

O Filo Mollusca agrupa oito Classes (Caudofoveata, Solenogastres, Polyplacophora, Monoplacophora, Bivalvia, Scaphopoda, Gastropoda e Cephalopoda). Caudofoveados e Solenogastros: são os moluscos sem conchas; Poliplacóforos: animais com oito placas segmentadas no corpo; Monoplacóforos: moluscos com uma concha apenas e oito impressões musculares; Gastrópodes e Cefalópodes: animais que podem apresentar concha externa, interna ou ausente; Bivalves: moluscos que têm uma concha composta por duas valvas articuladas; Escafópodes: animais que apresentam uma concha externa cilíndrica, levemente cônica e aberta nas extremidades (ABSHER, FERREIRA JUNIOR, CHRISTO, 2020).

Os moluscos são importantes na economia de vários países, principalmente como fonte de alimento rico em proteínas. Podem ser coletados diretamente da natureza, cultivados, podendo ser utilizados em decorações e em joias com pérolas, zooartesanatos, pesca (lulas e polvos) para consumo, têm importância médica e no ciclo de vida de outros seres vivos, como trematodas (SALVADOR *et al.*, 1998).

1.2.1 Classe Bivalvia

No Filo Mollusca existe a Classe Bivalvia, a qual apresenta animais que têm uma concha composta por duas valvas calcáreas, ligam-se na face dorsal, unidas pelo ligamento e internamente por um, dois ou mais músculos adutores. Os bivalves são animais dotados de brânquias especializadas, alimentam-se predominantemente por filtração de material em suspensão na água (MALLMANN, 2000).

A Classe Bivalvia é também chamada de Lamellibranchia (brânquias em forma de lamelas) e Pelecypoda (pé em forma de machado). A maioria dos bivalves é sedentária, os quais dependem das correntes ciliares produzidas pelas brânquias para obter o alimento (HICHMAN JUNIOR *et al.*, 2003).

Em relação à diversidade dos bivalves, no Brasil, foi registrado até o ano de 1994 um total de 390 espécies de bivalves marinhos (RIOS, 1994) e 6 famílias de bivalves de água doce nativos brasileiros, as quais são: Hyriidae, Mycetopodidae, Cyrenidae, Sphaeridae, Dreissenidae e Lyonsiidae (PIMPÃO; MANSUR, 2009).

1.2.2 Ordem Venerida

Anteriormente a ordem Venerida era chamada de Veneroidea, esta inclui moluscos bivalves popularmente chamados de berbigão e a amêijoas. Os bivalves que fazem parte da ordem Venerida geralmente apresentam valvas grossas, isomias (os seus músculos adutores têm o mesmo tamanho) e possuem três dentes cardinais na charneira (MYERS *et al.*, 2006).

1.2.3 Família Cyrenidae (Gray, 1840)

Os gêneros pertencentes a família Corbiculidae atualmente fazem parte da família Cyrenidae. Existem esforços para resolver a filogenia dos cirenídeos, apresentando desafios recorrentes entre os estudos filogenéticos do bivalves de água doce, por amostragem interna incompleta e processos atípicos de herança genética (GRAF, 2013). Fez-se várias tentativas recentes para recuperar a filogenia de *Corbicula* usando DNA mitocondrial (LEE *et al.* 2005; PIGNEUR *et al.* 2011). A partir de estudos de análises filogenéticas, onde se confirma uma nova linhagem invasora norte-americana do gênero *Corbicula*, com um perfil genômico populacional consistente com clonalidade, aumentando o número de linhagens invasivas do Novo Mundo (HAPONSKI; FOIGHIL, 2019). Esses estudos corroboram para a mudança dos gêneros *Corbicula*, *Batissa* e *Polymesoda* à família Cyrenidae.

Os bivalves desta família podem liberar muitos juvenis nas águas circundantes que eclodem dentro dos adultos, são ovovivíparos e a fecundação ocorre internamente (GLAUBRECHT *et al.*, 2007). Essa é uma família de amêijoas de tamanho moderado, algumas vezes com coloração violeta no interior (MCMAHON, 1983).

Na família Cyrenidae existem seis gêneros: *Corbicula* (69 espécies), *Polymesoda* (49 espécies), *Batissa* (39 espécies), *Geloina* (17 espécies), *Cyanocyclus* (13 espécies) e *Villorita* (5 espécies). Em relação a esses, os gêneros *Corbicula* e *Cyanocyclus* têm vários representantes que vivem em água doce (REIS, 2006; MOLLUSCABASE, 2021).

No Brasil há representantes do gênero *Cyanocyclus*, sendo algumas espécies nativas brasileiras como *Cyanocyclus brasiliiana* (Deshayes, 1854) no Estado do Pará e no Piauí (BRITO; MANSUR; ROCHA-BARREIRA, 2015, FONSECA; FERNANDES; CUNHA, 2021), *Cyanocyclus limosa* (Maton, 1809), a qual tem declínio populacional por ocorrência da

espécie *C. fluminea* (MANSUR, 2000). Em Santa Catarina há registros de *Cyanocyclas paranensis* (d'Orbigny, 1835) (AGUDO-PADRÓN, 2020).

Do gênero *Corbicula* observou-se no Brasil a ocorrência de quatro espécies *Corbicula fluminea*, *Corbicula fluminalis* (O. F. Müller, 1774), *Corbicula largillierti* (Philippi, 1844) e *Corbicula sp.* (MARTINS; VEITENHEIMER-MENDES; FACCIÓNI-HEUSER, 2006).

A presença do gênero *Corbicula* foi confirmada em várias bacias brasileiras, tais como: bacia do Guaíba – RS, bacia do Rio Sapucaí – SP, bacia do lago Paranoá – BSB, bacia rio Negro – AM, bacia do Rio Passaúna – PR, bacia do rio Manhuaçu – MG, bacia do rio Uruguai – RS (MARTINS; VEITENHEIMER-MENDES; FACCIÓNI-HEUSER, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007; PIMPÃO; MARTINS, 2008; VIANNA; AVELAR, 2010; OLIVEIRA; MEYER; ARMSTRONG, 2014; LIMA, 2017; CASTILLO, 2007). Além disso, nas últimas duas décadas tem sido verificado que onde ocorre a espécie invasora *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), o mexilhão dourado, está presente o berbigão de água doce, *C. fluminea* (DARRIGRAN; DRAGO, 2000).

Corbicula fluminea, conhecida como molusco asiático, por ser comum na África Central e Meridional, Ásia Central e Meridional, é uma espécie invasora em muitas partes do mundo, inclusive no Brasil (GLAUBRECHT *et al.*, 2007). *C. fluminea* está presente também no continente Europeu e Americano, tornando-se uma espécie exótica (BILOS; COLOMBO; PRESA, 1998; REIS, 2006). Acredita-se que o vetor de introdução dessa espécie seja por transporte nos cascos de barcos.

Na América do Sul, possivelmente o gênero *Corbicula* foi introduzido entre os anos de 1965 e 1975, tendo o primeiro registro na Argentina no rio da Prata (ITUARTE, 1981). Na década de 1980 foi registrada a presença do gênero *Corbicula* no Brasil e após isso vários trabalhos têm identificado esses animais em várias regiões brasileiras (VEITENHEIMER-MENDES, 1981).

A espécie *C. fluminea* apresenta grande sucesso adaptativo em muitos locais diferentes no mundo, pois apresenta resistência a estresse ambiental, alta capacidade reprodutiva, tolerância a diferentes substratos, crescimento rápido e capacidade de filtrar grandes volumes de água (GRANEY *et al.*, 1980). Por outro lado, existem vários impactos negativos que essa espécie pode representar à ecologia local, tais como: domínio da biomassa das comunidades bentônicas, reduzindo ou substituindo o habitat disponível às outras espécies da localidade

(SCHMIDLIN; BAUR, 2007); vetores de parasitas e outros patógenos (CHUNG *et al.*, 2001); alteração dos ciclos dos nutrientes (VAUGHN; HAKENKAMP, 2001); e competição com outras espécies bentônicas e filtradoras (SCHMIDLIN; BAUR, 2007).

No Brasil, a espécie *C. fluminea* já foi registrada na Amazônia (BEASLEY; TAGLIANO, FIGUEIREDO, 2003), no Pantanal, segundo estudos de Callil e Mansur (2002). O Rio Paraná também tem um aumento considerável nas populações de *C. fluminea*, causando declínio nas populações nativas (TAKEDA; FUJITA; FONTES JR., 2004).

1.3 ANÁLISES DE CITOGENÉTICA EM CYRENIDAE

A Citogenética desenvolveu-se nos últimos séculos, acompanhando o progresso do aprimoramento de técnicas e de equipamentos de microscopia. A citogenética clássica é importante para a designação da morfologia e número de cromossomos de uma espécie, sendo importante ferramenta para determinação de relações filogenéticas e evolutivas entre os grupos (RAVEN, 1975; GUERRA, 1988). A citometria de fluxo é uma técnica que faz parte da Citogenética, sendo esse um eficiente método para identificação de ploidia baseado no conteúdo de DNA. Até então, apenas Pei e colaboradores (2021) utilizaram citometria de fluxo para análise de ploidia na família Cyrenidae.

Em relação à família Cyrenidae existem vários estudos morfológicos, sobre diversidade, sendo escassos trabalhos relacionados à citogenética. Nesta família observamos estudos de citogenética em 16 localidades de países da Ásia, Europa e América do Sul, resultando na caracterização cromossômica de 10 espécies. Nestes estudos da arte de citogenética da família Cyrenidae observa-se espécimes da mesma espécie com distintos números cromossômicos (NC) e ploídias de diferentes tecidos. Para tal, foram empregados métodos de obtenção de cromossomos mitóticos, Regiões Organizadoras de Núcleolos (RON), microfluometria, densitométrica e citometria de fluxo descritos detalhadamente cronologicamente a seguir.

No ano de 1987, Okamoto e Arimoto desenvolveram um trabalho citogenético sobre as espécies *Corbicula leana* (Prime, 1864), *Corbicula sandai* (Reinhardt, 1878) e *Corbicula japonica* (Prime, 1864), coletas no Lago Biwa e Rio Yodo – Japão. Nesse artigo foi estabelecida a relação entre as espécies *C. japonica* e *C. sandai*, em relação ao NC e a morfologia dos cromossomos. A partir disso, a espécie *C. japonica* ($2n = 38$) é um possível

ancestral de *C. sandai* ($2n = 36$), sendo que as duas apresentam número diplóide a partir da análise dos cromossomos mitóticos, a primeira se estabeleceu no continente asiático em água doce e *C. japonica* habitava água salgada. Supõe-se nesse artigo que o fato de a espécie *C. leana* ter $3n = 54$ cromossomos e seus espermatozoides teriam 54 cromossomos é apenas um estímulo para induzir o desenvolvimento generalizado (OKAMOTO; ARIMOTO, 1987). Essa situação corrobora com um estudo de Miyazaki (1932), no qual observa-se que a espécie *C. leana* apresenta um modo de reprodução especial, são animais hermafroditas que carregam as larvas nas brânquias.

Dez anos após, fez-se um estudo sobre o gênero *Corbicula* produzir espermatozoides não reduzidos quando comparados com conteúdo somático. Nesse trabalho, os autores observaram que *C. leana* apresenta 54 cromossomos. Em *C. aff. fluminea*, visualizou-se 36 cromossomos. Em relação ao DNA, o conteúdo relativo de DNA de células gonadais e células somáticas é idêntico em *C. leana*, *C. aff. fuminea* e *C. fluminea*. Na espécie *C. sandai*, o conteúdo de DNA dos espermatozoides era metade quando comparado com do das células somáticas (KOMARU *et al.*, 1997).

Um outro estudo citogenético foi realizado a partir de três espécies de bivalves, sendo essas *Unio elongatulus* (C. Pfeiffer, 1825) (Família: Unionidae), *Mutela rostrata* (Rang, 1835) (Família: Mutlelidae) e *C. fluminalis* (Família: Cyrenidae). Os animais foram coletados na cidade Quena (El-Taramsah, El-To-warat, Dandara and El-Sheikh Unis) – Egito. Em relação à *C. fluminalis* o NC desta espécie é igual a $2n = 26$ cromossomos (tecido gonadal). Sendo assim observado que os cariótipos entre as espécies estudadas, sendo de *M. rostrata* o NC de $2n = 20$ e da espécie *U. elongatulus* é $2n = 28$. Com esses resultados, o autor indicou que a diferença do NC e das características cariotípicas são claramente específicas para essas três espécies, confirmando assim a opinião da importância do uso de análise cromossômica em adição aos caracteres morfológicos na taxonomia moderna atualmente (EBIED, 1998).

Correlacionando esses três trabalhos iniciais de citogenética da família Cyrenidae (OKAMOTO; ARIMOTO, 1987; KOMARU *et al.* 1997; EBIED, 1998), observou-se a triplóidia na espécie *C. leana* e processos reprodutivos, tais como hermafroditismo, espermatozoide não reducional e androgênese (OKAMOTO; ARIMOTO, 1987; KOMARU *et al.* 1997). Todos os trabalhos utilizaram o KCL como solução hipotônica, evidenciando a necessidade de uma solução salina para romper a membrana celular, juntamente a maceração

do material. Diferenças nas metodologias estavam relacionadas com a fixação do material com uso (OKAMOTO; ARIMOTO, 1987; KOMARU *et al.* 1997) ou não de centrifugação (EBIED, 1998).

Molleda e colaboradores (1999) estudando a espécie *Polymesoda solida* (Prime, 1861), atualmente aceita como *Polymesoda fortis* (Prime, 1861), coletados no Lago de Maracaibo – Venezuela observaram que o NC variou entre $2n = 22$ e $2n = 30$. Com isso, acredita-se que essa variação pode ter relação com a alta incidência de aneuploidias, causadas por exposição a contaminantes (MOLLEDA *et al.*, 1999).

Komaru e Konishi (1999) avaliaram espécimes de *C. fluminea* de Taiwan – China que apresentam três diferentes colorações das suas conchas. Essas diferenças foram separadas em três morfotipos em: Tipo I – interior é branco, mas a área do umbo é laranja-claro; Tipo II – interior da concha é branco; Tipo III – interior da concha é roxo escuro. Todos os morfotipos apresentam a superfície externa marrom-amarelada. Vinte amêijoas amostradas consistem em 12 amêijoas do tipo I, seis amêijoas do tipo II e duas amêijoas do tipo III. As cores de concha tipo I e tipo II incluíram diplóides e triplóides. Os dois moluscos do Tipo III eram apenas diplóides. No que diz respeito ao conteúdo de DNA, observou-se que o conteúdo relativo de DNA dos espermatozoides era quase idêntico ao das células somáticas (KOMARU; KONISHI, 1999).

A partir da análise do DNA revelou-se que esses animais são diplóides e triplóides, os quais produziram espermatozoides não reducionais (KOMARU; KONISHI, 1999). Esses triplóides são semelhantes aos dos estudos anteriormente citados em relação ao Japão, Taiwan e Venezuela. Assim, sugere-se que esses níveis de ploidia tem relação com a reprodução por androgênese, como mostrado em *C. leana* (KOMARU *et al.* 1997; OKAMOTO; ARIMOTO, 1987).

Cariótipos de três espécies do gênero *Corbicula* na Coreia: *C. fluminea*, $3n = 54$ cromossomos, *Corbicula papyracea* (Heude, 1880) com $3n = 54$ cromossomos e *Corbicula colorata* (Martens, 1905) com $2n = 38$ cromossomos. A partir de estudos anteriores *C. colorata* foi considerada uma subespécie de *C. papyracea*, mas seu cariótipo indica que se trata de uma espécie distinta, uma vez que está isolada reprodutivamente das outras duas espécies coreanas estudadas (PARK, YONG E CHUNG, 2000).

Foram estudados espécimes de *C. fluminea* que apresentam conchas amarelas e marrons, provenientes da China. Fez-se a obtenção de cromossomos mitóticos e extração de DNA, a partir de microfluorometria (QIU; SHI; KOMARU, 2001). As cores das conchas encontradas no trabalho de Qiu, Shi e Komaru (2001) na China, são semelhantes as cores das conchas encontradas em Taiwan (KOMARU; KONISHI, 1999).

