



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**



**CENTRO DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM RECURSOS AQUÁTICOS E PESCA**

RODOLF GABRIEL PRAZERES SILVA LOPES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE OSTRAS NATIVAS DO MARANHÃO
UTILIZANDO O GENE COI**

São Luís – MA
2016

RODOLF GABRIEL PRAZERES SILVA LOPES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE OSTRAS NATIVAS DO MARANHÃO
UTILIZANDO O GENE COI**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga - CESC/UEMA
Coorientador: Prof. Dr. Ícaro Gomes Antonio – CCA/UEMA

São Luís – MA
2016

RODOLF GABRIEL PRAZERES SILVA LOPES

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE OSTRAS NATIVAS DO MARANHÃO
UTILIZANDO O GENE COI**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca da Universidade Estadual do Maranhão, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elmary da Costa Fraga (Orientador)
Universidade Estadual do Maranhão

Profa. Dra. Lígia Tchaika/Membro
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr. Luís Fernando Carvalho Costa/Membro
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Ícaro Gomes Antonio/Suplente
Universidade Estadual do Maranhão

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder a graça de realizar uma etapa singular da minha vida acadêmica.

Ao Professor Dr. Elmary da Costa Fraga, pela orientação competente, paciente e segura, apontando caminhos para o desenvolvimento desta dissertação. Obrigado pelos ensinamentos, por todo apoio e pela disponibilidade.

Ao Professor Ícaro Gomes Antonio, que sempre acompanhou minha vida acadêmica, apresentando o estudo das ostras como questão de pesquisa relevante na engenharia de pesca. Obrigado pelo apoio e suporte fundamentais em mais essa etapa.

A professora Lígia Tchaika pela generosidade de me “adotar” em seu grupo de pesquisa, compartilhando conhecimento, apoio técnico e pelo carinho e preocupação demonstrada comigo nessa jornada.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científica do Maranhão (FAPEMA) pela concessão de bolsa.

Aos meus familiares, Maria do Carmo Prazeres Silva, Adriana Prazeres Paixão e Julianna Kusano Robattini, por me apoiarem incondicionalmente nesse momento e sempre.

Ao grupo do GGC, em especial a Elidy e Denise Rodrigues pelas tardes de trabalho incansáveis no laboratório.

Ao grupo do laboratório GENBIMOL, em especial a Marcelo Ventura, Ana Priscila e Renato Lima pela ajuda fundamental na construção do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação de Recursos Aquáticos e Pesca por todos os ensinamentos transmitidos durante o curso.

RESUMO

As ostras nativas do Brasil possuem uma ampla distribuição de modo a ocorrer em praticamente toda a extensão do litoral, presas aos substratos como raízes e rochas na zona intertidal. As espécies do gênero *Crassostrea*, têm como característica a grande semelhança morfológica, o que gera uma dificuldade na diferenciação das espécies. Embora reconhecida a sua relevância econômica e ecológica, no Maranhão poucas trabalhos foram realizados no campo da identificação genética de ostras. O presente estudo teve por objetivo identificar quais espécies nativas estão presentes no Maranhão bem como sua distribuição ao longo do litoral. Para isso aplicou-se a metodologia DNA *Barcoding*, na qual utiliza-se um fragmento de aproximadamente 650 pares de bases do gene COI. As amostras foram obtidas durante um período de um ano (2014 -2015) em sete pontos do litoral maranhense. O DNA foi isolado usando-se o protocolo salino. Para uma primeira análise de diferenciação das espécies foi aplicado à metodologia de PCR Multiplex. O isolamento e amplificação da região genômica foi realizado também através da PCR utilizando-se os *primers* universais. Os produtos das PCRs foram sequenciados e a análise dos dados foi realizada em softwares específicos. O PCR Multiplex revelou dois padrões de banda característico das espécies *Crassostrea gasar* e *Crassostrea rhizophorae* em um total de 130 amostras analisadas. No sequenciamento de 98 amostras obteve-se fragmentos do gene COI de 695pb para *C. gasar* e de 640 pb para *C. rhizophorae*. Na análise do fragmento de *C. gasar* foram identificados 20 sítios polimórficos, 15 haplótipos e valores de diversidade haplotípica de 0,428 e nucleotídica de 0,002. Em *C. rhizophorae* foi observado oito sítios polimórficos, oito haplótipos e valores de diversidade haplotípica de 0,795 e nucleotídica de 0,002. A árvore haplotípica agrupou fortemente as duas espécies em clados diferentes com 100% de *bootstrap*. As divergências intraespecíficas foram de 0,2% para ambas as espécies, enquanto que a interespecífica foi de 23,6%. Quando comparado com as sequências presentes no BoldSystems à similaridade variou de 97,01 a 98,37 para *C. rhizophorae* e de 97,85 a 99,52 para *C. gasar*. Portanto, o *barcoding* foi eficaz em 100% das identificações de ostras do litoral maranhense.

Palavras-chave: *Crassostrea*, DNA Mitoconrial, COI, Maranhão.

ABSTRACT

The native oysters of Brazil have a wide distribution occupying practically the entire coast, attached to substrates as mangrove roots and rocks in the intertidal zone. The species of the genus *Crassostrea* are characterized by a great morphological similarity, which creates a difficulty in the differentiation of species. While recognized its economic and ecologic importance in Maranhao state, few studies have been conducted in the area of genetic identification of oysters. The present study aimed to identify which native species of oysters are present in Maranhao state and its distribution along the coastline. For this purpose was used the DNA *barcoding* methodology, which uses a fragment of approximately 650 pairs of bases of the COI gene. Samples were taken over a period of one year (2014-2015) in seven localities of the Maranhao state coast. DNA was isolated using the saline protocol. For a first analyses of species differentiation was applied the multiplex PCR methodology. The isolation and amplification of the genomic region was performed by PCR using universal primers. Products of PCR were sequenced and the data analysis was performed on specific software. The Multiplex PCR revealed two band patterns characteristic of the species *Crassostrea gasar* and *Crassostrea rhizophorae* in a total of 135 samples. The sequencing of 98 samples obtained COI gene fragments of 695bp to *C. gasar* and of 640bp to *C. rhizophorae*. In the analysis of *C. gasar* fragments were identified 20 polymorphic sites, 15 haplotypes and values of haplotype diversity of 0.428 and nucleotide diversity of 0.002. For *C. rhizophorae* were identified 8 polymorphic sites, 8 haplotypes and values of haplotype diversity of 0.795 and nucleotide diversity of 0.002. The haplotype tree tightly grouped two species in different clades with 100% bootstrap. The intraspecific diversity was 0.2% for both species whereas the interspecific was 23.6%. When compared with sequences presents in the BoldSystems the similarity ranged from 97.1 to 98.37 for *C. rhizophorae* and 97.85 to 99.52 for *C. gasar*. Therefore, the barcoding was 100% effective in the identification of the native oysters of the Maranhao coast.