Em relação ao cariótipo e conteúdo relativo de DNA de células somáticas, o número dos cromossomos do tipo morfológico amarelo é de $3n = 54$ cromossomos nas brânquias. Sendo que no tipo morfológico marrom, o número de cromossomos foi $4n = 72$ cromossomos nas brânquias. No que diz respeito ao conteúdo de DNA de espermatozoides e células somáticas estudados nesse trabalho, sete indivíduos com morfologia amarela e oito indivíduos com morfologia marrom produziram espermatozoides com conteúdo de DNA semelhante ao de suas próprias células somáticas (QIU; SHI; KOMARU, 2001).

No Japão foi feito um estudo sobre a reprodução androgenética na espécie *C. fluminea*, sendo que essa espécie é exótica no Japão. A microfluorometria de DNA revelou que ambos os tipos eram diplóides. Observou-se a coloração das conchas desses animais com relação ao conteúdo de DNA, em que no morfotipo verde os animais eram diplóides e o morfotipo rosa eram diplóides (ISHIBASHI *et al.*, 2003).

Anisimova (2007) estudou o tamanho do genoma de 12 espécies de bivalves da Baía do Pedro, no Grande Mar do Japão, as quais são pertencentes a 8 famílias e 2 subclasses (Pteriomorphia e Heterodonta), sendo analisado o conteúdo do DNA nuclear ($2N$) do tecido músculo adutor. A metodologia empregada foi a Análise Densitométria (Fuelgen). Dentre as espécies estudadas encontra-se a *C. japonica* que faz parte da família Cyrenidae. A partir disso, observa-se que os valores de massa de DNA na classe Bivalvia variam significativamente, mesmo dentro das famílias. Dessa maneira, as espécies na subclasse Heterodonta diferiram entre si em não mais do que 1,5 vezes (ANISIMOVA, 2007).

Choi, Chung e Kwak (2007) estudaram as espécies *C. japonica* e *C. fluminea* em na Coreia, nos Lagos Uiam e Songji, as quais mostraram NC de $2n = 38$ e $2n = 54$ cromossomos, respectivamente.

Skuza e colaboradores (2009) avaliando a citogenética e caracterização morfológica de *C. fluminalis* na Polônia de um canal de descarga de água de resfriamento da usina de carvão Dolna Odra, apresentando $3n = 54$ cromossomos. Neste trabalho foi empregada a

técnica de Regiões Organizadoras de Nucléolos (NOR) em algumas lâminas, observando-se três pontos dentro das células, o que possibilita causar maior embasamento na triplóidia encontrada nos cromossomos.

Tejima *et al.*, (2020) estudaram *C. fluminea* no Rio Shirakawa, em Kyoto, Japão. Nessa pesquisa avaliou-se o sexo, maturidade, incidência de machos e dois tipos de cor de concha (amarelo e verde) na população. Análise de ploidia por meio da microfluorometria (DAPI) de DNA indicaram que animais com a coloração verde apresentaram 37,3% diplóides e 62,7% triplóides, enquanto animais com a coloração amarela apresentaram 11,6% diplóides e 88,4% triplóides. Em ambas as cores, as fêmeas e os hermafroditas compreendiam indivíduos diplóides e triplóides, enquanto os machos eram apenas diplóides (Tejima *et al.*, 2020).

Em 2021, fez-se estudo sobre investigação de ploidias em representantes do gênero *Corbicula* coletados no Rio Yuan, Lago Dongting Basin na China. Neste estudo, além da análise de cariótipo tradicional, a citometria de fluxo também foi usada para identificar a ploidia destes moluscos. Os resultados mostraram que haviam 30 diplóides e 15 triplóides em 45 amostras coletadas. Entre os 30 diplóides, as proporções de hermafrodita, macho e fêmea foram 53,4%, 23,3% e 23,3%, respectivamente. As proporções de hermafrodita, machos e fêmeas nos 15 triplóides foram 46,7%, 40,0% e 13,3%, respectivamente (PEI *et al.*, 2021).

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICATIVA

A construção de uma revisão sistemática sobre a citogenética da família Cyrenidae possibilitará analisar e comparar estudos sobre as várias espécies desse grupo de bivalves. Em adição, possibilitará ainda analisar a evolução das metodologias descritas em trabalhos divulgados durante a compilação do estado da arte em mais de 40 anos.

No Paraná e no Brasil não são verificadas descrições cromossômicas de Cyrenidae, um viés que dificulta o entendimento da evolução cariotípica da família. Destaque-se ainda, a fragilidade flagrante das relações sistemáticas e à filogenia de várias espécies de moluscos. Buroker, Hershberger e Chew (1979) já afirmavam que estudos apenas com dados atuais e fósseis das conchas de alguns animais podem levar a conclusões errôneas quanto à posição de determinadas espécies em relações filogenéticas. Sugerindo-se assim que os métodos mais adequados para esta distinção sejam aqueles que utilizam a estrutura ou sequências do DNA, integrada às características morfológicas.

Sendo assim, conhecendo os trabalhos publicados e disponíveis sobre a família Cyrenidae, elucidará o estado de conhecimento a cerca da estrutura cariotípica destes moluscos, assim como do conteúdo de DNA e das técnicas que foram empregadas ao longo do tempo. Tais informações serão levadas em consideração para ampliação de estudos nessa área e para a integração com o uso de outros marcadores, a exemplo do DNA barcoding, para abordagem de questões evolutivas, taxonômicas e para a biologia de invasão. Assim o referido trabalho será organizado em dois artigos. Sendo o Artigo 01 o estado da arte e intitulado de Revisão Sistemática de Literatura Citogenética da família Cyrenidae. O Artigo 02 versará sobre adaptações metodológicas para obtenção de cromossomos em uma população de *Corbicula fluminea* e intitulado de Caracterização Cariotípica de *Corbicula* aff. *fluminea* (Bivalvia: Venerida proveniente do Rio Tibagi – Brasil, com a proposta de elucidar dúvidas sobre o cariótipo da espécie *Corbicula fluminea* no Brasil.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal é produzir uma revisão sistemática sobre a citogenética da família Cyrenidae, adaptar e aperfeiçoar protocolos de metodologias de citogenética clássica e molecular para descrever o cariótipo de *Corbicula fluminea* como padronização para a ampliação de estudos nessa área.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Fazer um estudo de cienciometria da família Cyrenidae;
- Efetuar uma análise qualitativa de informações de cada espécie da família Cyrenidae, no que diz respeito a dados cariotípicos, conteúdo de DNA e técnicas empregadas;
- Comparar os protocolos utilizados nos trabalhos e estabelecer novos protocolos de referência;
- Caracterizar carioticamente uma população da espécie *Corbicula* aff. *fluminea* proveniente do Rio Tibagi – Paraná.

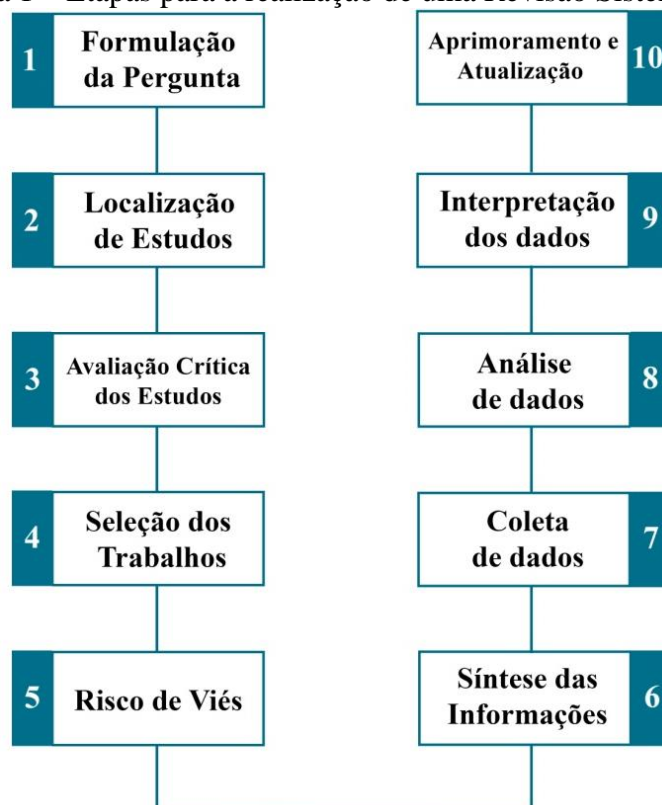
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REVISÃO SISTEMÁTICA

A partir do momento em que se verifica que os estudos primários incluídos em revisão sistemática seguem procedimentos homogêneos, os seus resultados podem ser combinados utilizando de técnicas de metanálise (GALVÃO; PEREIRA, 2014). Segundo Demo (2000) este processo é uma pesquisa dedicada a reconstruir teoria, conceitos, pensamentos, ideologias, polêmicas, a fim de aprimorar fundamentos teóricos.

Para a realização da revisão sistemática foi utilizado o método do Cochrane Handbook (CLARKE; OXMAN, 2000) com algumas modificações, em que recomenda-se que seja efetuada nos seguintes passos (Figura 1):

Figura 1 – Etapas para a realização de uma Revisão Sistemática.



Fonte: Adaptado de Clarke e Oxman, 2000

Neste Artigo foram coletados os dados de vários artigos e trabalhos sobre os temas citogenética clássica e citogenética molecular da família de moluscos bivalves Cyrenidae disponíveis digitalmente em bases científicas (*Google Acadêmico, Scopus e Web of Science*) até o ano de 2021.

Os dados foram coletados a partir de uma pesquisa sobre artigos, trabalhos, monografias, dissertações e teses sobre os temas citogenética clássica e citogenética molecular em relação à família de moluscos bivalve Cyrenidae, assim observando-se todos os estudos que estejam disponíveis para visualização, que foram publicados em revistas ou que estejam disponíveis em algum site (como os sites de Universidades).

Após isso, fez-se uma avaliação crítica dos estudos encontrados, observando se foram utilizadas metodologias foram adequadas e detalhadas, se os dados, resultados e discussões condizem com o que se deve seguir em protocolos de citogenética, observando-se o risco de viés das publicações. Então, selecionou-se os trabalhos que foram utilizados para a revisão sistemática, fez-se uma síntese das informações dos estudos, e fez-se uma comparação entre os estudos para a obtenção da análise dos dados nos resultados e discussão.

3.1.1 Estratégia de Pesquisa

Os artigos foram localizados a partir de algumas palavras-chaves ou unitermos, em que seria família ou gênero + palavra-chave. As famílias ou gênero são: “Cyrenidae”, “Corbiculidae”, “Corbicula”, “Batissa”, “Cyanocyclas”, “Geloína”, “Polymesoda” e “Villorita”. As palavras-chave são: “cytogenetic”, “karyotype”, “chromosomes”, “molecular”, “probes”, “hybridization”, “FISH”, “flow cytometry”, “ploidy”, “mass number”. A pesquisa foi limitada a artigos completos e em todas as línguas disponíveis. Alguns artigos adicionais foram localizados por busca manual nas referências dos artigos que foram lidos.

3.1.1.1 Critérios de seleção dos trabalhos

Para a pesquisa qualitativa foram definidos alguns critérios diferenciadores: estudos experimentais que abordassem os temas citogenética clássica e citogenética molecular em

relação a família de moluscos bivalves Cyrenidae, e que possuíssem dados passíveis de análise estatística.

3.1.1.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram considerados para inclusão os estudos e os experimentos com espécies da família Cyrenidae com técnicas de citogenética clássica e citogenética molecular, podendo ser protocolos para a obtenção de metáfases mitóticas, utilização de coloração convencional com Giemsa, heterocromatina constitutiva (bandeamento C), mapeamento cromossômico de genes ribossômicos (coloração por Nitrato de Prata) e o emprego de FISH (Hibridização *in situ* Fluorescente), sondas e genes utilizados nos trabalhos, citometria de fluxo, ploidia, conteúdo de DNA e sexagem.

Para este desenho de meta-análise foram excluídos os estudos primários que não pesquisaram e não utilizaram vários procedimentos citogenéticos clássicos e moleculares que são primordiais para a obtenção dos cromossomos e também sua análise.

3.1.2 Coleta de Dados

Coletou-se os dados a partir de uma pesquisa sobre artigos, trabalhos, monografias, dissertações e teses sobre os temas citogenética clássica e citogenética molecular em relação à família Cyrenidae, assim observando-se todos os estudos que estejam disponíveis para visualização, que foram publicados em periódico ou que estejam disponíveis em algum site (como os sites de Universidades). Após isso, fez-se uma síntese das informações dos estudos e comparando-os com foco das metodologias utilizadas.

3.1.3 Análise de Dados

Utilizou-se o tipo de pesquisa qualitativo, a qual não procura enumerar ou medir eventos estudados, nem emprega instrumentos estatísticos na análise de dados. Várias das questões e do foco do trabalho sendo desenvolvido ao longo do estudo, envolvendo-se na obtenção de dados descritivos sobre os processos pelo contato direto do pesquisador com a

situação estudada (GODOY, 1995).

Os dados foram agrupados em um gráfico de acumulados sobre a quantidade de trabalhos publicados por ano e em duas tabelas sobre citogenética, sendo uma sobre citogenética clássica e outra sobre ploidias com base na técnica de citometria de fluxo em relação à família Cyrenidae.

3.2 ANÁLISES CARIOTÍPICA E CITOMETRIA DE FLUXO

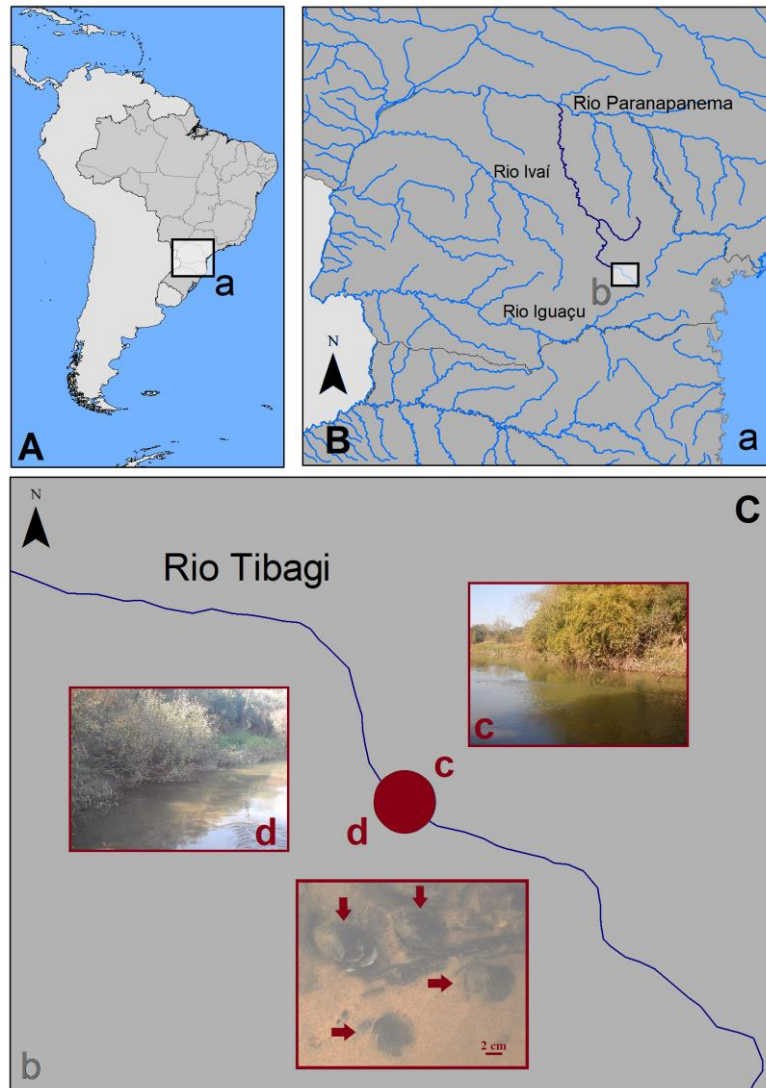
3.2.1 Espécimes Amostrados

Aproximadamente 300 espécimes de *Corbicula aff. fluminea* foram coletados em substrato areno-lodoso do Rio Tibagi (25°12' S; 50°04' W) em Ponta Grossa, Paraná (Figura 2), durante os períodos de outubro a dezembro de 2019 e janeiro a agosto de 2021 (autorização de coleta número 66625 ICMBio). Os animais foram mantidos em tanque de 30 litros com recirculação até o momento dos experimentos, com temperatura ambiente de 18 °C, pH 7, alimentados diariamente com farelo de milho e troca de água total do tanque a cada três dias. As conchas dos espécimes serão depositadas na Coleção Malacológica da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CMo/UEPG; <https://www.taxonline.bio.br/uepg-cmo>).

3.2.2 Testes Experimentais e Análises Citogenéticas

A partir de análises de protocolos vários experimentos foram efetuados para a obtenção de cromossomos. Um protocolo otimizado foi obtido a partir de modificações de dois protocolos (PARK; YONG; CHUNG, 2000; JARA-SEGUEL; PEREDO; PARADA, 2005) (ANEXO A) que foram mais promissores. Basicamente as brânquias inteiras dos animais foram imersas em colchicina 0,05% por 48 horas, após isso foram maceradas e cortadas em pequenos pedaços, seguindo uma hipotonização em água do tanque 1:1 água destilada por 45 minutos na estufa a 37 °C. Então essa solução foi centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, o material foi fixado em metanol: ácido acético (3:1). Após 24 h, essa solução foi gotejada em lâmina de vidro em chapa aquecida à 40 °C e corada com Giemsa 10% por 20 minutos.

Figura 2 – Local de coleta dos espécimes de *C. fluminea* (circulo vermelho). Em ‘A’ observa-se a América do Sul com ênfase no Brasil, sendo ‘a’ o Paraná. Em ‘B’ a malha hidrica mostrando os Rios que fazem parte dessa Região, na coloração azul-escuro no ‘b’ há o Rio Tibagi. Em ‘C’ há o Rio Tibagi, mostrando em ‘c’ margem direita do rio, em ‘d’ margem esquerda do rio. Setas vermelhas indicam indivíduos da população amostrada em substrato areno-lodoso.



Fonte: A autora (2021).

As melhores metáfases foram marcadas para fotomicrografias. A captura das imagens de citogenética clássica foram feitas com o programa *DP-Controller-BSW* em Câmara de Captura *Olympus DP71 12 mp* acoplada ao microscópio de campo claro *Olympus Bx41*. A montagem dos cariótipos foi realizada no programa *Photoshop CC 2014*.

3.2.3 Análises de Ploidia

A análise de citometria de fluxo foi aplicada em 15 espécimes adultos (> 20 mm de comprimento da concha). As brânquias e tecidos gonadal (obtidos por pulsão) de cada espécime foram separadas de forma unitária em microtubos de 1,5 mL, nos quais foi adicionada solução de lise celular (9,53 mM MgSO 4.7H 2 O, KCl 47,67 mM, Tris 15 mM, sacarose 74 mM, pH 8,0 e 0,8% de Triton X-100) por 10 minutos, para enucleação da amostra, seguindo protocolo descrito por Xavier *et. al* (2017).

A coloração dos núcleos foi realizada com a adição de 800 µL de solução de 4,6 Dimidine 2 Phenylidone Di-Hydrochloride - DAPI (0,01% DAPI em Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) (Sigma #D5773, St. Louis, EUA). Toda a solução do microtubo foi filtrada em telas de 30 µm (Celltrics, Partec, GMBh, Germany). Posteriormente, o conteúdo do DNA foi medido com um citômetro de fluxo *CyFlow Ploidy, Analyzer* (Partec, GMBh, Alemanha) e a ploidia foi confirmada por comparação com a referência de calibração, anteriormente realizada com espermatozoides haploides (N) de *Astyanax altiparanae* (GARUTTI; BRITSKI, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão serão descritos nos artigos 1 e 2 em 4.1 e 4.2.

4.2 ARTIGO 1 – REVISÃO SISTEMÁTICA DE LITERATURA CITOGENÉTICA DA FAMÍLIA CYRENIDAE

Revisão Sistemática de Literatura Citogenética da família Cyrenidae

RESUMO

Na Biologia Evolutiva podemos destacar os estudos cromossômicos, a estrutura e às funções de genes nos grupos de seres vivos. Estes conhecimentos são importantes para identificação de espécies, análises evolutivas e populacionais. Os ambientes aquáticos e sua fauna de invertebrados possui reduzido conhecimento com abordagens citogenéticas. Um deste grupo de animais são os bivalves, do Filo Mollusca, em especial a família Cyrenidae que possui 176 espécies, sendo que algumas espécies do gênero *Corbicula* presentes em distintas localidades do mundo com presença de populações poliploides ($2n$, $3n$ e $4n$). No Brasil há a presença de quatro representantes exóticas desta família: *Corbicula fluminea*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula largillierti* e *Corbicula* sp., introduzidas em 1980 e presentes em diversas bacias hidrográficas. Do gênero *Cyanocyclus*, existe no Brasil as espécies: *Cyanocyclus brasiliana*, *Cyanocyclus limosa* e *Cyanocyclus paranensis*. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é uma revisão sistemática do estado da arte vinculado à citogenética e ploidia da família Cyrenidae, a fim de efetuar uma análise qualitativa destes temas. Para isto foi efetuado uma busca de artigos disponíveis digitalmente em bases científicas (*Google Acadêmico*, *Scopus* e *Web of Science*) até o ano de 2021. Essa resultou em gráfico de acumulado dos anos das publicações dos estudos (efetuados desde 1987) e duas tabelas (relacionado às técnicas de citogenética utilizados com as espécies estudadas). Dos 1124 artigos encontrados, apenas 13 artigos foram totalmente relacionados ao assunto. No que diz respeito a estudos citogenéticos, observou-se o número cromossômico ($2n$) variando de 36 a 38 cromossomos e poliploidias descritas em determinadas populações e espécies, com $3n = 54$ cromossomos e $4n = 72$ cromossomos. Assim sendo, é de extrema importância revisões sistemáticas de literatura sobre um assunto, no caso da citogenética e citometria de fluxo na família Cyrenidae.

Palavras-chave: Mollusca; Bivalves; Cromossomos; Cariótipo; Citometria de fluxo.

Systematic Review of Cytogenetic Literature of the Cyrenidae family

ABSTRACT

In Evolutionary Biology we can highlight chromosomal studies, the structure and functions of genes in groups of living beings. This knowledge is important for species identification,

evolutionary and population analysis. Aquatic environments and their invertebrate fauna have little knowledge of cytogenetics approaches. One of this group of animals are bivalves, from the Phylum Mollusca, in particular the Cyrenidae family which has 176 species, with some species of the genus *Corbicula* present in different locations around the world with the presence of polyploid populations (2n, 3n and 4n). In Brazil there are four exotic representatives of this family: *Corbicula fluminea*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula largillierti* and *Corbicula* sp., introduced in 1980 and present in several hydrographic basins. From the genus *Cyanocyclus*, the following species exist in Brazil: *Cyanocyclus brasiliiana*, *Cyanocyclus limosa* and *Cyanocyclus paranensis*. Therefore, the objective of this work is a systematic review of the state of the art linked to cytogenetics and ploidy of the Cyrenidae family, in order to carry out a qualitative analysis of these themes. For this, a search for digitally available articles in scientific databases (*Google Academic*, *Scopus* and *Web of Science*) was carried out until the year 2021. This resulted in a graph of accumulated years of publication of the studies (conducted since 1987) and two tables (related to the cytogenetic techniques used with the studied species). Of the 1124 articles found, only 13 articles were fully related to the subject. With regard to cytogenetic studies, the chromosome number (2n) was observed ranging from 36 to 38 chromosomes and polyploidies described in certain populations and species, with 3 n = 54 chromosomes and 4 n = 72 chromosomes. Therefore, systematic literature reviews on a subject are extremely important, in the case of cytogenetics and flow cytometry in the Cyrenidae family.

Keywords: Mollusca; Bivalves; Chromosomes; Karyotype; Flow cytometry.

Introdução

Os moluscos são estimados em 100.000 espécies marinhas, 35.000 espécies terrestres e 5.000 de água doce (BRUGGEN, 1995). No Filo Mollusca, há a Classe Bivalvia representada pelos bivalves, existindo a Ordem Venerida, incluindo berbigão e a amêijoia (MYERS *et al.*, 2006). A família Cyrenidae é uma das famílias representantes da Ordem Venerida, nessa família existem 176 espécies no mundo todo. No Brasil observa-se a ocorrência de quatro espécies do gênero *Corbicula*: *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774), *Corbicula fluminalis* (O. F. Müller, 1774), *Corbicula largillierti* (Philippi, 1844), *Corbicula* sp. (MARTINS; VEITENHEIMER-MENDES; FACCIONI-HEUSER, 2006; MOLLUSCABASE, 2021).

No Brasil existem também representantes do gênero *Cyanocyclus*, tais como: *Cyanocyclus brasiliiana* (Deshayes, 1854) (BRITO; MANSUR; ROCHA-BARREIRA, 2015; FONSECA; FERNANDES; CUNHA, 2021), *Cyanocyclus limosa* (Maton, 1809) (MANSUR, 2000) e *Cyanocyclus paranensis* (d'Orbigny, 1835) (AGUDO-PADRÓN, 2020).

No que diz respeito às técnicas de citogenética relacionadas à família Cyrenidae, em 1987 estudou-se *Corbicula leana*, *Corbicula sandai* e *Corbicula japonica*. A partir disso, a espécie *C. japonica* ($2n = 38$) pode ser um ancestral de *C. sandai* ($2n = 36$). Assim sendo, o cariótipo da espécie *Corbicula sandai* seria o resultado da fusão cêntrica de um cromossomo metacêntrico com um submetacêntrico, ou então um acrocêntrico com um subtelocêntrico (OKAMOTO; ARIMOTO, 1987).

Komaru e colaboradores em 1997, observaram que *C. leana* tem 54 cromossomos, sendo esta considerada triploide, em *C. aff. fluminea*, visualizou-se 36 cromossomos, a qual seria diploide. Em 1998, Ebied publicou um artigo sobre *Unio elongatulus* (Família: Unionidae), *Mutela rostrata* (Família: Mutelidae) e *Corbicula fluminalis* (Família: Cyrenidae), em que o número diplóide de *C. fluminalis* foi de 26 cromossomos. Em 1999, fez-se um estudo sobre a espécie *Polymesoda solida* (atualmente *Polymesoda fortis*), em que foi observado que o número cromossômico variou entre $2n = 22$ e $2n = 30$ cromossomos (MOLLEDA *et al.*, 1999).

Komaru e Konishi (1999) desenvolveram um trabalho sobre a espécie *C. fluminea*, a partir da análise do DNA, revelando-se que esses animais são diplóides e triplóides, mostrando-se que todos produziram espermatozoides não reduzidos. Em 2000, Park, Yong e Chung produziram um estudo sobre cariótipos de três espécies do gênero *Corbicula* na Coreia, observando-se o número cromossômico de: *C. fluminea*, triplóide com 54 cromossomos, *C. papyracea*, triplóide com 54 cromossomos e *C. colorata* 38 cromossomos.

Em 2001, Qiu, Shi e Komaru estudaram espécimes de *Corbicula fluminea* que tem conchas amarelas e marrons, provenientes da China. O número dos cromossomos do tipo morfológico amarelo é de $3n = 54$ cromossomos nas brânquias e $n = 18$ cromossomos nas gônadas. Sendo que no tipo morfológico marrom, o número de cromossomos foi $4n = 72$ cromossomos nas brânquias. Na análise histológica, os espermatozoides de ambas morfologias são biflagelados.

Em 2003, Ishibashi e colaboradores fizeram um estudo no Japão sobre a reprodução androgenética na espécie *Corbicula fluminea*. A microfluorometria de DNA revelou que ambos os tipos eram diplóides com espermatozoides não reduzidos. No ano de 2007, Anisimova, fez um estudo sobre o tamanho do genoma de 12 espécies de bivalves da Baía do Pedro, as quais são pertencentes a 2 subclasses (Pteriomorpha e Heterodonta), sendo

analisado o conteúdo do DNA nuclear, onde foi observado o conteúdo do DNA da espécie *Corbicula japonica*. Nesse mesmo ano, foi publicado um artigo sobre as espécies *Corbicula japonica* e *C. fluminea* coletados na Coreia. Observou-se $2n = 38$ em *C. japonicae* $3n = 54$ em *C. fluminea* (CHOI; CHUNG; KWAK, 2007).

Em 2009, Skuza, Łabêcka e Domagała fizeram um estudo sobre citogenética e caracterização morfológica de *Corbicula fluminalis* na Polônia, em que os espécimes coletados apresentavam $3n = 54$ cromossomos. Nesse estudo foi utilizado o cloreto de cobalto 0,4% para aumentar o índice mitótico. Tejima e colaboradores (2020) fizeram um estudo sobre a coexistência entre hermafroditas e machos em animais androgenéticos no Japão. Em adição, foram observados exemplares diplóides e triplóides.

Em 2021, novamente volta-se a falar sobre a ploidia do gênero *Corbicula*, onde Pei e colaboradores (2021) fizeram um estudo sobre investigação de ploidias em *Corbicula* na China. Os resultados mostraram que nas populações havia 30 diploides e 15 triploides em 45 amostras coletadas.

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi entender e agrupar os dados sobre citogenética clássica e ploidia da família Cyrenidae, afim de efetuar uma análise qualitativa das informações.

Materiais e Métodos

Estratégia de Pesquisa

A busca foi conduzida nas bases de dados *Google Acadêmico*, *Scopus* e *Web of Science* no ano de 2021. Não houve restrições em relação ao idioma e a data de publicação para se selecionar os estudos a serem utilizados nesse trabalho.

Como estratégia de estudo utilizou-se o método do Cochrane Handbook (CLARKE; OXMAN, 2000), sendo usada para a seleção dos estudos por meio da seguinte pergunta: “Quais métodos foram utilizados para a obtenção do número de cromossomos da família de estudo?”.

Foram pesquisados trabalhos sobre temas citogenética clássica e citogenética molecular, em várias revistas. Os artigos foram localizados a partir de algumas palavras

chaves ou unitermos, em que seria família ou gênero + palavra-chave. As famílias ou gênero são: “Cyrenidae”, “Corbiculidae”, “Corbicula”, “Batissa”, “Cyanocyclas”, “Geloína”, “Polymesoda” e Villorita. As palavras-chave: “cytogenetic”, “karyotype”, “chromosomes”, “molecular”, “probes”, “hybridization”, “FISH”, “flow cytometry”, “ploidy”, “mass number”. A pesquisa foi limitada a artigos completos e em todas as línguas disponíveis.

Critérios de elegibilidade

Foram considerados elegível para inclusão os estudos em que os experimentos com espécies da família Cyrenidae utilizaram técnicas de citogenética clássica e citogenética molecular.

Coleta de dados

Coletou-se os dados a partir de uma pesquisa sobre artigos, trabalhos, monografias, dissertações e teses sobre os temas citogenética clássica e citogenética molecular em relação à família Cyrenidae. Após isso, fez-se uma avaliação crítica dos estudos encontrados, observando se os trabalhos apresentavam protocolos de citogenética. Então, selecionou-se os trabalhos que foram utilizados para a revisão sistemática.

Análise de dados

Utilizou-se o tipo de pesquisa qualitativa, a qual não procura enumerar ou medir eventos estudados, envolvendo-se na obtenção de dados descritivos sobre os processos pelo contato direto do pesquisador com a situação estudada (GODOY, 1995).

Resultados

A busca sistemática de literatura recuperou 1124 referências potencialmente relevantes para a construção desse trabalho. Destes, 13 artigos foram incluídos à análise qualitativa, pois trazem especificamente a temática da citogenética em Cyrenidae (Figura 3 e 4; Tabelas 1 e 2).

Figura 3 – Gráfico de acumulado dos trabalhos sobre Citogenética relacionados à família Cyrenidae.