Key-words: *Crassostrea*, mitochondrial DNA, COI, Maranhao.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplar de ostra do gênero <i>Crassostrea</i>	16
Figura 2- Setores do litoral do Maranhão: (1) Golfão maranhense; (2) Litoral oriental; (3) Litoral ocidental; (4) Baixada maranhense e (5) Parque Estadual Marinho do Parcel.	22
Figura 3- Mapa dos pontos de coletas de exemplares de ostras no litoral do Maranhão.	23
Figura 4- Ilustração do esquema adotado para o tombamento das amostras de ostras coletadas no litoral do Maranhão no período de 2014 a 2015.....	24
Figura 5- Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio mostrando as ampliações gerada pelo PCR Multiplex (poço A, <i>Crassostrea gigas</i> ; poço B, <i>Crassostrea sp.</i> Canela; poço C e D, <i>C. gasar</i> ; poço E e F, <i>C. rhizophorae</i>)...27	
Figura 6- Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio mostrando as ampliações obtidas pelo PCR Multiplex (Amostras de São José de Ribamar e Paço do Lumiar: 1 - 4 correspondem a espécie <i>C. rhizophorae</i> ; Amostras de Carutapera, Cururupu, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia	31
Figura 7- Composição média de nucleotídeos baseada em sequências do gene COI de ostras do gênero <i>Crassostrea</i> do litoral do Maranhão.	33
Figura 8- Número de transição (s) e transversão (v) versus divergência genética de sequências do gene COI em ostras do gênero <i>Crassostrea</i>	34
Figura 9- Rede de haplótipos de <i>C. rhizophorae</i> com base no gene COI. A população de Paço do Lumiar está representada pela cor vermelha e a população de São José de Ribamar pela cor azul.	36
Figura 10- Rede de haplótipos com base no gene COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência com que o haplótipo ocorreu na população. Nas	

representações por cores de cada população, amarelo = Cururupu; vermelho = Tutóia, azul escuro = Primeira Cruz; verde = Raposa; azul claro = Carutapera.

..... 41

Figura 11- Árvore de haplótipos de agrupamento de vizinhos (NJ) utilizando o modelo K2P baseada em sequências do gene COI em ostras do gênero *Crassostrea*. Os números dos nós representam os valores de bootstrap (1000 réplicas). CAR = Carutapera, CUR= Cururupu, PC= Primeira Cruz e TUT = Tutóia, SJR= São José de Ribamar e PL= Paço do Lumiar..... 44

Figura 12- Árvore de haplótipos de agrupamento de vizinhos (NJ) utilizando o modelo K2P baseada em sequências do gene COI em ostras do gênero *Crassostrea*. Os números dos nós representam os valores de bootstrap (1000 réplicas). CAR = Carutapera, CUR= Cururupu, PC= Primeira Cruz e TUT = Tutóia, SJR= São José de Ribamar e PL= Paço do Lumiar..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de amostras de ostras obtidas por ponto de coleta do litoral maranhense no período de 2014 à 2015 .	25
Tabela 2- Descrição do padrão das ampliações de quatro espécies do gênero <i>Crassostrea</i> geradas pelo método de PCR Multiplex	26
Tabela 3- Número de amostras por localidade de coleta testadas e amplificadas por meio do PCR Multiplex em ostras do gênero <i>Crassostrea</i> do litoral maranhense,	30
Tabela 4- Diversidade molecular em ostras <i>Crassostrea rhizophorae</i> baseado em 640 pb do gene COI.	35
Tabela 5- Haplótipos de <i>C. rhizophorae</i> com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no fragmento de 640 pb do gene COI.	35
Tabela 6- Diversidade molecular em ostras <i>Crassostrea gasar</i> baseado em 695 pb do gene COI.	37
Tabela 7- Haplótipos de <i>C. gasar</i> com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no fragmento de 695 pb do gene COI.	38
Tabela 8- Divergência genética (K2P) intra e interespecífica de ostras do gênero <i>Crassostrea</i> do litoral do Maranhão.	43
Tabela 9- Matriz de distância genética (K2P) entre os haplótipos de ostras a obtidas partir de sequências do gene COI	44
Tabela 10- Percentual de similaridade genética obtida por comparações das sequências de COI no BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) para <i>C. rhizophorae</i> .	46

Tabela 11- Percentual de similaridade genética obtida por comparações das sequências de COI no BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) para *C. gasar*. 46

Tabela 12- Percentual de similaridade genética obtida por comparações das sequências de COI no BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) para *C. brasiliensis*. 47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 Biologia das ostras.....	16
2.2 Estudos taxonômicos de ostras na costa brasileira	17
2.3 Cultivo de ostras nativas e obtenção de sementes	18
2.4 Marcadores moleculares	19
2.4.1 PCR multiplex	19
2.4.2 DNA barcode	19
2.5 Barcode de ostras nativas aplicados ao desenvolvimento da ostreicultura no Maranhão.....	20
3 OBJETIVOS	21
3.1 Geral	21
3.2 Específicos.....	21
4 METODOLOGIA	22
4.1 Caracterização da área de estudo	22
4.2 Coletas.....	23
4.3 Extração de DNA	25
4.4 PCR multiplex	26
4.5 Amplificação do COI	27
4.6 Sequenciamento do DNA.....	28
4.7 Análise dos dados.....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Uso da ferramenta PCR Multiplex na identificação de espécies de ostra do litoral do Maranhão	30
5.2 Identificação molecular de ostras nativas do Maranhão utilizando o gene COI	33
6. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	

1. INTRODUÇÃO

As ostras têm desempenhado um importante papel no cenário da pesca e aquicultura brasileira. A ostreicultura além de ser um meio de produção de alimento de alto valor nutritivo devido ao teor de minerais (fósforo, cálcio, ferro e iodo), vitaminas (A, B1, B2, C e D), glicogênio e proteínas (WAKAMATSU, 1973), representa uma alternativa de atividade social e econômica para comunidades pesqueiras.

As ostras nativas do Brasil pertencem ao gênero *Crassostrea* (SACCO, 1897) e possuem uma ampla distribuição de modo a ocorrer em praticamente toda a extensão do litoral brasileiro, presas aos substratos como raízes e rochas na zona intertidal (NASCIMENTO, 1991; RIOS, 1994).

Alguns autores reconhecem a dificuldade de diferenciar alguns grupos de ostras em função das semelhanças morfológicas entre os diferentes táxons (ABSHER, 1989; NASCIMENTO, 1991; RIOS, 1994; IGNÁCIO et al., 2000). Para Gunter (1950) quanto à forma da concha, a ostra é um dos bivalves mais variados do mundo. A identificação morfológica a partir das conchas de ostras *Crassostrea* em nível específico é difícil, devido à influência ambiental intensa no desenvolvimento delas (LAM & MORTON, 2003).

Para Melo et al., (2010), no Brasil existem três espécies nativas de *Crassostrea*. São elas: a *Crassostrea gasar* (ANDANSON 1857), *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) e *Crassostrea sp. Canela*, além de uma invasora, a *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793). Os indivíduos do gênero *Crassostrea* (SACCO, 1897) são os mais cultivados em todo o mundo, em função do domínio das técnicas de criação já serem bem estabelecidas e serem economicamente viável (MANZONI & SCHMITT, 2006). De acordo com Christo (2006), o alto valor alimentício da “carne” e a possibilidade do uso da concha para produtos industriais, faz com que se considere, dentro do grupo das ostras, esse gênero um dos mais importantes.