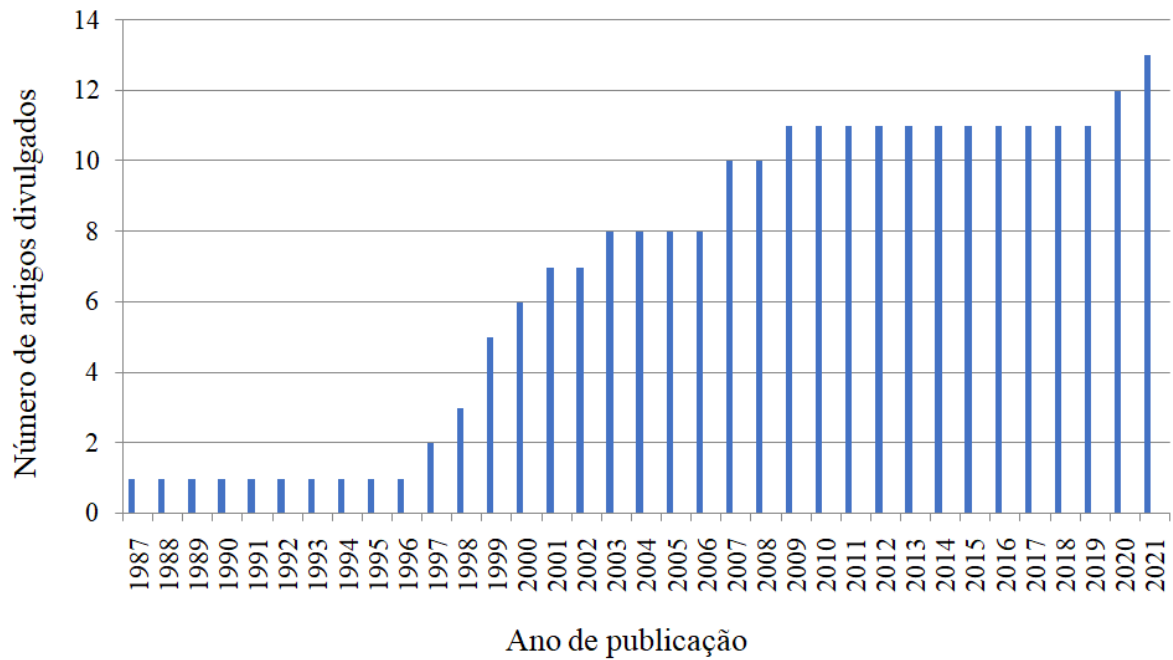


Figura 4 – Fluxograma sobre busca sistemática de literatura.

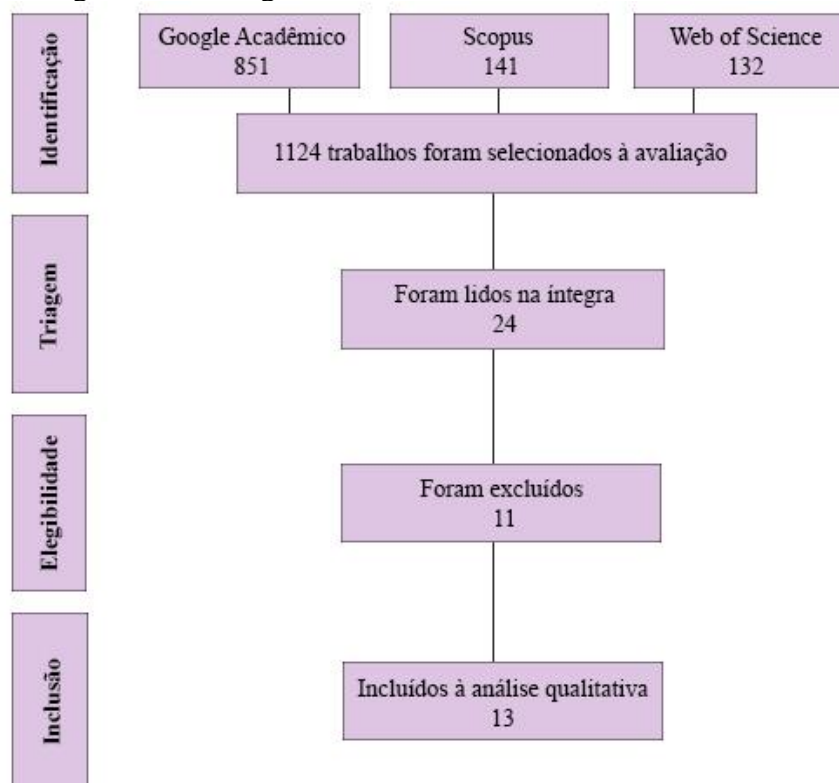


Tabela 1 - Técnicas de citogenética clássica utilizadas nos artigos de revisão sistemática da família Cyrenidae. Colch = colchicina; Colc = colcemida; Hip = hipotônica; Cent = centrifugação e RON = Regiões organizadoras de Nucléolos. * não especifica espécie.

Táxons	Localidade (Latitude; Longitude)	2n	Citogenética								Referências
			Cariótipo	Tecido	Solução para estimular de divisão celular	Colch	Colc	Hip	Cent	RON	
<i>Corbicula japonica</i>	Rio Yodo, Japão (34° 41' N, 135° 25' 10" E)	2n = 38	1m, 1 sm, 17 st	brânquias e glândula intestinal	-	0,50%	-	solução salina e KCl	800 rpm	-	Okamoto e Arimoto (1987)
<i>Corbicula japonica</i>	Golfo de Pedro, o Grande, Japão (42°40'44.6"N 131°59'36.0"E)	2n	-	-	-	-	-	-	-	-	Anisimova (2007)
<i>Corbicula sandai</i>	Lago Biwa, Japão (35° 17' 25.69" N, 136° 7' 24.07" E)	2n = 36	1m, 1 sm, 16 st	brânquias e glândula intestinal	-	0,50%	-	solução salina e KCl	800 rpm	-	Okamoto e Arimoto (1987)
<i>Corbicula</i> aff. <i>fluminea</i>	Rio Taide, Japão (33°17'26.7"N 130°23'25.0"E)	2n = 36	-	brânquias e gônadas	-	0,002% por 4- 5h	-	8 mM de KCl	800 rpm	-	Komaru <i>et</i> <i>al.</i> (1997)
<i>Corbicula fluminea</i>	Shin Wu, Taiwan (25°05'12.4"N 121°30'50.2"E)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Komaru <i>et</i> <i>al.</i> (1997)
	Hou-Don, Keelung River, Taiwan (25°04'40N, 121°49'00E)	2n; 3n	-	-	-	-	-	-	-	-	Komaru e Konishi (1999)

Tabela 1 - Continuação 1.

Táxons	Localidade (Latitude; Longitude)	2n	Citogenética								Referências
			Cariótipo	Tecido	Solução para estimular de divisão celular	Colch	Colc	Hip	Cent	RON	
<i>Corbicula fluminea</i>	Hou-Don, Keelung River, Taiwan (25°04'40N, 121°49'00E)	2n; 3n	-	-	-	-	-	-	-	-	Komaru e Konishi (1999)
	Lago Uiam, Chunchon, Coreia do Sul (37°52'12.3"N 127°41'07.1"E)	3n = 54	1m, 5 sm, 12 st	gônadas	-	0,05% por 20- 24 h	-	NaCl 0,01 %	1000 rpm	-	Park, Yong e Chung (2000)
	Anyue County, Sichuan, China (30°05'45.4"N 105°20'15.2"E)	3n = 54	2m, 13 sm (3+4+6), 3 st	gônadas e brânquias	-	0,002% por 4-5 h	-	H2O ₂ dd 30 min	-	-	Qiu, Shi e Komaru (2001)
	Anyue County, Sichuan, China (30°05'45.4"N 105°20'15.2"E)	4n = 72	2m, 13 sm (3+4+8), 3 st	gônadas e brânquias	-	0,002% por 4-5 h	-	H2O ₂ dd 30 min	-	-	Qiu, Shi e Komaru (2001)
	Shishigatani creek, Kyoto, Japan.(35°07'51.5"N 135°39'38.9"E)	2n	-	-	-	-	-	-	-	-	Ishibashi (2003)

Tabela 1 - Continuação 2.

Táxons	Localidade (Latitude; Longitude)	2n	Cariótipo	Tecido	Citogenética						Referências
					Solução para estimular de divisão celular	Colch	Cole	Hip	Cent	RON	
<i>Corbicula fluminea</i>	Lago Uiam, Coreia do Sul (37°54'10.1"N 127°43'14.4"E)	3n = 54	1m, 5 sm, 12 st	gônadas	-	0,025 % por 16-24 h	-	075 M KCl e 0,01% de NaCl	1500 rpm	-	Choi, Chung e Kwak (2007)
	Shirakawa River, Quioto, Japão (35°38'26.4"N 137°19'05.5"E)	2n; 3n	-	-	-	-	-	-	-	-	Tejima <i>et al.</i> (2020)
<i>Corbicula leana</i>	Lago Biwa, Japão (35° 17' 25.69" N, 136° 7' 24.07" E)	3n = 54	1m, 4 sm, 13 st	brânquias e glândula intestinal	-	0,50%	-	solução salina e KCl	800 rpm	-	Okamoto e Arimoto (1987)
	Meiwa, Japão (34°32'59.4"N 136°37'01.3"E)	3n = 54	-	brânquias e gônadas	-	0,002% por 4- 5h	-	8 mM de KCl	800 rpm	-	Komaru <i>et al.</i> (1997)
<i>Corbicula sandai</i>	Lago Biwa, Japão (35° 17' 25.69" N, 136° 7' 24.07" E)	-	-	brânquias e gônadas	-	0,002% por 4- 5h	-	8 mM de KCl	800 rpm	-	Komaru <i>et al.</i> (1997)
<i>Corbicula papyracea colorata</i>	Chungpyung Dam Reservoir, Coreia do Sul (37°42'31.0"N 127°27'22.1"E)	2n = 38	1m, 5 sm, 12 st	gônadas	-	0,05% por 20- 24 h	-	NaCl 0,01 %	1000 rpm	-	Park, Yong e Chung (2000)
<i>Corbicula fluminalis</i>	Quena (El- Taramsah, El-To- warat, Dandara and El-Sheikh Unis) - Egito (26°08'35.5"N 32°42'32.4"E)	2n = 26	6m, 7sm	gônadas	-	0,005% por 2-6 h	-	0,075 M KCL	fixação simples com 3:1	-	Ebied (1998)

Tabela 1 - Continuação 3

Táxons	Localidade (Latitude; Longitude)	2n	Citogenética								Referências
			Cariótipo	Tecido	Solução para estimular de divisão celular	Colch	Cole	Hip	Cent	RON	
<i>Corbicula fluminalis</i>	Canal na Usina Dolna Odra, Polônia (N 53°12' E 14°27')	3n = 54	1m, 5sm, 12 st	brânquias	cloreto de cobalto a 0,4% por 60 h	0,1% por 6h	-	NaCl 0,01%	1000 rpm	+	Skuza, Ěaběčka, Domagała (2009)
<i>Corbicula japonica</i>	Lago Songji, Coreia (35°40'17.3"N 128°28'28.8"E)	2n = 38	1m, 3 sm, 4 st, 11t	gônadas	-	0,025 % por 16-24 h	-	075 M KCl e 0,01% de NaCl	1500 rpm	-	Choi, Chung e Kwak (2007)
<i>Corbicula papyracea</i>	Lago Uiam, Chunchon, Coreia do Sul (37°52'12.3"N 127°41'07.1"E)	3n = 54	1m, 5 sm, 12 st	gônadas	-	0,05% por 20- 24 h	-	NaCl 0,01 %	1000 rpm	-	Park, Yong e Chung (2000)
<i>Corbicula*</i>	Lago Dongting Basin - China (28°53'03.0"N 112°35'02.6"E)	2n = 36	1m, 1 sm, 16 st	brânquias	fitohemaglutinina por 24 h	0,02 % por 4-5 h	-	0,037 5 mol/L KCl por 30 min	2500 rpm	-	Pei <i>et al.</i> (2021)
	Lago Dongting Basin - China (28°53'03.0"N 112°35'02.6"E)	3n = 54	3m, 15sm3, 6st	brânquias	fitohemaglutinina por 24 h	0,02 % por 4-5 h	-	0,037 5 mol/L KCl por 30 min	2500 rpm	-	Pei <i>et al.</i> (2021)
<i>Polymesoda fortis**</i>	Lago de Maracaibo, Venezuela (10° 55"N 71° 45"O)	2n = 20; 2n = 30	-	brânquias	alimentação com microalgas por 2- 4 h	-	0,1 ml por 4-5 h	0,1% KCl ou 1% Citrato de Sódio por 1h	800 rpm	-	Molleda <i>et al.</i> (1999)

Tabela 2 - Técnicas de análise de ploidia utilizada nos artigos de revisão sistemática da família Cyrenidae.

Táxons	Localidade	Número de cromossomos	Hist.	Análise de ploidia					Referência
				Morfo.	Metodologia	Tecido	nC (variação do valor méd.)/som.	C (variação do valor méd.)/esperm.	
<i>Corbicula japonica</i>	Rio Yodo, Japão	2n = 38	-	-	-	-	-	-	Okamoto e Arimoto (1987)
<i>Corbicula japonica</i>	Golfo de Pedro, o Grande, Japão	2n	-	-	Análise Densitométrica ^{&}	-	2C 3,86 ^A	-	Anisimova (2007)
<i>Corbicula sandai</i>	Lago Biwa, Japão	2n = 36	-	-	-	-	-	-	Okamoto e Arimoto (1987)
<i>Corbicula aff. fluminea</i>	Rio Taide, Japão	2n = 36	-	-	Microfluorometria ^o	gônada e manto	2C (204,0 - 176,0) ^B	203,8 - 175,5 ^B	Komaru <i>et al.</i> (1997)
<i>Corbicula fluminea</i>	Shin Wu, Taiwan	-	-	-	Microfluorometria ^o	gônada e manto	172,4 - 151,1 ^B	191,2 - 161,0 ^B	Komaru <i>et al.</i> (1997)
	Hou-Don, Keelung River, Taiwan	2n; 3n	-	I	Microfluorometria ^o	gônada e manto	311,42 - 168,93 ^B 2C/3C	155,30 - 314,48 ^C	Komaru e Konishi (1999)
	Hou-Don, Keelung River, Taiwan	2n; 3n	-	II	Microfluorometria ^o	gônada e manto	(283,30-152,50) ^C	143,00 - 274,72 ^C	Komaru e Konishi (1999)
	Hou-Don, Keelung River, Taiwan	2n; 3n	-	III	Microfluorometria ^o	gônada e manto	2C/3C (169,46) ^C	162,28 ^B	Komaru e Konishi (1999)
	Lago Uiam, Chunchon, Coreia do Sul	3n = 54	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 2 - Continuação 1.

Táxons	Localidade	Número de cromossomos	Hist.	Morfo.	Análise de ploidia				Referência
					Metodologia	Tecido	nC (variação do valor méd.)/som.	C (variação do valor méd.)/esperm.	
<i>Corbicula fluminea</i>	Anyue County, Sichuan, China	3n = 54	-	Yellow	Microfluorometria [⊙]	manto	3C (314,41 - 262,50) ^D	293,71 - 257,48 ^D	Qiu, Shi e Komaru (2001)
	Anyue County, Sichuan, China	4n = 72	-	Brown	Microfluorometria [⊙]	manto	4C (443,38 - 223,38) ^D	405,43 - 247,00 ^D	Qiu, Shi e Komaru (2001)
	Shishigatani creek, Kitashirakawa, Kyoto, Japan	2n	-	Green	Microfluorometria [⊙]	brânquia e manto	2C (30,00 - 31,32) ^E	32.63 - 30.35 ^E	Ishibashi (2003)
	Shishigatani creek, Kitashirakawa, Kyoto, Japan	2n	-	Pink	Microfluorometria [⊙]	brânquia e manto	2C (30.50 - 31.02) ^E	31.00 - 30.62 ^E	Ishibashi (2003)
	Lago Uiam, Coreia do Sul	3n = 54	+	-	-	-	-	-	Choi, Chung e Kwak (2007)
	Shirakawa River, Quioto, Japão	2n; 3n	+	Green	Microfluorometria [⊙]	brânquia	-	-	Tejima <i>et al.</i> (2020)
<i>Corbicula leana</i>	Shirakawa River, Quioto, Japão	2n; 3n	+	Yellow	Microfluorometria [⊙]	brânquia	-	-	Tejima <i>et al.</i> (2020)
<i>Corbicula leana</i>	Lago Biwa, Japão	3n = 54	-	-	-	-	-	-	Okamoto e Arimoto (1987)
	Meiwa, Japão	3n = 54	-	-	Microfluorometria [⊙]	gônada e manto	3C (315,5 - 251,6) ^A	328,5 - 251,2 ^A	Komaru <i>et al.</i> (1997)

Tabela 2 - Continuação 2.

Táxons	Localidade	Número de cromossomos	Hist.	Morfo.	Análise de ploidia				Referência
					Metodologia	Tecido	nC (variação do valor méd.)/som.	C (variação do valor méd.)/esperm.	
<i>Corbicula papyracea colorata</i>	Chungpyung Dam Reservoir, Coreia do Sul	2n = 38	-	-	-	-	-	-	Park, Yong e Chung (2000)
<i>Corbicula fluminalis</i>	Quena (El-Taramsah, El-To-warat, Dandara and El-Sheikh Unis) - Egito	2n = 26	-	-	-	-	-	-	Ebied (1998) Skuzza, Łabêckaand, Domagała (2009)
	Canal na Usina Dolna Odra, Polônia	3n = 54	-	-	-	-	-	-	
<i>Corbicula japonica</i>	Lago Songji, Coreia	2n = 38	+	-	-	-	-	-	Choi, Chung e Kwak (2007)
<i>Corbicula papyracea</i>	Lago Uiam, Chunchon, Coreia do Sul	3n = 54	-	-	-	-	-	-	Park, Yong e Chung (2000)
<i>Corbicula*</i>	Lago Dongting Basin - China	2n = 36	-	2n	Citometria de fluxo [©]	músculo adutor	2C (12921,82 - 217,43) ^F	-	Pei <i>et al.</i> (2021)
	Lago Dongting Basin - China	3n = 54	-	3n	Citometria de fluxo [©]	músculo adutor	3C (19041,39 - 375,31) ^F	-	Pei <i>et al.</i> (2021)
<i>Polymesoda fortis**</i>	Lago de Maracaibo, Venezuela	2n = 2; 2n = 30	-	-	-	-	-	-	Molleda <i>et al.</i> (1999)

Legenda: * não determinada a espécie, citada como "*Corbicula clams*"; ***Identificada pelos autores como *Polymesoda solida*; &: Utilizou-se a Análise Densitométrica segundo Gonzalez-Tizon *et al.* (2000) e Gallardo-Escarate *et al.* (2005); Ø: Utilizou-se a Microfluorometria segundo Komaru *et al.*(1988); ©: Utilizou-se Citometria de Fluxo segundo Bai e Dong (2014); A: Número em picogramas; B, C, D, E e F: não identifica a unidade de medida.

Discussão

Entre os anos de 1987 e 2021 foram publicados 13 trabalhos em relação à família Cyrenidae no que diz respeito às técnicas de citogenética, sendo essas técnicas para obtenção de cromossomos mitóticos e para obtenção de ploidias, dos quais nove utilizaram técnicas de citogenética clássica, cinco técnicas de obtenção de conteúdo de massa do DNA, em três foi realizada a sexagem por meio de histologia acompanhada de análise de ploidia ou obtenção de cromossomos. Apenas um desses trabalhos citados apresentava tanto análise de ploidias quanto citogenética clássica para a obtenção do número de cromossomos, sendo que essa última técnica é importante para se ter o conhecimento que animal é diplóide, triplóide ou tetraplóide.

No que diz respeito as Tabelas 1 e 2, pode-se observar que na primeira tabela a maioria dos trabalhos foi realizado em países da Ásia onde a espécie é nativa, tendo poucos trabalhos em localidades em que a espécie é invasora. Em oito trabalhos foram encontrados animais triploides com $3n = 54$ cromossomos. No trabalho de Qiu, Shi e Komaru (2001) realizado na China, onde *Corbicula fluminea* é nativa, foi encontrado um indivíduo tetraploide, $4n = 72$ cromossomos, sendo entre todos os outros trabalhos o único a relatar tetraploidia. Além disso, pode-se observar que das 176 espécies da família Cyrenidae, apenas oito foram estudadas citogeneticamente até o presente, sendo essas pertencentes aos gêneros *Corbicula* e *Polymesoda*.

É possível inferir que os tecidos utilizados para se fazer a obtenção das metáfases mitóticas são principalmente três: gônadas, brânquias e glândula intestinal. Em alguns casos foi utilizada uma solução para estimular a divisão celular nos animais. No trabalho de Skuza, Łabêcka, Domagała (2009) utilizou-se cloreto de cobalto 0,4% por 60 horas nos animais, no trabalho de Pei *et al.* (2021) foi usado fitohemaglutinina por 24 horas e em Molleda *et al.* (1999) fez-se alimentação com microalgas por 2-4 horas. Nesses artigos foi mencionado que o estímulo foi necessário devido ao nível de divisão celular ser baixo e, conseqüentemente o baixo índice de metáfases mitóticas (Tabela 1).

O emprego do bloqueador mitótico colchicina se mostrou bastante variável nos trabalhos revisados, especialmente em relação às concentrações: 0,50%, 0,05%, 0,02%, 0,025%, 0,005%, 0,002%. O tempo de tratamento foi de 4-5 horas, 2-6 horas, 16-24 horas, 20-24 horas. No trabalho de Molleda e colaboradores (1999), foi utilizado colcemida na concentração 0,1 ml por 4-5 horas.

O “choque hipotônico” foi utilizado em todos os trabalhos. Os tecidos foram

seccionados em pequenas partes e imersos em solução de KCl, NaCl, água destilada ou citrato de sódio, normalmente por um tempo de 30 minutos até 1 hora. Na maioria dos trabalhos, a fixação realizada foi Carnoy 3:1 (3-9mL), sendo usado entre 800 rpm – 2500 rpm para a sedimentação das células. Esse passo foi repetido até 3 vezes por 10 minutos. Ao final dos protocolos, os autores guardavam a solução obtida com fixador e pingavam na lâmina a ser posteriormente corada. Apenas no trabalho de Skuza, Łabêcka, Domagała (2009) foi observado o emprego de marcadores cromossômicos do tipo marcação das regiões organizadoras de nucléolos por Nitrato de Prata (Ag-RONs).

Em relação à técnica para obtenção das ploidias, seis trabalhos evidenciaram espécies que apresentam $2n$, quatro trabalhos apresentaram espécies com $3n$ e um trabalho uma espécie com $4n$. Nesses trabalhos, em alguns os morfotipos foram identificados por cores, observou-se diferença no número de cromossomos em relação à coloração no trabalho de Qiu, Shi e Komaru (2001), onde o morfotipo *Yellow* possui $3n = 54$ cromossomos e o morfotipo *Brown* apresenta $4n = 72$ cromossomos. A maioria dos trabalhos utilizou o método Microfluorometria (DAPI) para fazer a quantificação de DNA e, apenas Anisimova (2007) utilizou o método Análise Densitométrica (Feulgen) para esse mesmo fim. Apenas o trabalho de Pei *et al.* (2021) utilizou da citometria de fluxo para quantificação de DNA e identificação de ploidia, embora seja esse considerado o padrão ouro para essa inferência.

Em relação aos dados encontrados pelos autores dos artigos dessa revisão sistemática, Okamoto e Arimoto (1987) e Komaru e colaboradores (1997) apresentaram trabalhos que corroboram com o fato da espécie *C. leana* ser triplóide, possivelmente hermafrodita, onde produzem espermatozoides não reduzidos, ou seja, células gonadais e células somáticas como mesmo conteúdo de DNA. Em 2003, Ishibashi e colaboradores e Choi, Chung e Kwak (2007) também encontraram uma espécie do gênero *Corbicula*, *C. fluminea*, com espermatozoides não reduzidos.

Em 1998, Ebied publicou um artigo sobre a espécie *Corbicula fluminalis* (Família: Cyrenidae), em que o número diplóide de *C. fluminalis* foi de 26 cromossomos, não se encontrando triplóides ou tetraplóides. Do gênero *Polymesoda* estudou-se citogeneticamente somente a espécie *Polymesoda solida*, onde o número cromossômico variou entre $2n = 22$ e $2n = 30$ cromossomos (MOLLEDA *et al.*, 1999).

Estudou-se três espécies do gênero *Corbicula*, em que foi encontrado pela primeira vez *C. fluminea*, triplóide com 54 cromossomos, *C. papyracea*, triplóide com 54 cromossomos e *C. colorata* 38 cromossomos (PARK; YONG; CHUNG, 2000).

Em um estudo foi encontrado um morfotipo de cor marrom da espécie *Corbicula fluminea* em que o número de cromossomos foi $4n = 72$ cromossomos nas brânquias, sendo o único tetraploide encontrado até o momento na família Cyrenidae (QIU; SHI; KOMARU, 2001).

Em 2009, Skuza, Łabêcka e Domagała fizeram um estudo sobre citogenética e caracterização morfológica de *Corbicula fluminalis* da Polônia, local onde a espécie é invasora, em que os espécimes apresentaram $3n = 54$ cromossomos.

Tejima e colaboradores (2020), estudaram uma população de *Corbicula fluminea* hermafrodita no Japão. Foi observado diploidia e triploidia nos animais estudados. Pei e colaboradores (2021) fizeram um estudo sobre investigação de ploidias em *Corbicula* na China. Os resultados a partir da citometria de fluxo mostraram que havia 30 diplóides e 15 triplóides em 45 amostras coletadas.

Principalmente esse último artigo que apresenta dados de citometria de fluxo, histologia e citogenética auxilia a elucidar as variações de número de cromossomo, morfologia, ploidia e sexo do animal. Destaque-se a verificação de espermatozoides biflagelados, que indica a reprodução com espermatozoides não-reducionais, os quais geram triplóides e tetraplóides por meio da reprodução por androgênese, citada em vários artigos.

Assim sendo, essa análise qualitativa das informações de citogenética clássica e análise de ploidia das espécies da família Cyrenidae, possibilitou um compilado de técnicas e protocolos utilizados nos últimos 34 anos. Um cenário geral pode ser entendido para esses animais, em relação a caracterização cromossômica, ploidia, assim como apontar o caminho para novos trabalhos nessa área.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas deste artigo se encontram no final da dissertação no item “REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS”.

4.2 ARTIGO 2 – CARACTERIZAÇÃO CARIOTÍPICA DE *Corbicula* aff. *fluminea* (BIVALVIA: VENERIDA) PROVENIENTE DO RIO TIBAGI – BRASIL

Caracterização Cariotípica de *Corbicula* aff. *fluminea* (Bivalvia: Venerida) proveniente do Rio Tibagi – Brasil

RESUMO

O desenvolvimento em diversas áreas, principalmente da biologia molecular e da biologia evolutiva, gera explicações consistentes à variedade de questões relacionadas à origem e evolução da vida. A diversidade cariotípica pode contribuir para o sucesso de invasão de algumas espécies, a exemplo da família Cyrenidae, a qual possui espécies invasoras do gênero *Corbicula* presentes em distintas localidades do mundo com populações poliploides ($2n$, $3n$ e $4n$). No Brasil há a presença de amêijoas invasoras introduzidas em 1980, como *Corbicula fluminea*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula largillierti* e *Corbicula* sp. em diversas bacias hidrográficas. *Corbicula fluminea* foi descrita com $2n = 36$ cromossomos, $3n = 54$ cromossomos e $4n = 72$ cromossomos na Europa e Ásia, mas ainda desconhecida a caracterização cariotípica (CC) na América do Sul. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a CC de *Corbicula* aff. *fluminea* no Alto Rio Tibagi, Paraná. Para isso foram efetuadas análises de citogenética clássica, integradas a citometria de fluxo e a conchiliologia. O número cromossômico obtido foi $2n = 54$ cromossomos. A análise do conteúdo de DNA evidenciou somente organismos com células somáticas diploides. A caracterização morfológica suportou a identificação da espécie. Assim sendo, o emprego integrado de diferentes ferramentas permitiu inferências mais consistentes acerca da diversidade do gênero *Corbicula* e, se apresenta como alternativa a estudos de biologia evolutiva e da invasão destes organismos.

Palavras-chave: Bivalve invasor; Cariótipo; Cromossomos; Ploidia.

Karyotypic Characterization of *Corbicula* aff. *fluminea* (Bivalvia: Venerida) from the Tibagi River – Brazil

ABSTRACT

Developments in several areas, mainly molecular biology and evolutionary biology, generate consistent explanations for the variety of questions related to the origin and evolution of life. Karyotypic diversity may contribute to the successful invasion of some species, such as the Cyrenidae family, which has invasive species of the genus *Corbicula* present in different locations around the world with polyploid populations ($2n$, $3n$ and $4n$). In Brazil there is the presence of invasive clams introduced in 1980, such as *Corbicula fluminea*, *Corbicula fluminalis*, *Corbicula largillierti* and *Corbicula* sp. in several hydrographic basins. *Corbicula fluminea* has been described with $2n = 36$ chromosomes, $3n = 54$ chromosomes and $4n = 72$ chromosomes in Europe and Asia, but the karyotype characterization (KC) in South America is still unknown. Therefore, the objective of this work was to evaluate the KC of *Corbicula* aff. *fluminea* in the Upper Tibagi River, Paraná. For this, classical cytogenetic analyzes were performed, integrated with flow cytometry and conchiology. The chromosome number obtained was $2n = 54$ chromosomes. DNA content analysis revealed only organisms with

diploid somatic cells. The morphological characterization supported the identification of the species. Therefore, the integrated use of different tools allowed more consistent inferences about the diversity of the genus *Corbicula* and, it is presented as an alternative to studies of evolutionary biology and the invasion of these organisms.

Keywords: Bivalve invader; Karyotype; Chromosomes; Ploidy.

Introdução

Nos ambientes aquáticos podemos observar a presença dos moluscos, os quais atualmente se distribuem da região equatorial até os polos (ABSHER, FERREIRA JUNIOR, CRISTO, 2020). Ao longo dos anos foram realizados vários trabalhos sobre a distribuição dos bivalves no Brasil (ABSALÃO, 1987; GONÇALVES; LANA, 1991; ABSALÃO, 1991; RIOS, 1994; SOARES-GOMES; PIRES-VANIN, 2003; PIMPÃO; MANSUR, 2009).

Na Classe Bivalvia há a Ordem Venerida, representada por berbigões e amêijoas (MYERS *et al.*, 2006). Nessa ordem existe a família Cyrenidae representada por amêijoas. No Brasil, observou-se a ocorrência de quatro espécies do gênero *Corbicula*: *C. fluminea* (O. F. Müller, 1774), *C. fluminalis* (O. F. Müller, 1774), *C. largillierti* (Philippi, 1844), *Corbicula* sp. (MARTINS; VEITENHEIMER-MENDES; FACCIONI-HEUSER, 2006).

Corbicula fluminea é comum na África (Central e Meridional), Ásia (Central e Meridional), a qual é uma espécie invasora em muitas partes do mundo, inclusive no Brasil (GLAUBRECHT *et al.*, 2007). Atualmente está presente no continente Europeu e Americano, assumindo o status de espécie invasora (BILOS; COLOMBO; PRESA, 1998; REIS, 2006). Acredita-se que o vetor de introdução dessa espécie foi o transporte nos cascos de barcos (SCHMIDLIN; BAUR, 2007). Na América do Sul, possivelmente o gênero *Corbicula* foi introduzido entre os anos de 1965 e 1975 (ITUARTE, 1981). Em 1980 registrou-se, pela primeira vez, a presença do gênero *Corbicula* no Brasil (VEITENHEIMER-MENDES, 1981).

A espécie *C. fluminea* já foi registrada na Amazônia (BEASLEY; TAGLIANO, FIGUEIREDO, 2003) e no Pantanal (CALLIL; MANSUR, 2002) com caracterização morfológica das conchas e partes moles dos espécimes. O Rio Paraná também tem um aumento considerável das populações de *C. fluminea*, causando declínio das populações nativas de mexilhões (TAKEDA; FUJITA; FONTES JR., 2004).

Segundo Méndez Felpeto (2001), no que se refere à morfologia dos cromossomos, os cariótipos das diferentes espécies demonstram um arranjo específico para cada táxon. Entretanto, algumas famílias podem ser caracterizadas pela sua heterogeneidade, uma vez que

apresentam cromossomos no seu cariótipo com proporções muito díspares. A maioria dos cariótipos descritos para bivalves antes do ano de 1992, incluiu cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, mas, um estudo mais recente realizado com 49 espécies, revela que 13 espécies possuem cariótipos com a maioria dos cromossomos subteloalocêntrico ou telocêntrico (THIRIOT-QUIÉVREUX, 2002). Com o desenvolvimento das técnicas de citogenética clássicas se permitiu visualizar melhor os cromossomos em metáfase, auxiliando o avanço nos conhecimentos para montagem de cariótipo (LEITÃO; CHAVES, 2008).