Embora as técnicas de cultivo de ostras sejam bem difundidas também no Brasil, o gargalo dessa atividade ainda se concentra no modo de obtenção desses organismos. A produção de sementes de ostras em laboratório

representa uma tecnologia cara e de difícil acesso (TURECK, 2010). A alternativa mais viável de obtenção dessas ostras para os produtores tem sido retirar esse recurso em ambientes naturais, com a coleta de juvenis ou então pelo uso de coletores artificiais para a captação de sementes. Entretanto ambas as formas de recrutamento inviabilizam identificar a qual espécie corresponde os indivíduos coletados (MACCACHERO et al., 2007).

O recrutamento de mais de uma espécie de ostras do gênero *Crassostrea*, muitas das vezes, representa um problema para o rendimento do cultivo. Embora as espécies nativas *C. gasar* e *C. rhizophorae* apresentem potencial para a ostreicultura, a primeira tem demonstrado possuir um melhor desempenho de crescimento em cativeiro (CHRISTO, 2006). Para Absher (1989) o cultivo da *C. rhizophorae* pode não ser tão atrativo comercialmente em função da sua baixa taxa de crescimento.

Reconhecendo as dificuldades de se identificar as espécies de ostras nativas brasileiras por um padrão morfológico, têm se recorrido, com sucesso, ao uso de protocolos baseados em biologia molecular para a elucidação das questões taxonômicas e de distribuição das diferentes espécies do gênero *Crassostrea* (IGNACIO et al., 2000; LAPÈGUE et al., 2002; PIE et al., 2006; VARELA et al. 2007; REECE et al., 2008, MELO et. al 2010, TUREK, 2010).

O segmento de aproximadamente 650 pares de bases da extremidade 5' do gene mitocondrial Citocromo *c* oxidase subunidade I (COI) vem sendo adotado como um sistema universal de identificação adequado para a maioria das espécies animais, incluindo as ostras do Atlântico. As espécies são geralmente representadas por uma sequência particular ou por um grupo de sequências muito similares deste fragmento gênico, o qual é conhecido como o "DNA barcode" (Hebert et al.,2003). Essencialmente, os usuários da metodologia de *DNA barcoding* pretendem tornar possível a atribuição de indivíduos a espécies e facilitar a descoberta de novas espécies (MORITZ & CICERO, 2004).

Por outro lado, embora os estudos baseados no uso de marcadores moleculares tenham conseguido dar respostas importantes, algumas implicações como a necessidade de pessoal treinado para a execução, etapas demoradas e de alto custo, limitam o uso dessas técnicas em aplicações voltadas para respostas rápidas em campo ou de monitoramento contínuo (LUDWIG et al.,

2011), e que possam ser aproveitadas efetivamente pelas comunidades pesqueiras que trabalham com o cultivo e a pesca de ostras.

Melo et al., (2013), desenvolveram uma técnica de identificação simultânea de mais de uma espécie de ostras por meio da metodologia de PCR multiplex. Nesse protocolo são usados *primers* desenhados especificamente para diferenciar quatro espécies de ostra. Essa metodologia proporciona uma resposta de identificação mais rápida e com um menor custo financeiro.

Ignacio et al., (2000), defende que o desenvolvimento de trabalhos com ostras ganha uma importância ainda maior quando os resultados obtidos podem ser incorporados de modo funcional na dinâmica do produtor, na medida em que há uma conexão entre os resultados dos trabalhos científicos com o campo. Trabalhos que propõe identificar, determinar e monitorar as espécies de ostras nativas torna possível o desenvolvimento de planos de gestão desse recurso pesqueiro de maneira mais efetiva (MELO et al., 2010).

No Maranhão, as ostras são encontradas em toda sua extensão litoral, em bancos naturais distribuídos em ambientes de estuários, fixados em raízes de plantas do mangue, e em regiões de praias, fixadas em costões rochosos. Entretanto a falta de estudos mais detalhados sobre a identificação das espécies nativas, distribuição nos diferentes habitats e biologia reprodutiva, representam um grande entrave para o desenvolvimento da ostreicultura assim como a adoção de melhores planos de gestão desse recurso voltados para a pesca.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Biologia das ostras

Ostras são moluscos bivalves (Figura 1) pertencentes à família Ostreidae (RIOS, 1994). Abaixo está descrito a classificação taxonômica das ostras do gênero *Crassostrea*:

REINO: *Animalia*

FILO: *Mollusca*

CLASSE: *Bivalvia*

ORDEM: *Ostreoida*

FAMILIA: *Ostreidae*

GENERO: *Crassostrea*

(SACCO, 1897)

Figura 1- Exemplo de ostra do gênero *Crassostrea*



Fonte: Gofas, Serge. Coleção MNHN, Paris (1982).

Quando adultos tornam-se sésseis aderindo-se a substratos firmes formando bancos naturais. Possuem corpo mole que é protegido dentro de uma concha de cálcio, fechada e regulada por fortes músculos adutores (YONGE, 1960; GALTSOFF, 1964).

São encontradas desde as zonas de baixa salinidade, até áreas altamente salinas (MALOUF & BREESE, 1977; AKABOSHI, 1979). Essas características permitiram sua ampla distribuição ao longo da costa brasileira, sendo encontradas em ambientes estuarinos, presas a substratos duros como raízes do manguezal na zona entre marés até costões rochosos (NASCIMENTO, 1991).

2.2 Estudos taxonômicos de ostras na costa brasileira

O estudo da classificação taxonômica das ostras nativas brasileiras ainda hoje é elemento de divergência entre vários trabalhos e autores. De acordo com Lapègue et al., (2002) para o Atlântico Sul foram descritas 3 espécies de *Crassostrea*: a *Crassostrea gasar* (ADANSON, 1757), *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) e a *Crassostrea brasiliiana* (LAMARCK, 1819).

Para Singarajah (1980) e Rios (1994), apenas uma espécie era apontada como nativa, sendo considerado *C. brasiliiana* sinônimo de *C. rhizophorae*. Porém Ignacio et al., (2000), foram um dos primeiros que apresentaram evidências genéticas que indicavam uma diferenciação entre as espécies *C. brasiliiana* e a *C. rhizophorae*.

No estudo de investigação sobre a distribuição de ostras do mangue na região sul-americana Lapègue et al., (2002), constataram a presença da *Crassostrea gasar* em vários pontos da costa brasileira, divergindo dos resultados encontrados posteriormente por Pie et al., (2006), que evidenciavam a presença de apenas duas espécies já descritas como nativas, a *Crassostrea brasiliiana* e a *Crassostrea rhizophorae* e uma invasora a *Crassostrea gigas*.

Varela et al., (2007), observaram que a sequência do gene 16S rRNA depositado no Genbank por PIE et al., (2006), para *C. brasiliiana* é idêntica a de *C. gasar* estudada por Lapègue et al., (2002), sugerindo assim que se tratava de uma única espécie.

Posteriormente Melo et al., (2010), identificaram a presença de três espécies do gênero *Crassostrea*: *C. gasar*, *C. rhizophorae* e *Crassostrea* sp. Canela. Esse

amplo estudo avaliou vários pontos da costa brasileira incluindo dois municípios do estado do Maranhão, Tutóia e Humberto de Campos.