O número cromossômico em bivalves é bem variado, podendo ser de 20 cromossomos em algumas espécies, como *Mutela rostrata* (família Mutelidae), 28 cromossomos em *Unio elongatus* (família Unionidae), 38 cromossomos em *Corbicula colorata* (família Cyrenidae), e podendo chegar até 40 cromossomos na espécie *Lasaea colmani* (família Laseidae) (THIRIOT-QUIÉVREUX, 2002).

Em relação ao gênero *Corbicula* existem diversos trabalhos sobre citogenética de espécies nativas. Em relação à espécie *Corbicula fluminea*, pode-se citar o número diploide de 36 cromossomos, triploide de 54 cromossomos e tetraploide de 72 cromossomos, com os conteúdos de DNA analisados por meio de microfluorometria (KOMARU *et al.*, 1997; KOMARU; KONISHI, 1999; PARK; YONG; CHUNG, 2000; QIU; SHI; KOMARU, 2001; ISHIBASHI *et al.*, 2003; CHOI; CHUNG; KWAK, 2007; TEJIMA *et al.*, 2020)

A diversidade cariotípica presente em populações de *Corbicula fluminea* no mundo têm se mostrado bastante complexa quando comparada à de outros animais. Têm-se verificado a ocorrência de triploideia, tetraploidia e espermatozoides biflagelados que durante a reprodução são gametas não-reduzidos. Por isso a importância de se abordar a diversidade cariotípica desses organismos integrando informações de outras ferramentas como a conquliologia, citometria de fluxo e outras. Assim, esse trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo eficiente na obtenção de cromossomos da espécie *Corbicula aff. fluminea* proveniente do Alto Rio Tibagi (Ponta Grossa – Brasil), integrando inferências do conteúdo de DNA e conquliologia em apoio a biologia evolutiva e da invasão.

Materiais e Métodos

Área de estudo

A área de estudo desse trabalho está inserida na bacia hidrográfica do Alto rio Tibagi,

no segundo Planalto Paranaense, onde há a predominância da estepe gramíneo lenhosa (Campos Gerais), da floresta ombrófila mista (floresta de araucária) e da floresta estacional semidecidual (“mata de planalto”) (VELOSO; RANGEL-FILHO; LIMA, 1991).

Amostragem e manutenção dos espécimes

Aproximadamente 300 espécimes de *Corbicula* aff. *fluminea* foram coletados em substrato areno-lodoso do Rio Tibagi (25°12' S; 50°04' W) em Ponta Grossa, Paraná (Figura 1, no tópico 3.1), durante os períodos de outubro a dezembro de 2019 e janeiro a agosto de 2021 (autorização de coleta número 66625 ICMBio). Os animais foram mantidos em tanque de 30 litros com recirculação até o momento dos experimentos, com temperatura ambiente, pH 7, alimentados diariamente com farelo de milho e troca de água total do tanque a cada três dias. As conchas dos espécimes serão depositadas na Coleção Malacológica da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CMo/UEPG; <https://www.taxonline.bio.br/uepg-cmo>).

Caracterização e biometria da concha

A biometria da concha (comprimento, altura e largura) dos espécimes (Figura 5) foram medidas com um paquímetro digital de inox (*Lee Tools*, modelo 684132), posteriormente essas foram fotografadas em uma lupa *Leica M205C* para observação da morfologia detalhada das conchas de *C. aff. fluminea*. Foi avaliada a amplitude (máximo e mínimo) média e desvio padrão do comprimento, altura e largura das conchas utilizando o programa *Excel 2007* (*Microsoft*).

Citogenética

A partir de análises de protocolos vários experimentos foram efetuados para a obtenção de cromossomos. Um protocolo otimizado foi obtido a partir de modificações de dois protocolos (PARK; YONG; CHUNG, 2000; JARA-SEGUEL; PEREDO; PARADA, 2005) (ANEXO 1) que foram mais promissoras. Basicamente as brânquias dos animais foram imersas em colchicina 0,05% por 48 horas seguindo uma hipotonização em água do tanque 1:1 água destilada por 45 minutos na estufa a 37 °C. Então essa solução foi centrifugada por

10 minutos a 1000 rpm. Posteriormente, o material foi fixado em metanol: ácido acético (3:1). Após 24 h, essa solução foi gotejada em lâmina de vidro em chapa aquecida à 40 °C e corada com Giemsa 10% por 20 minutos.

As melhores metáfases foram fotografadas em um microscópio *Olympus BX41*. A captura das imagens para as técnicas de citogenética clássica foram efetuadas com o programa *DP-Controller-BSW*. A montagem dos cariótipos foi efetuada utilizando o auxílio do software *Adobe Photoshop CC 2014*.

Citometria de fluxo

A análise de citometria de fluxo foi aplicada em 15 espécimes adultos (> 20 mm de comprimento da concha). As brânquias e tecidos gonadal (obtidos por pulsão) de cada espécime foram separadas de forma unitária em microtubos de 1,5 mL, nos quais foi adicionada solução de lise celular (9,53 mM MgSO 4.7H 2 O, KCl 47,67 mM, Tris 15 mM, sacarose 74 mM, pH 8,0 e 0,8% de Triton X-100) por 10 minutos, para enucleação da amostra, seguindo protocolo descrito por Xavier *et. al* (2017).

A coloração dos núcleos foi realizada com a adição de 800 µL de solução de 4,6 Dimidina 2 Fenilidona Di-cloridrato (DAPI) (0,01% DAPI em Dulbecco's Phosphate Buffer Saline) (Sigma #D5773, St. Louis, EUA). Toda a solução do microtubo foi filtrada em telas de 30 µm (Celltrics, Partec, GMBh, Germany). Posteriormente, o conteúdo do DNA foi medido com um citômetro de fluxo CyFlow Ploidy, Analyzer (Partec, GMBh, Alemanha) e a ploidia foi confirmada por comparação com a referência de calibração, anteriormente realizada com espermatozoides haploides (N) do peixe *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000).

Resultados

Parâmetros ambientais no rio Tibagi

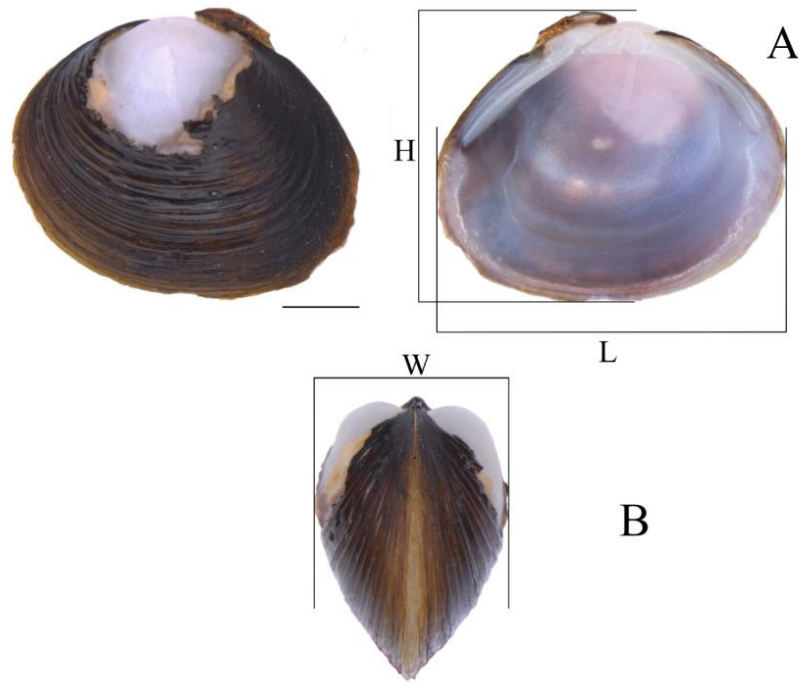
Os bivalves *Corbicula* aff. *fluminea* estudados viviam em um rio areno-lodoso, com sedimento semelhante a cor dos animais. Não foram obtidos os dados ambientais durante o primeiro período de amostragem, mas a temperatura média da água durante o segundo

período de coleta foi de 15 °C no sedimento e 14 °C na água do rio, o pH 7,0.

Conquiliologia e biometria

A concha de *C. aff. fluminea* é ovalada, apresentando a região do rostro curto (Figs 5 A, B). O ligamento localiza-se externo e anterior ao umbo da concha. O perióstraco é de cor marrom escura, apresentando regiões de marrom mais claro e coberto com costelas concêntricas. A região do óstraco e hipóstraco são observados na região umbonal externa da concha, onde há a erosão do perióstraco. O hipóstraco é de coloração branco-violeta perolado. A linha palial estava presente, com as impressões dos músculos adutores bem visíveis, observando-se ausência de seio palial, charneira com dentes cardinais e laterais serrilhados. Em vista lateral não se observa a presença da lúnula. Os dados morfométricos relativos às conchas dos indivíduos usados nos estudos citogenéticos são apresentados na Tabela 3, tendo as referidas características de amplitude e média do comprimento da concha de 9,74 mm (min - max) e 14,49 +/- 4,44 mm, respectivamente.

Figura 5 – Caracterização conquiológica de *Corbicula aff. fluminea*. (A) Vistas externa (a esquerda) e interna (a direita) da concha. (B) Visão lateral da concha. L – comprimento (do inglês *length*); H – altura (do inglês *height*); W – largura (do inglês *width*). Escala: = 5 mm.



Fonte: A autora (2021).

Tabela 3 – Dados morfométricos de conchas de *Corbicula aff. fluminea* do rio Tibagi, Paraná – Brasil.

	Altura (mm)	Comprimento (mm)	Largura (mm)
Min	12,04	14,11	8,87
Max	21,78	26,60	13,92
Média	14,49	17,02	10,17
Desvio Padrão	4,44	5,43	2,76

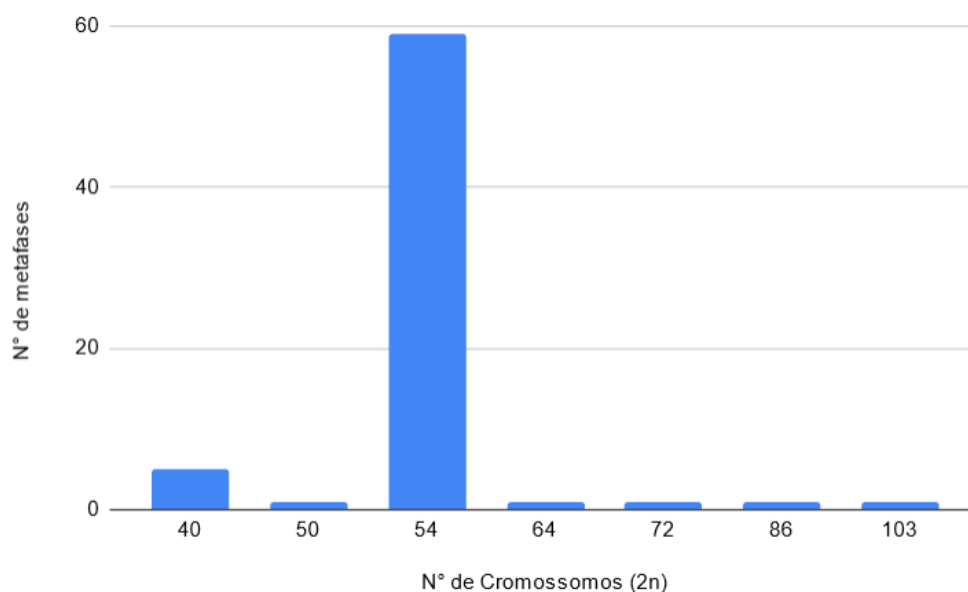
Citogenética e Citometria de fluxo

Ao final da variação dos ensaios realizados em 184 espécimes, 7 espécimes resultaram na obtenção de cromossomos mitóticos interpretáveis com a última versão otimizada do protocolo. A análise do número de cromossomos e a montagem do cariótipo de 12 placas metafásicas revelou que o cariótipo dos espécimes estudados é composto de 54 cromossomos (Fig. 6; Tabela 4).

Tabela 4 – Cariótipos de *Corbicula fluminea* encontrados no mundo.

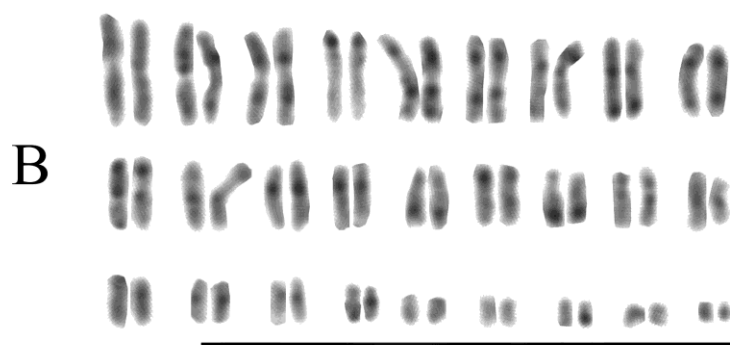
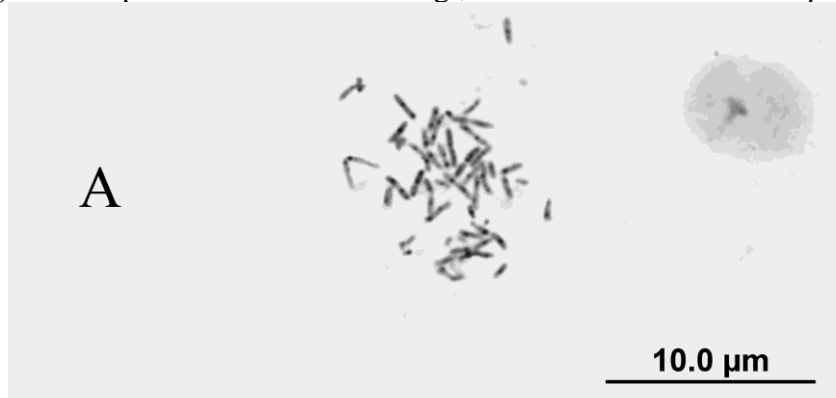
Táxons	Localidade	Número de cromossomos	Cariótipo	Referência
<i>Corbicula aff. fluminea</i>	Rio Taide, Japão	2n = 36	-	Komaru <i>et al.</i> (1997)
<i>Corbicula aff. fluminea</i>	Rio Tibagi, Brasil	2n = 54	-	Presente estudo
<i>Corbicula fluminea</i>	Lago Uiam, Chunchon, Coreia do Sul	3n = 54	1m, 5 sm, 12 st	Park, Yong e Chung (2000)
	Anyue County, Sichuan, China	3n = 54	2m, 13 sm (3+4+6), 3 st	Qiu, Shi e Komaru (2001)
	Anyue County, Sichuan, China	4n = 72	2m, 13 sm (3+4+8), 3 st	Qiu, Shi e Komaru (2001)
	Shishigatani creek, Kitashirakawa, Kyoto, Japan	2n	-	Ishibashi (2003)
	Lago Uiam, Coreia do Sul	3n = 54	1m, 5 sm, 12 st	Choi, Chung e Kwak (2007)
	Shirakawa River, Quioto, Japão	2n; 3n	-	Tejima <i>et al.</i> (2020)

Figura 6 – Caracterização do número cromossômico obtido em 69 metáfases encontradas em sete indivíduos de *Corbicula* aff. *fluminea* do rio Tibagi, Paraná – Brasil. Moda = 54 cromossomos.



Fonte: A autora (2021).

Figura 7 – (A) Cromossomos metafásicos e respectivo cariótipo (A e B) de *Corbicula* aff. *fluminea* proveniente do Rio Tibagi, Paraná – Brasil. Barra=10 μ m.



Fonte: A autora (2021).

O índice relativo de DNA medido por citometria de fluxo das células somáticas das brânquias de *C. aff. fluminea* (11 espécimes) revelou espécimes diploides (2N; 5 espécimes = 45,46%) e com mosaicismo (6 espécimes = 54,54%) quando comparado com o conteúdo relativo de DNA padrão obtido a partir de espermatozoides (N) do lambari *A. altiparanae*. Ao ser avaliado o índice relativo de DNA das células germinativas de *C. aff. fluminea* (13 espécimes) a partir da pulsão das gônadas revelaram espécimes haploides (N; 1 espécime = 7,69%), diploides (2N; 10 espécimes = 76,92%) e com mosaico de células (2 espécimes = 15,39%). Essa diferença de localização do pico diplóide em células somáticas e germinativas pode estar associada a contaminações (células nas brânquias e desenvolvimento gonadal, respectivamente) ou artefato da metodologia de amostragem nas gônadas. Em alguns espécimes não foi possível avaliar o índice relativo de DNA

Discussão

Em relação à descrição de características conquiológicas, dos oito trabalhos com dados citogenéticos de *C. fluminea* encontrados na literatura, apenas quatro artigos caracterizavam as conchas apresentando imagens e descrições destas. Em nenhum dos trabalhos observa-se a indicação de depósitos das conchas em coleções científicas. Em dois trabalhos (KOMARU; KONISHI, 1999; QIU; SHI; KOMARU, 2001) não é possível visualizar com clareza por meio das imagens as costelas concêntricas, impressão dos músculos adutores, região palial, dentes cardinais, regiões do umbo e ligamento, estruturas fundamentais para a identificação. Em ambos os artigos se enfatiza a coloração das conchas. KOMARU; KONISHI (1999) comentaram sobre as colorações das conchas serem externamente amarelas ou marrons e internamente brancas e marrons. QIU; SHI; KOMARU (2001) expuseram sobre as colorações das conchas serem externamente amarelas ou marrons claras e escuras, sendo internamente brancas e marrons escuras. Nos outros dois artigos (ISHIBASHI *et al.*, 2003; TEJIMA *et al.*, 2020) é possível ver com mais clareza as regiões das conchas, sendo mencionadas no texto a coloração e como são essas regiões dos animais. Esses dados diferem do que encontramos no presente artigo, especialmente na visualização de costelas concêntricas mais separadas, regiões de ligamento menores e mais afastadas do umbo e formato não tão ovalado como nos exemplares de *C. aff. fluminea* do Rio Tibagi – Brasil. Diante disto, é possível que não se tratem de uma mesma espécie.

Em adição a essas informações, os artigos apresentam informações citogenéticas. Komaru *et al.* (1997), utilizaram o tecido das brânquias para se obter os cromossomos mitóticos de *C. aff fluminea* proveniente do Japão, obtendo-se $2n = 36$ cromossomos. Park, Yong e Chung (2000) em uma população da Coreia usaram tecidos das gônadas, encontrando $3n = 54$ cromossomos. Contudo, nenhum destes trabalhos traz informações sobre análise de ploidia a fim de confirmar se os organismos analisados seriam diplóides ou triplóides. Na Coreia, Choi, Chung e Kwak (2007) observaram que uma população de *C. fluminea* apresentava $3n = 54$ cromossomos, não sendo feita análise de ploidia com microfluorometria ou citometria de fluxo para confirmar se são triplóides. Em nossa pesquisa, encontramos em 59 células de sete animais o número cromossômico de $2n = 54$ cromossomos, sendo feita análise a partir das brânquias, com a análise de ploidia confirmando se tratar de indivíduos diploides.

Qiu, Shi e Komaru (2001) estudando *C. fluminea* no Japão, utilizaram brânquias para obtenção dos cromossomos, tendo como resposta que parte da população seria $3n = 54$ cromossomos e parte $4n = 72$ cromossomos. Nesse estudo, fez-se a avaliação do conteúdo de DNA por microfluorimetria para se testar a ploidia desses animais.

Assim sendo, em comparação ao número de cromossomos, na Classe Bivalvia o número cromossômico mais frequente é $2n = 38$ cromossomos (NAKAMURA, 1985; THIRIOT-QUIÉVREUX, 1994). A população de *C. aff fluminea* proveniente do rio Tibagi – Brasil apresenta número de cromossomos semelhante às populações da Coreia e Japão que apresentam 54 cromossomos (PARK; YONG; CHUNG, 2000; QIU; SHI; KOMARU, 2001; CHOI; CHUNG; KWAK, 2007), contudo, as informações divergem em relação ao nível de ploidia dos indivíduos.

Quanto à morfologia dos cromossomos, na maioria dos cariótipos são sugeridos cromossomos metacêntricos, submetacêntricos e subtelocentricos (PARK; YONG; CHUNG, 2000; QIU; SHI; KOMARU, 2001; CHOI; CHUNG; KWAK, 2007). Aqui preferimos organizar, no momento, o cariótipo do maior para o menor par de cromossomos, visando não trazer informações inseguras sobre os tipos cromossômicos para a literatura. Destaque-se que reconhecemos a ocorrência de três pares de microcromossomos (Figura 7).

Ainda em relação à citogenética clássica, foram encontradas regiões nos cromossomos com maior presença de heterocromatina, sendo essas normalmente pericentroméricas ou então periteloméricas, muitas vezes resultando em um padrão de marcações longitudinais que

favoreceu o pareamento dos cromossomos homólogos. Técnicas de bandamento cromossômico têm sido empregadas com sucesso em vários bivalves. Em *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), ordem Mytiloidea, encontrou-se seis tipos diferentes de heterocromatina e em outras três espécies do gênero *Mytilus* foi encontrado a existência de marcadores cromossômicos (Martínez-Lage *et al.*, 1995, 1996). Na Ordem Venerida, foram obtidos bandamentos nas regiões próximas ao centrômero e ao telômero de cromossomos das espécies *Spisula solida* (Linnaeus, 1758), *Spisula subtruncata* (da Costa, 1778) e *Macra stultorum* (Linnaeus, 1758), família Mactridae (GARCÍA-SOUTO *et al.*, 2016). Considerando assim a proximidade com a espécie *C. fluminea*, embora sejam de diferentes famílias (Cyrenidae e Mactridae), é sugestivo de que a presença de heterocromatina em regiões próximas aos centrômeros e telômeros sejam características conservadas na Ordem Venerida.

Corroboram-se aqui as observações de Komaru e Konishi (1999), que relatam a dificuldade de se coletar o material gonadal dessa espécie. Ao avaliarmos o sistema reprodutivo de *C. fluminea*, dois segmentos das gônadas são observados, sendo uma gônada de cada lado do animal, as quais ocupam grande parte da superfície da massa visceral na parte dorsal do manto como relatado por Mansur (2012). Isto contribui para a introdução de artefatos de amostragem durante a pulsão dos tecidos gonadais. A distribuição das células germinativas e sua maturação pode também afetar as análises do conteúdo de DNA. A distribuição de distintas células nos folículos em diferentes fases de desenvolvimento das células germinativas pode introduzir este viés na metodologia nos dados de conteúdo de DNA. Assim indica-se a necessidade de novas abordagens utilizando de métodos mais refinados para obter as amostras de tecido somático e gonadal, a exemplo da microdissecção e aproveitamento de desova induzida para a avaliação da ploidia.

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho estabelecem condições protocolares otimizadas para a obtenção de cromossomos de *Corbicula* e permitem análises comparativas. Contudo, destaca-se a importância das abordagens citogenéticas serem integradas a métodos de identificação e a necessidade de padronizar a análise de ploidia, a qual é necessária às inferências taxonômicas, para a biologia evolutiva e da invasão.

Referências Bibliográficas

As referências bibliográficas deste artigo se encontram no final da dissertação no item “REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS”.

5 CONCLUSÕES

Com isso, a partir do desenvolvimento dessa análise qualitativa das informações de citogenética clássica e análise de ploidia das espécies da família Cyrenidae, obteve-se um compilado de técnicas e protocolos utilizados nos últimos 34 anos.

Assim sendo, os resultados práticos de citogenética obtidos na população de *Corbicula aff fluminea* proveniente do Rio Tibagi, Paraná – Brasil estabelecem condições de protocolos para a obtenção de cromossomos de *Corbicula* e permitem análises comparativas.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 6023**: Informações e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.
- ABSALÃO, R.S. Associações malacológicas ao largo do Rio Grande, RS. As comunidades paralelas de Thorson e associações bêmicas de Perés. In: ACIESP (ed.), 1987. **Anais do Simpósio sobre Ecossistemas da Costa Sul e Sudeste Brasileira, Cananéia**, p. 401-414, 1987.
- ABSALÃO, R.S. Environmental discrimination among soft-bottom mollusc associations off Lagoa dos Patos, South Brazil. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 32, p. 71-85, 1991.
- ABSHER, T.M.; FERREIRA JUNIOR, A. L.; CHRISTO, S. W. **Conchas de moluscos marinhos do Paraná [livro eletrônico]: bivalves e gastrópodes**. 2.ed. - São Bernardo do Campo: SC; Curitiba, PR: Museu de Ciências Naturais, 2020.
- AGUDO-PADRÓN, I. Additions to the Systematic Inventory of Non-Marine Molluscs Occurring in the State of Santa Catarina/SC, Central Southern Brazil Region. **Advances in Environmental Studies**, v. 4, n. 1, p. 261-270, 2020. DOI: 10.36959/742/222.
- ANISIMOVA, A. A. Genome sizes of some Bivalvia species of the Peter the Great Bay of the Sea of Japan. **Comparative Cytogenetics**, v. 1, n. 1, p. 63-69, 2007.
- BANARESCU, P. **Zoogeography of Fresh Waters**. Verlag, Wiesbaden, 1990.
- BARKOUDAH, E.; *et al.* Ultrafiltração e Diuréticos em Pacientes com Insuficiência Cardíaca Aguda Descompensada: Uma Meta-análise. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 104, n. 5, p. 417-425, 2015.
- BEASLEY, C.R.; TAGLIANO, C. H.; FIGUEIREDO, W. B. The occurrence of the Asian clam *Corbicula fluminea* in the lower Amazon basin. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 317-32, 2003.
- BIELER, R.; CARTER, J.G.; COAN, E.V. Classification of Bivalve families. Nomenclator of Bivalve Families. **Malacologia**, v. 52, n.2, p. 1-184, 2010.
- BIOLIB. **Genus *Corbicula***. 2019. Disponível em < <https://www.biolib.cz/en/taxon/id3008/>> Acesso em: 31 maio 2021
- BILOS, C.; COLOMBO, J.C.; PRESA, M.J.R. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*Corbicula fluminea*) of the Rio de la Plata Estuary, Argentina. **Environmental Pollution**, v. 99, p. 1-11, 1998.
- BRITO, C. S. F.; MANSUR, M. C. D.; ROCHA-BARREIRA, C. A. *Cyanocyclas brasiliana* (Bivalvia: Cyrenidae) rediscovered in the limnic part of Paranaíba River delta, Northeast Brazil. **Check List**, v. 11, n. 4, p. 1-5, 2015.

BRUGGEN, A. C. Biodiversity of the mollusca: time for a new approach. p.1-18, 1995. In A.C. van Bruggen, S.M. Wells & Th. C.M. Kemperman (eds.). Biodiversity and conservation of the Mollusca. **Eleventh International Malacological Congress**, Siena, Italy, 1995.

CAIRNS JUNIOR, J.; PRATT, J. R. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H, (Ed.). **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**. New York: Chapman e Hall, p. 10-27, 1993.

CALLIL, C.T.; MANSUR, M. C. D. Corbiculidae in the Pantanal: history of invasion in southeast and central South America and biometrical data. **Amazoniana**, v. 17, p. 153-16, 2002.

CASTILLO, A. R.; BRASIL, L. G.; QUEROL, E.; OLIVEIRA, E. V.; MANSUR, M. C. D. Moluscos bivalves da localidade de São Marcos, bacia do Médio rio Uruguai, Uruguiana, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 20, n. 4, 73-79, 2007.

CHOI, K.; CHUNG, E.; KWAK, O. Karyotype and Reproductive Characteristics of the Diploid Brackish Water Clam, *Corbicula japonica* and the Triploid Freshwater Marsh Clam, *C. fluminea*. **Korean Journal of Malacology**, v. 23, n. 1, p. 39-49, 2007.

CHUNG, P. R.; JUNG, Y.; PARK, Y. K.; HWANG, M. G.; SOH, C. T. *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae): A possible second molluscan intermediate host of *Echinostoma cinetorchis* (Trematoda: Echinostomatidae) in Korea. **Korean Journal of Parasitology**, v. 39, p. 329-332, 2001.

CLARKE, M.; OXMAN, A. D. **Cochrane Reviewers' Handbook 4.1 [updated June 2000]**. In: Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 4.1. Oxford, England: The Cochrane Collaboration, 2000.

COAN, E.; VALENTICH-SCOTT, P. Bivalve seashells of tropical west America. **Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Northern Perú**. Santa Barbara, Santa Barbara museum of natural History, 2012.

DARRIGRAN, G; DE DRAGO, I. E. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. **Nautilus**, v. 114, p. 69-73, 2008.

DARRIGRAN, G.; DRAGO, I. E. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. **Nautilus**, v. 114, p. 69-73, 2000.

DEMO, P. **Metodologia do conhecimento científico**. São Paulo: Atlas, 2000.

DIXON, D. R.; PRUSKI, A. M.; DIXON, L. R. J.; JHA, A. N. Marine Invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. **Mutagenesis**, v.17, n. 6, p.495-507, 2002.

DOS SANTOS, F. S. A importância da Biodiversidade. **Revista Científica de Educação a**

Distância. UNIMES-VIRTUAL. Ed. Especial. ISSN: 1982-6109, 2010.

EBIED, A. M. Karyological Studies on Three Egyptian Freshwater Species of Order Eulamellibranchiata (Bivalvia-Mollusca). **Cytologia**, v. 63, p. 17-26, 1998.

ESTEVEZ, F. de A. **Fundamentos de limnologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FONSECA, J. R. S.; FERNANDES, C. A. F.; CUNHA, F. E. A. Alimentação do *Centropomus undecimalis* (Actinopterygii, Centropomidae) no estuário do delta do rio Parnaíba, Piauí, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 39536-39554, 2021.

GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 2, n. 1, p. 183-184, 2014.

GARCÍA-SOUTO, D.; PÉREZ-GARCÍA, C.; KENDALL, J.; PASANTES, J.J. Molecular Cytogenetics in Trough Shells (Mactridae, Bivalvia): Divergent GC-Rich Heterochromatin Content. **Genes**, v. 7, n. 8, 47, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes7080047>

GIRIBET, G. Bivalvia. **In Phylogeny and Evolution of the Mollusca**, Edited by WINSTON F. PONDER; DAVID R. LINDBERG, University of Califórnia Press, 2008.

GLAUBRECHT, M., *et al.* Inventorizing an invader: Annotated type catalogue of Corbiculidae Gray, 1847 (Bivalvia, Heterodonta, Veneroidea), including Old World limnic *Corbicula* in the Natural History Museum Berlin 1. **Malacologia**, v. 49, n. 2, p. 243-72, 2007.

GODOY, A. S. Introdução a pesquisa qualitativa e suas possibilidades. **Revista de Administração de Empresas**, v. 35, n. 2, p. 57-63, 1995.

GONÇALVES, E.M.; LANA, P. C. Padrões de distribuição de bivalvia e gastrópoda na plataforma continental da costa sudeste do Brasil (24° S – 27° S). **Nerítica**, v.6, n. 1-2, p. 73-92, 1991.

GOULART, M. D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista FAPAM**, n.1, 2003.

GRAF, D. L. Patterns of Freshwater Bivalve Global Diversity and the State of Phylogenetic Studies on the Unionoidea, Sphaeriidae, and Cyrenidae, **BioOne Research Evolved**, v. 31, n. 1, p. 135-153, 2013.

GRANEY, R.L. CHERRY, D.S.; RODGERS JR., J. H.; CAIRNS JR. J. The influence of thermal discharges and substrate composition of the asiatic clam *Corbicula fluminea*, in the New River, Virginia. **The Nautilus**, v. 94, n. 4, p. 130-135, 1980.