Outras espécies também vêm sendo citadas como possivelmente nativas do Brasil como o caso da *Crassostrea virginica* (GMELIN, 1791) e a *Crassostrea paraibensis*. Porém de acordo com o estudo de Lazoski et al., (2011), a partir de dados moleculares, confirmou-se que as espécies *Crassostrea paraibanensis* e *Crassostrea brasiliiana* são sinônimos juniores de *Crassostrea gasar*, nome o qual, a partir de agora deverá ser usado para denominar as ostras da América do Sul e África.

Baseado em uma metodologia de avaliação morfológica Amaral e Simone (2014), realizaram uma revisão do gênero *Crassostrea* de ocorrência no Brasil, onde apontaram que ainda hoje boa parte da classificação taxonômica das ostras é realizada de modo equivocado. De acordo com os resultados desse trabalho as espécies nativas brasileiras são a *C. brasiliiana* e *C. mangle*, até então desconhecida por outros trabalhos. Segundo esses autores a espécie *C. gasar* não é sinonímia de *C. brasiliiana*, como afirmava VARELA et al. (2007), e que portanto *C. gasar* não seria uma espécie nativa.

Os resultados divergentes encontrados ao longo da história dos estudos de identificação e classificação de ostras no Brasil abrem margem para o desenvolvimento de novos trabalhos que se proponham a contribuir com a discussão e elucidação de incertezas taxonômicas nestas espécies.

2.3 Cultivo de ostras nativas e obtenção de sementes

As ostras do gênero *Crassostrea*, *Crassostrea rhizophoera* (Guilding, 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (LAMARCK, 1819), são exploradas rudimentarmente pelas comunidades tradicionais, sem a preocupação da utilização de medidas de manejo que garantam um uso sustentável (ARAÚJO, 2001). Sendo que para essas comunidades a ostra nativa é um produto de grande importância devido a seu valor comercial. Técnicas sustentáveis, como a ostreicultura, são uma alternativa economicamente viável para essas comunidades que necessitam deste recurso.

Porém, antes de se iniciar qualquer atividade de cultivo de ostras é importante conhecer a espécie de ostra nativa presente no ambiente onde se pretenda instalar

o cultivo, bem como qual a espécie da semente que será utilizada. A semente é o principal insumo da ostreicultura e pode ser obtido diretamente do ambiente natural mediante a utilização de coletores artificiais ou através da compra de laboratório que irá realizar a reprodução controlada.

2.4 Marcadores moleculares

2.4.1.1 PCR multiplex

A Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex é uma variante da PCR padrão, onde é possível obter ampliações de mais de uma região do DNA de modo simultâneo (HENEGARIU et al., 1997).

A análise dos resultados baseia-se na comparação dos fragmentos de DNA gerados pela reação e a observação em gel de agarose de bandas com peso molecular diferentes indicando a existência de mais de uma espécie.

2.4.1.2 DNA barcode

Ao longo da história da genética, vários genes diferentes têm sido utilizados como marcadores moleculares para o estudo da biodiversidade, tanto os mitocondriais (16S-rDNA e o Citocromo *b*) quanto os nucleares (ITS1-rDNA, o ITS2-rDNA e o 18S-rDNA) (HAJIBABAEI et al., 2007). Entretanto, visando o desenvolvimento de um sistema unificado de identificação molecular, um marcador padrão deve ser estabelecido para que os dados obtidos sejam comparáveis dentro e entre espécies (WARD, 2009).

Hebert et al., (2003), propuseram uma metodologia padrão com propósito de identificar e descrever a biodiversidade global através de uma porção do gene mitocondrial citocromo c oxidase subunidade I (COI).

O termo DNA *barcode* é uma analogia ao código de barras universal de produtos convencionais, que serviria como um código de identificação único para cada espécie. O COI é parte do complexo gênico codificante de proteínas envolvidas no transporte elétrico e catálise da cadeia respiratória em eucariotos. O marcador mitocondrial COI permite o estudo de variabilidade genética em população pela sua universalidade e importância evolutiva (HEBERT et al., 2003).

O uso dessa metodologia, denominada “*DNA barcoding*”, ganhou muita relevância com a criação em 2004 do “Consortium for the Barcode of Life (CBOL)” cuja meta é a criação de um banco de dados de códigos de barra, sequências parciais de DNA do gene COI, da biodiversidade global, com o objetivo de facilitar o processo de automação da identificação das espécies (HENRIQUES, 2010).

2.5 Barcode de ostras nativas aplicados ao desenvolvimento da ostreicultura no Maranhão

A grande extensão do litoral brasileiro favorece o desenvolvimento de atividades aquícolas como a ostreicultura. Atualmente, as regiões sul e sudeste do país apresentam sistemas de cultivo de ostras bem desenvolvidos. Os investimentos tecnológicos e em estudos científicos possibilitaram o domínio da reprodução regular de ostras em laboratório e a inserção de uma espécie exótica, *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1792), de grande aceitação comercial e de boa adaptação às condições ambientais dessas regiões. Entretanto essa espécie originária do oceano pacífico não se adapta bem às regiões de clima quente como o do Maranhão.

Vários esforços foram realizados para desenvolver o cultivo de ostras nativas em nível comercial ao longo do litoral brasileiro, porém poucos obtiveram sucesso, principalmente pela dificuldade na obtenção e identificação de sementes das espécies com potencial para maricultura (TURECK, 2010).

A maneira mais acessível para obtenção do principal insumo da ostreicultura, que são as sementes de ostras, é a utilização de coletores artificiais. Tal metodologia embora tenha sua eficiência comprovada a partir de vários estudos realizados (SOUZA, 1999; NALESSO, 2008) não indica se uma ou mais espécies está sendo capturada.

Nesse contexto, o desenvolvimento de códigos de barras para as ostras nativas do Maranhão serviria como base para os manejos a serem adotadas para desenvolver a ostreicultura no estado.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Gerar dados de DNA *barcodes* para espécies de ostras do litoral do Maranhão de modo a contribuir para o desenvolvimento da ostreicultura e dos planos de manejo desse recurso.

3.2 Específicos

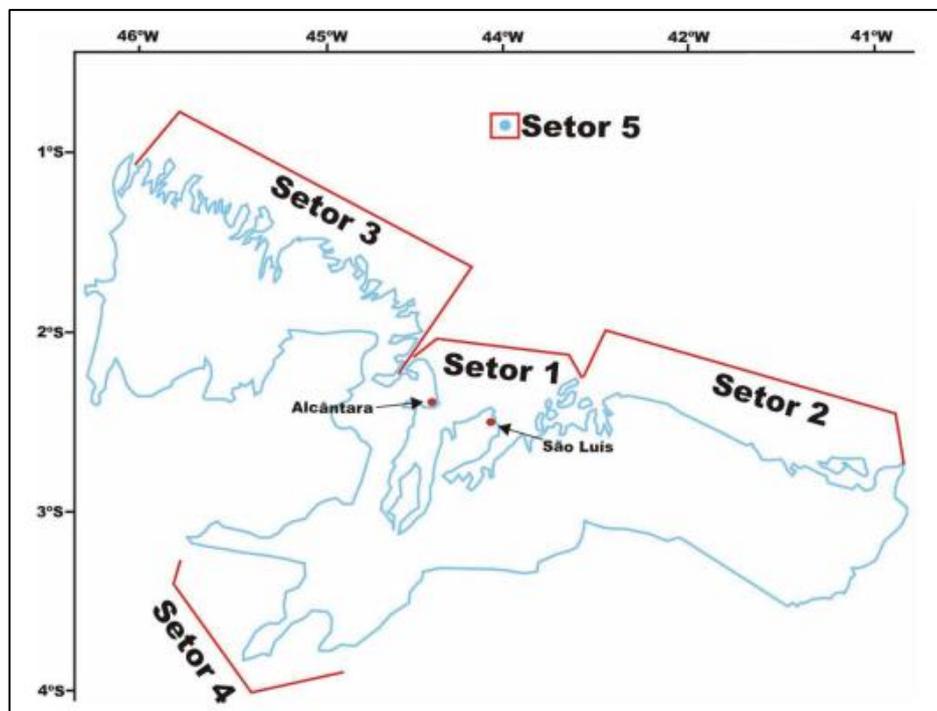
- Sequenciar o fragmento *barcode* do gene mitocondrial COI das ostras coletadas no litoral do Maranhão;
- Avaliar a utilização destas sequências na discriminação das diferentes espécies analisadas;
- Determinar os níveis de variabilidade e distância genética das populações analisadas.

4 METODOLOGIA

4.1 Caracterização da área de estudo

O litoral maranhense possui uma extensão de aproximadamente 640 km, sendo o 2º maior litoral entre os estados brasileiros. Em função do tamanho, sua faixa litorânea é dividida em cinco setores: (1) Golfão maranhense; (2) Litoral oriental; (3) Litoral ocidental; (4) Baixada maranhense e (5) Parque Estadual Marinho do Parcel Manuel Luís (ZMC, 2003) (Figura 2).

Figura 2-Setores do litoral do Maranhão: (1) Golfão maranhense; (2) Litoral oriental; (3) Litoral ocidental; (4) Baixada maranhense e (5) Parque Estadual Marinho do Parcel.

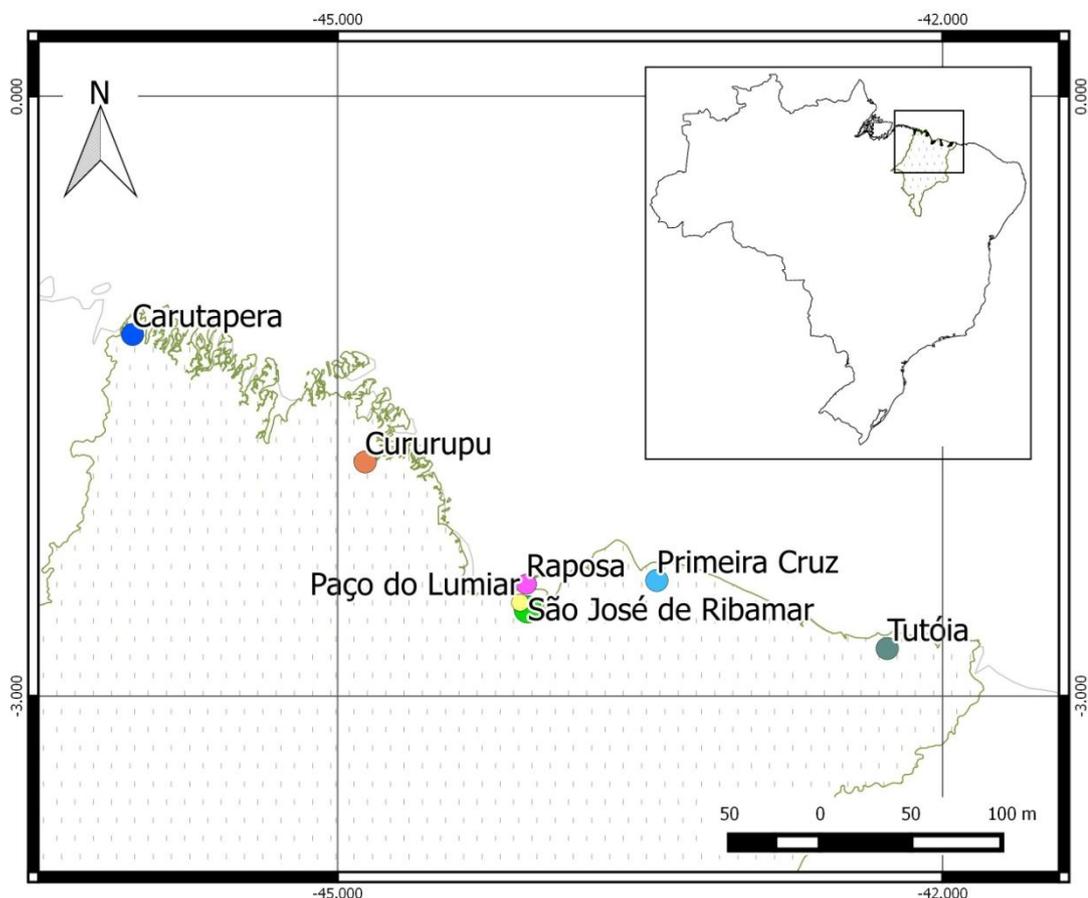


Fonte: (ZMC, 2003)

4.1 Coletas

As amostras de ostras foram obtidas durante o período de um ano (2014-2015) em sete pontos do litoral maranhense, sendo dois pontos referentes ao Litoral Ocidental do estado, dois pontos no Litoral Oriental e três pontos na região do Golfão Maranhense (Figura 3). Desse modo os municípios correspondentes aos pontos de coletas foram: Carutapera, Cururupu, São José de Ribamar, Paço do Lumiar, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia.

Figura 3- Mapa dos pontos de coletas de exemplares de ostras no litoral do Maranhão.



Fonte: Elaborado pelo autor

Os exemplares utilizados para análise molecular foram capturados em diferentes tipos de habitats como em costões rochosos e em ambientes de mangue. As amostras foram congeladas à -20°C e depositadas na Coleção de Tecidos e DNA da Fauna Maranhense –COFAUMA, da Universidade estadual do Maranhão e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Genética e Patologia da

Universidade Estadual do Maranhão, onde foi separado o músculo adutor e colocado em álcool absoluto (Figura 4). O tombo adotado para o tecido das ostras também é correspondente ao da concha de cada exemplar utilizado.

Figura 4- Ilustração do esquema adotado para o tombamento das amostras de ostras coletadas no litoral do Maranhão no período de 2014 a 2015.



Fonte: Elaborado pelo autor

Ao todo foram coletados 145 amostras de ostras de todos os pontos selecionados do litoral maranhense (Tabela 1).

Tabela 1- Número de amostras de ostras obtidas por ponto de coleta do litoral maranhense no período de 2014 à 2015 .