GUERRA, M. S. **Introdução à Citogenética Geral.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

HAPONSKI, A. E.; FOIGHIL, D. Ó. Phylogenomic analyses confirm a novel invasive North American *Corbicula* (Bivalvia: Cyrenidae) lineage, 2019. **Pe7484**. DOI:

<https://doi.org/10.7717/peerj.7484> Disponível em: <<https://peerj.com/articles/7484/>> Acesso em: 04 jun 2021

HICKMAN JUNIOR, C.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A.; OBER, W. C.; GARRISON, C. W. **Princípios Integrados de Zoologia**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

HUBER, M. **Compendium of bivalves. A full-color guide to 3,300 of the world's marine bivalves. A status on Bivalvia after 250 years of research**. Hackenheim, ConchBooks, 2010.

ISHIBASHI, R.; OOKUBO, K.; AOKI, M.; UTAKI, M.; KOMARU, A.; KAWAMURA, K. Androgenetic Reproduction in a Freshwater Diploid Clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae). **Zoological Science**, v. 20, p. 727-732, 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.20.727>.

ITUARTE, C. F. Primeira notícia acerca de la presencia de pelecípodos asiáticos em el área rioplatense. **Neotropica**, v. 27, p. 79-82, 1981.

JARA-SEGUEL, P.; PEREDO, S.; PARADA, E. Registro de Poliploidia en La Almeja Dulceacuicola *Musculium Argentinum* (D'Orbigny 1835) (Sphaeriidae, Veneroidea). **Gayana**, v. 69, n. 1, p. 36-40, 2005.

KOMARU, A.; Y. UCHIMURA; H. IEYAMA; K. T. WADA. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. **Aquaculture**, v. 69, p. 201-209, 1988.

KOMARU, A.; UCHIMURA, Y; IEYAMA, H; WADA, K. T. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. **Aquaculture**, v. 69, p. 201-209, 1988.

KOMARU, A.; KONISHI, K.; NAKAYAMA, I.; KOBAYASHI, T.; SAKAI, H.; KAWAMURA, K. Hermaphroditic Freshwater Clams in the Genus *Corbicula* Produce Non-Reductional Spermatozoa With Somatic DNA Content. **Biological Bulletin**, v. 193, p. 320-323, 1997. DOI: 10.2307/1542934.

KOMARU, A.; KONISHI, K.; KAWAMURA, K.; SAKAI, H. Morphological remarks of a *Corbicula* species collected in Saga Prefecture, Japan. Bull. Nat. Rex Inst. **Aquacult**, n. 27, 1998.

KOMARU, A.; KONISHI, K. Non-reductional Spermatozoa in Three Shell Color Types of the Freshwater Clam *Corbicula fluminea* in Taiwan. **Zoological Science**, v. 16, p. 105-108, 1999.

LEE, T.; SIRIPATRAWAN, S; ITUARTE, C. F.; FOIGHIL, D. Ó. Invasion of the clonal clams: *Corbicula* lineages in the New World. **American Malacological Bulletin**, v. 20, p. 113-122, 2005.

LEITÃO, A.; CHAVES, R. Banding for chromosomal identification in Bivalves: A 20-year History. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 2, p.

44-49, 2008.

LIMA, J. C. S. Novos registros de *Corbicula fluminea* (MULLER, 1774) (BIVALVIA, CORBICULIDAE) no Sudeste do Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 2, 7-11, 2017.

MALLMAM, MARIA L. W. **Moluscos Marinhos de Interesse na Etnomedicina Alagoana. Pernambuco (BRASIL)**: UFPE, 2000. 65p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Oceanografia – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2000.

MANSUR, M. C. D. Gloquídeo de *Diplodon martensi* (Ihering) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) e seu ciclo paraistário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, 185-194, 1999.

MANSUR, M. C. D.; PEREIRA, D. Bivaves da bacia do rio dos Sinos, Rio Grande do Sul, Brasil (Bivalvia, Unionoidea, Veneroidea e Mytiloidea). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 4, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752006000400021>

MANSUR, M.C.D. Bivalves invasores límnicos: morfologia comparada de *Limnoperna fortunei* e espécies de *Corbicula* spp. In: Mansur MCD, Santos CP dos, Pereira D, Paz ICP, Zurita MLL, Rodriguez MTR, Nehrke MV, Bergonci PEA (eds) Moluscos límnicos invasores no Brasil: biologia, prevenção e controle. **Redes Editora**, Porto Alegre/RS, 2012. p. 61–74.

MARTÍNEZ-LAGE, A.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.; MÉNDEZ J. Chromosomal markers in three species of the genus *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). **Heredity**, v. 74, p. 369-375, 1995.

MARTÍNEZ-LAGE, A.; GONZÁLEZ-TIZÓN A.; MÉNDEZ J. Chromosomes differences between European mussel populations (genus *Mytilus*). **Caryologia**, v. 49, p. 343-355, 1996.

MARTINS, D. S.; VEITENHEIMER-MENDES, I. L.; FACCIONI-HEUSER, M. C. Aspectos morfológicos e de incubação em três espécies de *Corbicula* Mühlfeld, no lago Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil (Bivalvia, Corbiculidae). **Biota Neotropical**, v. 6, n. 2, p. 1-11, 2006. Disponível em: <http://www.biotaneotropica.org.br/v6n2/pt/abstract?article+bn02806022006> Acesso em: 17 jan 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032006000200016>

MCMAHON, R.F. Ecology of an invasive pest bivalve, *Corbicula*. In *The Mollusca* (W.D. Russel-Hunter ed.). **Academic Press**, New York, v. 6, p. 505-561, 1983.

MÉNDEZ FELPETO, J. **Los moluscos bivalvos: aspectos citogenéticos, moleculares y aplicados**. Servicio de Publicaciones, 2001.

MIYAZAKI, I. On the development of bivalves belonging to the genus *Corbicula*. **Bull. Jpn. Sot. Sci. Fish.**, v. 5, p. 249-254, 1936.

MOLLEDA, P. E.; SEVEREYN, Y. G.; SEVEREYN, H.; MOLINA, J. Determinación del número de cromosomas de *Polymesoda solida* (Bivalvia: Corbiculidae) utilizando dos métodos citogenéticos. **Scientific Journal from the Experimental**, v. 7, n. 1, p. 17-22, 1999.

MOLLUSCABASE, *Cyrenidae* Gray, 1840, 2021. Disponível em: <<https://www.molluscabase.org/aphia.php?p=taxdetails&id=238370>> Acesso em: 02 jun 2021.

MYERS, P.; ESPINOSA, R.; PARR, C. S.; JONES, T.; HAMMOND, G. S.; DEWEY, T. A. **The Animal Diversity Web (online)**, 2006. Disponível em: <<https://animaldiversity.org/site/accounts/classification/Mytiloida.html>> Acesso em: 16 jan. 2021.

NAKAMURA, H. K. A review of molluscan cytogenetic information based on CISMOCH-Computerized index system for molluscan chromosomes. *Bivalvia, Polyplacophora and Cephalopoda. Venus, Japanese Journal of Malacology*, n. 44, p. 193-225, 1985.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. s.l.: John Wiley & Sons, Inc., 600p., 1994.

NEYELOFF, J. L.; FUCHS, S. C.; MOREIRA, L. B. Meta-analyses and Forest plots using a microsoft excel spreadsheet: step-by-step guide focusing on descriptive data analysis. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 52, 2012.

OKAMOTO, A.; ARIMOTO, B. Chromosomes of *Corbicula japonica*, *C. sandai* and *C. (Corbiculina) leana* (Bivalvia: Corbiculidae). **Jap. Jour. Malac.**, v. 45, n. 3, p. 194-202, 1987.

OLIVEIRA, E.; MEYER, A. A. N.; ARMSTRONG, R. M. Ocorrência e densidade populacional do molusco invasor *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia: Corbiculidae), no rio Passaúna, Paraná, Brasil. **Estudos de Biologia Ambiente e Diversidade**, v. 36, n. 86, p. 103-114, 2014.

PAGOTTO, J. P. A.; PAVANELLI, G.C. Composição e sazonalidade dos moluscos do alto rio Paraná, Brasil e sua potencialidade como hospedeiros intermediários de digenéticos. **Acta Sci. Biol. Sci, Maringá**, v. 30, n. 2, p. 309-314, 2008. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v30i3.501.

PARK, G.; YONG, T.; IM, K.; CHUNG, E. Karyotypes of three species of *Corbicula* (Bivalvia: Veneroidea) in Korea. **Journal of Shellfish Research**, v. 19, n. 2, p. 979-982, 2000.

PEI, H.; ZHQN, J.; QIN, L.; LI, K.; PI, J.; ZENG, C.; LI, D. Ploidy Investigation of *Corbicula* from the Yan River, Lake Dongting Basin. **Life Science Research**, v. 24, n. 6, p. 452-465, 2020.

PEREIRA, M. G.; GALVÃO, T. F. Heterogeneidade e viés de publicação em revisões sistemáticas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 775-778, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222014000400775&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 11 jul 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742014000400021>.

PIGNEUR, L. M.; MARESCAUX, J; ROLAND, K; ETOUNDI, E; DESCY, J. P.; VAN DONINCK, K. Phylogeny and androgenesis in the invasive *Corbicula* clams (Bivalvia, Corbiculidae) in Western Europe. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 147, 2011.

PIMPÃO, D. M.; MARTINS, D. S. Ocorrência do molusco asiático *Corbicula fluminea* (Müller, 1774) (Bivalvia, Corbiculidae) no baixo rio Negro, Amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 3, 2008.

PIMPÃO, D. M.; MANSUR, M. C. D. Chave pictórica para identificação dos bivalves do baixo Rio Aripuanã, Amazonas, Brasil (Sphaeriidae, Hyriidae e Mycetopodidae). **Biota Neotropical**, v. 9, n. 3, p. 378-384, 2009.

PISANO, E; OZOUF-COSTAZ, C; FORESTI, F. **Fish Cytogenetics**. 1 Edição, EUA, Science Publishers, 2007.

QIU, Q.; SHI, Q.; KOMARU, A. Yellow and Brown Shell Color Morphs of *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) from Sichuan Province, China, are Triploids and Tetraploids. **Journal of Shellfish Research**, v. 20, n. 1, p. 323-328, 2001.

RAVEN, P. H. The bases of Angiosperm phylogeny: cytology. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, p. 724-764, 1975.

REIS, J. **Atlas dos bivalves de água doce de Portugal continental**. Lisboa, 2006.

RIOS, E. B. **Seashells of Brasil**. Fundação Universidade do Rio Grande, Museu Oceanográfico, Rio Grande, 1994, p. 494.

RODRIGUES, C. L.; ZIEGELMANN, P. K. Metanálise: Um Guia Prático. **Revista HCPA**, v. 30, n. 4, p. 436-447, 2010.

RODRIGUES, J. C. A.; PIRES-JUNIOR, O. R.; COUTINHO, M. F.; MARTINS-SILVA, M. J. First occurrence of the Asian Clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Paranoá Lake, Brasília, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, 789-790, 2007.

RUPPERT, E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. Uma Abordagem Funcional-Evolutiva. 7ª ed. São Paulo: Roca, 2005.

SÁ, R. L.; SANTIN, L.; AMARAL, A. M. B.; MARTELLO, A. R.; KOTZIAN, C. B. Diversidade de moluscos em riachos de uma região de encosta no extremo sul do Brasil. **Biota Neotropical**, vol. 13, no. 3, p. 213-221, 2013. Disponível em: <
<http://www.biotaneotropica.org.br/v13n3/pt/abstract?inventory+bn00213032013> > Acesso em: 03 nov 2020

SALVADOR, L. B.; DOMANESCHI, O.; AMARAL, A. C. Z.; MORGADO, E. H.; HENRIQUES, S. A. Malacofauna da Região Entremarés de Praias da Ilha de São Sebastião (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, n.4, p. 1013-1035, 1998.

- SCHMIDLIN, S.; BAUR, B. Distribution and substrate preference of the invasive clam *Corbicula fluminea* in the river Rhine in the region of Basel (Switzerland, Germany, France). **Aquatic Sciences**, v. 69, p. 153-161, 2007.
- SKUZA, L.; ŁABĘCKA, A. M.; DOMAGAŁA, J. Cytogenetic and Morphological Characterization of *Corbicula fluminalis* (O.F. Müller, 1774) (Bivalvia: Veneroidea: Corbiculidae): Taxonomic Status Assessment of a Freshwater Clam. **Folia biologica**, v. 57, n.3-4, p. 177-185, 2009. DOI: 10.3409/fb57_3-4.177-18
- SOARES-GOMES, A.; PIRES-VANIN, A. M. S. Padrões de abundância, riqueza e diversidade de moluscos bivalves na plataforma continental ao largo de Ubatuba, São Paulo, Brasil: uma comparação metodológica. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 4 p. 717-725, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-81752003000400027> Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-81752003000400027&lng=en&nrm=iso> Acesso em: 20 jan. 2021.
- SOUZA, G. T. R.; MACHADO, M. H.; DIAS, M. L. G. G.; YAMADA, F. H.; PAGOTTO, J. P. A.; PAVANELLI, G.C. Composição e sazonalidade dos moluscos do alto rio Paraná, Brasil e sua potencialidade como hospedeiros intermediários de digenéticos. **Acta Sci. Biol. Sci, Maringá**, v. 30, n. 2, p. 309-314, 2008. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v30i3.501
- SUMNER, A.T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, n. 75, p. 304-306, 1972.
- TAKEDA, A.M.; FUJITA, D. S.; FONTES JR, H. M. Perspectives on exotic bivalves proliferation in the Upper Paraná River floodplain. **I Structure and functioning of the Paraná River and its floodplain**, p. 97-100, 2004.
- TEJIMA, K.; YAMADA, M.; HOUKI, S.; KOMARU, A. Coexistence of Hermaphrodites and Males in Adrogenetic Clam *Corbicula fluminea* Müller in Shirakawa River, Kyoto, Japan. **Journal of Shellfish Research**, v. 39, n. 2, p. 337-344, 2020.
- THIRIOT-QUIÉVREUX, C. **Advances in cytogenetics of aquatic organisms. In Genetics and evolution of aquatic organisms. Edited by A.R. BEAUMONT. CHAPMAN; HALL**, p. 369–388, London, England, 1994.
- THIRIOT-QUIÉVREUX, C. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. **Cahiers de Biologie Marine**, v. 43, n. 1, p. 17-26, 2002.
- TIDON, R.; LEWONTIN, R. C. **Teaching evolutionary biology**, 2004.
- VAUGHN, C. C.; HAKENKAMP, C. C. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. **Freshwater Biology**, v. 46, p. 1431-1446, 2001.
- VEITENHEIMER-MENDES, I.L. *Corbicula manilensis* (Philippi, 1844) molusco asiático, na bacia do Jacuí e do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil (Bivalvia, Corbiculidae). **Iheringia, Série Zoológica**, v. 60, p. 63-74, 1981.

VELOSO, H.P.; RANGEL-FILHO, A.L.R.; LIMA, J.C.A. 1991. **Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal**. IBGE, Rio de Janeiro.

VIANNA, M. P.; AVELAR, W. E. P. Ocorrência da espécie invasora *Corbicula fluminea* (Bivalvia, Corbiculidae) no rio Sapucaí (São Paulo, Brasil). **Biotemas**, v. 23, n. 3, p. 59-66, 2010.

XAVIER, P. L. P.; SENHORINI, J. A.; PEREIRA-SANTOS, M.; FUJIMOTO, T.; HIMODA, E.; SILVA, L. A.; SANTOS, S. A.; YASUI, G. S. A Flow Cytometry Protocol to Estimate DNA Content in the Yellowtail Tetra *Astyanax altiparanae*. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 1-8, 2017.

ANEXO A – PROTOCOLO DE OBTENÇÃO DE METÁFASES DE *Corbicula fluminea*

1. Imergir o tecido inteiro das brânquias do animal em colchicina 0,05% por 48 horas;
2. Cortar e macerar o tecido, colocando-o em uma solução de hipotônica de água do tanque: água destilada (1:1) na estufa a 37 °C por 45 minutos;
3. Então, essa solução foi centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm;
4. Posteriormente, selecionou-se 1 ml desse material centrifugado e 0,5 ml metanol: ácido acético (3:1) e foi posto em microtúbulo;
5. Colocar esse microtúbulo com a solução em freezer;
6. Após 24 horas, essa solução é gotejada em lâmina de vidro, sendo posta essa em chapa quente aquecida à 40 °C;
7. Cora-se com Giemsa 10% por 20 minutos.