LOCALIDADE	Nº DE INDIVÍDUOS	GEOREFERÊNCIA	
		S	W
Raposa	20	2° 26' 25.186"	44° 3' 50.613"
São José de Ribamar	20	2° 33' 58.911"	44° 3' 23.519"
Paço do Lumiar	25	2° 31' 57.309"	44° 5' 40.923"
Primeira Cruz	20	2° 25' 18,3"	43° 25' 01.1"
Cururupu	20	1° 47' 17,8"	44° 44'47.6"
Carutapera	20	1° 11' 29.097"	46° 1' 1.074"
Tutóia	20	1° 11' 29.097"	46° 1' 1.074"
TOTAL	145	-----	

Fonte: Elaborado pelo autor

4.2 Extração de DNA

O DNA total foi isolado a partir de tecido muscular, utilizando-se o protocolo salino padronizado por Medrano (1990). Este protocolo consiste nas seguintes etapas:

- Adicionou-se 20 mg de tecido muscular em um microtubo de 1,5 mL;
- O tecido foi lavado duas vezes com 60 mL de água destilada;
- Adicionou-se 550 mL de tampão de lise e 11mL de proteinase K;
- As amostras foram incubadas overnight a 37 °C;
- Adicionou-se 350 mL de NaCl 5M;
- As amostras foram centrifugadas por 30 min a 13.000 rpm;
- Dividiu-se o sobrenadante em duas alíquotas de 375mL;
- Adicionou-se 900 mL de etanol absoluto gelado em cada amostra;
- As amostras foram incubadas a -20 °C durante duas horas;
- Centrifugou-se por 30 minutos a 13.000 rpm;

- Foi descartado o sobrenadante de todas as amostras;
- O pellet foi lavado com 1mL de etanol 70%;
- As amostras foram novamente centrifugadas, agora à 6000 rpm por 5 minutos;
- O material foi levado a estufa a 37 °C para secagem total;
- No final foi adicionado 50 mL de TE 1x em cada tubo;
- O material foi incubado por 3 horas a 37 °C e posteriormente armazenado no freezer.

4.3 PCR multiplex

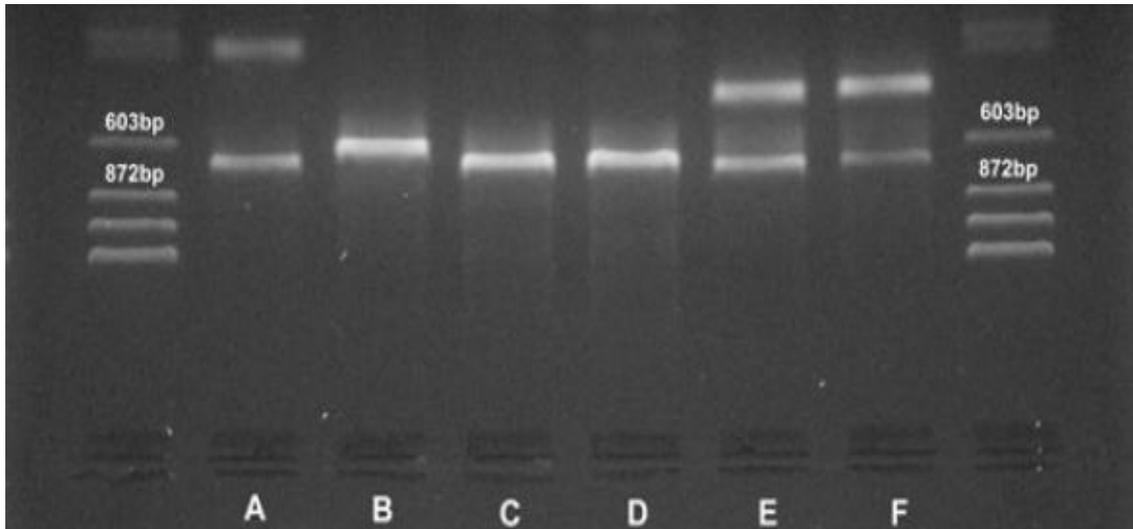
Para a identificação prévia das espécies foi realizado um PCR multiplex como descrito por Melo et al., (2013). Com esta técnica é possível identificar e diferenciar quatro espécies de ostras do gênero *Crassostrea* (*C. gasar*, *C. rhizophorae*, *Crassostrea* sp. Canela e *C. gigas*), utilizando duas regiões do DNA (CO1 e ITS1) para a diferenciação dos exemplares analisados. O padrão de bandas geradas que caracteriza cada espécie é descrito na (Tabela 2) e demonstrado na (Figura 5).

Tabela 2- Descrição do padrão das amplificações de quatro espécies do gênero *Crassostrea* geradas pelo método de PCR Multiplex descrita por MELO et. al (2013).

ESPÉCIE	PADRÃO DE BANDAS
<i>C. rhizophorae</i>	2 (sendo 377 pb para a região CO1 e outra de 718 pb para ITS1)
<i>C. gigas</i>	2 (sendo uma de 236 pb para a região do CO1 e outra de 718 pb para ITS1)
<i>C. gasar</i>	1 (718 pb para a região ITS1)
<i>Crassostrea</i> sp. Canela	1 (621 pb para a região ITS1)

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5- Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio mostrando as amplificações gerada pelo PCR Multiplex (poço A, *Crassostrea gigas*; poço B, *Crassostrea* sp. Canela; poço C e D, *C. gasar*; poço E e F, *C. rhizophorae*) (MELO et al., 2013).



Fonte: MELO (2013).

O programa usado consistiu dos seguintes ciclos de temperatura:

- 94°C por três minutos, 40 ciclos de 94°C por um minuto, 60°C por um minuto, 72°C por dois minutos e uma extensão adicional de sete minutos à 72°C.

Os resultados da PCR foram visualizados em uma corrida de eletroforese horizontal a 50mV em 80 minutos utilizando gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio.

4.4 Amplificação do COI

O isolamento e amplificação da região genômica, foi realizado através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para a espécie *C. rhizophorae* foram utilizados os *primers* de FOLMER et al., (1994). Para *C. gasar* utilizou-se os *primers* descritos por MELO et al., (2010). O Mix seguiu os seguintes padrões de volume e concentração:

- 2,5 µl de tampão 10x; 0,6 µl de MgCl₂ (25 mM);
- 4 µl de dNTPs (1,25 mM);
- 0,2 µl de taq DNA polimerase (5 U/µl - Invitrogen);
- 0,25 µl para cada primer (2 mM);
- 0,25 µl do primer L;
- 0,25 µl do primer H ;
- 14,8 µL de água destilada estéril para completar o volume final da

reação;

Os seguintes ciclos termais foram utilizados:

- Para *C. rhizophorae*: desnaturação inicial por um minuto a 95°C, 35 ciclos (15 segundos a 95°C, 15 segundos a 54°C e 30 segundos a 72°C); e uma extensão final por dois minutos a 72°C;
- Para *C. gasar* desnaturação inicial por um minuto a 95°C, 35 ciclos (95°C por um minuto, 47°C por um minuto, 72°C por 1:30 minuto) e uma extensão final por dois minutos a 72°C.

4.5 Sequenciamento do DNA

Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de Agarose a 1% e purificados com ExoSAP-IT segundo o protocolo sugerido pelo fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada pelo método de SANGER et al., (1977). As amostras foram precipitadas em EDTA-Acetato de Sódio-Etanol e em seguida submetidas à análise no sequenciador de DNA automático (ABI 3500/Life Technologies).

4.6 Análise dos dados

As sequências foram editadas e alinhadas com a ferramenta ClustalW (THOMPSON et al., 1994) no programa BIOEDIT, v 7.0.5.2, (HALL, 1999). A saturação dos dados foi testada utilizando-se o programa DAMBE (XIA & XIE, 2001).

A composição nucleotídica, matriz, médias de distância genética e análises filogenéticas foram geradas no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) utilizando-se o método de agrupamento de vizinhos, modelo Kimura-2-parâmetros (SAITOU; NEI, 1987). Para verificar a significância dos agrupamentos utilizou-se a análise de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). Para a análise da diversidade haplotípica e nucleotídica foi utilizado o programa DnaSP v5 (LIBRADO & ROZAS, 2009). A relação entre os haplótipos foi realizada por meio da construção de uma rede de haplótipos não enraizada, obtida através do programa NETWORK 4.5.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>) usando o método de mediam-joining (BANDELT et al., 1999). A identificação molecular a partir do gene COI foi realizada por comparação de sequências do presente estudo com dados disponíveis na plataforma bioinformática BOLDSYSTEMS (*Barcode of Life Data Systems*) (HEBERT, 2003). Foi incorporado ao banco de dados uma sequência do gene COI obtida do GenBank da espécie *Crassostrea* sp. Canela (HM003525) da região de Bragança-PA, utilizada como grupo externo. Sequências de *C. gasar* (HM 003499, HM003507, HM003515, HM3519) de Melo et al., (2010) e *C. brasiliiana* (FJ717640, FJ717651) de Lazoski et al., (2011) foram também incluídas no banco de dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Uso da ferramenta PCR Multiplex na identificação de espécies de ostra do litoral do Maranhão

As amostras de Carutapera, Cururupu, São José de Ribamar, Paço do Lumiar, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia foram testadas com o PCR Multiplex, totalizando 135 amostras (Tabela 3).

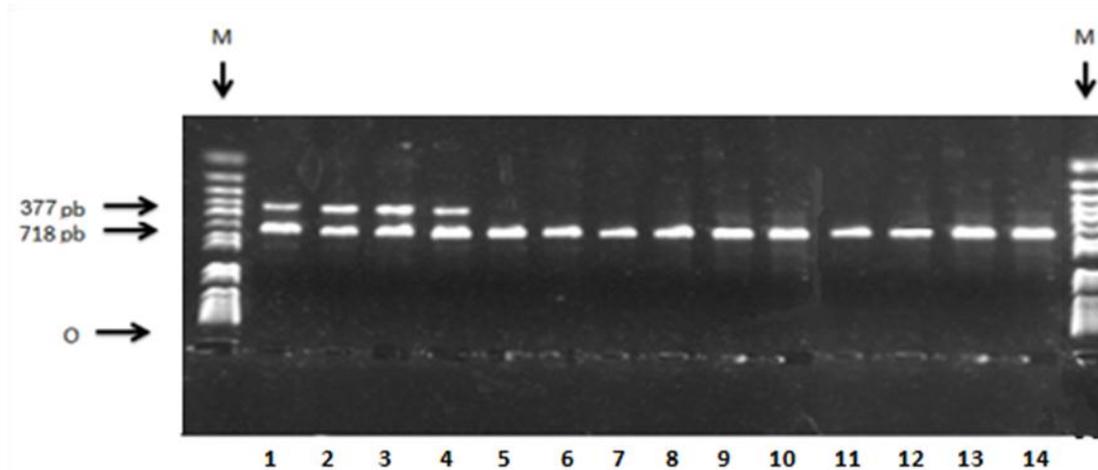
Tabela 3- Número de amostras por localidade de coleta testadas e amplificadas por meio do PCR Multiplex em ostras do gênero *Crassostrea* do litoral maranhense,

LOCALIDADES	<i>C. gasar</i>	<i>C. rhizophorae</i>	TOTAL
CARUTAPERA	20	-	20
CURURUPU	20	-	20
SÃO JOSÉ DE RIBAMAR	03	17	20
PAÇO DO LUMIAR	15	10	25
RAPOSA	10	-	10
PRIMEIRA CRUZ	20	-	20
TUTÓIA	20	-	20
TOTAL	108	27	135

Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados obtidos evidenciaram a ocorrência de duas espécies no litoral maranhense. Na análise das amplificações em gel de agarose foi possível observar padrões de bandas correspondentes às espécies *C. gasar* e *C. rhizophorae* (Figura 6). Nos municípios de Carutapera, Cururupu, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia foram obtidos amplificações com o padrão de banda única, indicando que a espécie presente é *C. gasar*, já que apenas a região de ITS 1 com 718 pb foi amplificada (Figura 6). Nas amostras dos municípios de São José de Ribamar e Paço do Lumiar foram obtidos dois padrões de banda, o de banda única característico de *C. gasar* e outro de banda dupla, sendo 377 pb para a região COI e 718 pb para ITS1, confirmando a presença da espécie *C. rhizophorae* nas localidades amostradas (Figura 6).

Figura 6- Gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio mostrando as amplificações obtidas pelo PCR Multiplex (Amostras de São José de Ribamar e Paço do Lumiar: 1 - 4 correspondem a espécie *C. rhizophorae*; Amostras de Carutapera, Cururupu, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia



Fonte: Elaborado pelo autor

Os resultados obtidos pelo PCR multiplex apontaram a ocorrência da *C. rhizophorae*, até então desconhecida nos domínios do estado, além da *C. gasar*, já citada por Lazoski et al., (2011). Melo et al., (2010) e De Paula et al., (2008). A certeza da existência de duas espécies no litoral maranhense, já confirmadas pelo sequenciamento de um fragmento do gene COI, reforçam a necessidade da seleção de pontos específicos na captação de sementes para o cultivo.

A hipótese de que as espécies *C. rhizophorae* e *C. gasar* possuíam distribuições diferentes nos ambientes aquáticos, como defendida por Christo (2006), que afirma que a espécie *C. rhizophorae* ocorre na região entre marés e que *C. gasar*, conhecida como “ostra-de-fundo”, ocorre no infralitoral, não é validada pelos resultados encontrados neste estudo. Nos municípios de São José de Ribamar e Paço do Lumiar foram encontradas as duas espécies co-habitando em um mesmo espaço. É importante ressaltar que as características desses dois pontos de coleta (São José de Ribamar e Paço do Lumiar) são bem diferentes, já que o primeiro é uma região de praia, com as ostras fixadas em estruturas de concreto e rochas, e o segundo caracteriza-se por ser um típico ambiente de estuário, com as ostras fixadas nas raízes das plantas. Entretanto ficou evidente que nesses dois pontos onde se identificou a presença dessas duas espécies houve uma superioridade

numérica da espécie *C. gasar* em ambiente de estuário e de *C. rhizophorae* em ambientes de praia.

Para Melo et al., (2010) a espécie *C. rhizophorae* tem sua distribuição a partir do município de Fortim-CE se estendendo até a região sul do Brasil, embora tenha sido identificado exemplares na região de Bragança-PA. Esses autores atribuem a presença dessa espécie, em apenas algumas praias de um município do Pará, às correntes oceânicas. Partindo desse pressuposto, no Maranhão, a presença dessa espécie pode estar associada a razões semelhantes. Entretanto os *gaps* existentes entre trechos muito extensos dessa espécie no litoral maranhense e a falta de uma avaliação direcionada sobre as correntes marítimas e as larvas de ostras, permitem que outros fatores devam ser levados em consideração, como por exemplo, período de reprodução de cada espécie, avaliação conjunta de resultados genéticos com parâmetros físico-químicos do ambiente e até mesmo o transporte de bivalves por meio de incrustação nos cascos de embarcações e das águas de lastro dos navios. A região do Golfão Maranhense, onde a espécie *C. rhizophorae* foi identificada, corresponde a uma área de grande movimentação naval. Para Ferreira (2004) é recorrente em ambientes costeiros o transporte de espécies incomuns a uma região por meio de água e sedimentos de lastro, água de porão e incrustações em partes da embarcação.

O litoral ocidental e oriental apresentaram grande potencial de desenvolvimento da atividade do cultivo, uma vez que foi identificada a presença de uma única espécie. Outro aspecto favorável é que a espécie em questão foi a *C. gasar*. Ainda que todas as espécies nativas de ostra possam ser cultivadas e comercializadas, a *C. gasar* é a que apresenta uma melhor taxa de crescimento, o que faz com que a opção do cultivo dessa espécie seja mais interessante (ABSHERS, 1989).

Embora o PCR Multiplex esteja padronizado para identificar até quatro espécies de ostras, duas dessas, *C. gigas* e *Crassostrea* sp. Canela, já era esperado que não fossem encontradas no litoral do Maranhão. Isso porque de acordo com Tureck (2010) a *C. gigas*, por ser uma espécie exótica da região do Indo-pacífico, não se adapta bem em regiões de temperaturas altas, como a que é característica do Maranhão. Enquanto que *Crassostrea* sp. Canela, até agora, parece ser uma espécie exclusivamente de região de Bragança-PA, que

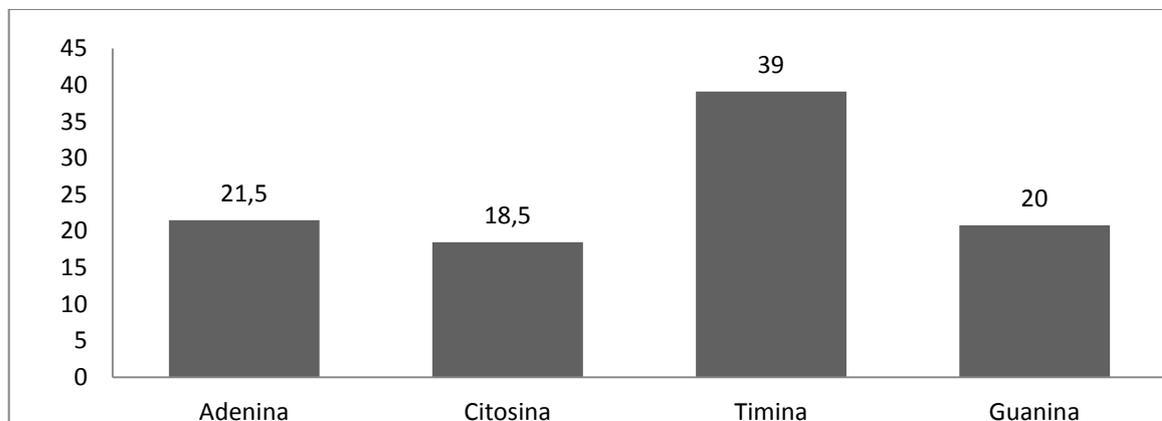
possivelmente por questões de barreiras naturais não se dispersou para outras áreas.

5.2 Identificação molecular de ostras nativas do Maranhão utilizando o gene COI

Um total de 98 sequências de um fragmento de gene COI foi obtido para as espécies de ostras do gênero *Crassostrea*, sendo 78 sequências correspondentes à espécie *C. gasar*, com um fragmento de 695 pb e 20 sequências à espécie *C. rhizophorae* com um fragmento de 640 pb.

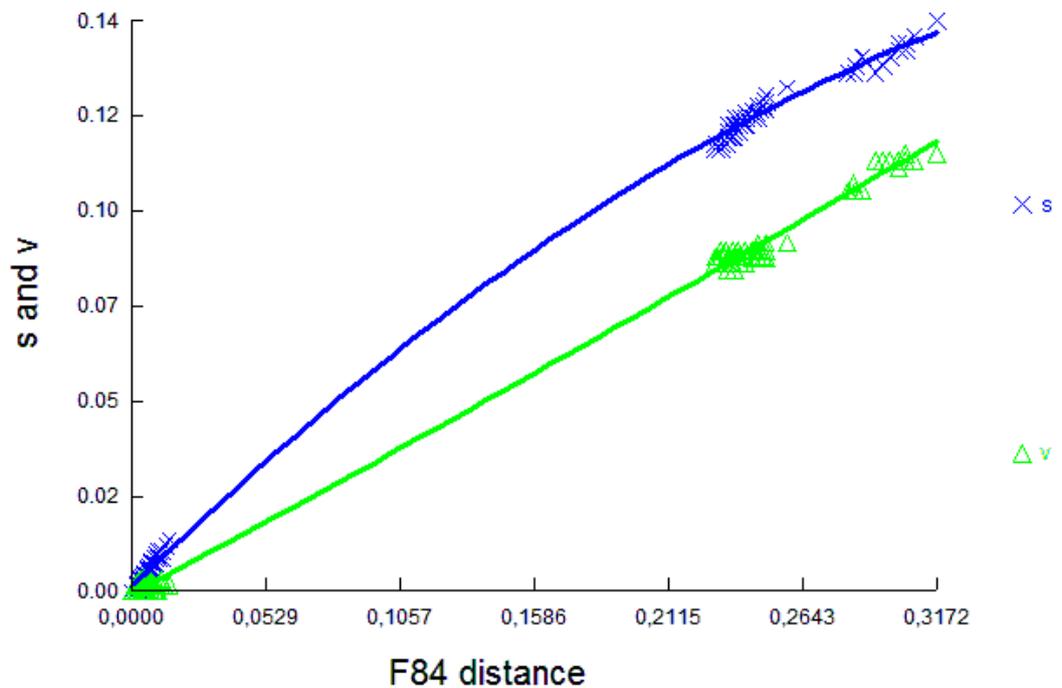
A composição nucleotídica do fragmento analisado foi de 20% Guanina, 19,5% Citosina, 21,5% Adenina e 39% Timina (Figura 7). O gráfico obtido com base na taxa de transição (s) e transversão (v) versus divergência genética gerada no programa DAMBE utilizando o algorítmico F84 mostrou que não houve saturação dos dados (Figura 8).

Figura 7- Composição média de nucleotídeos baseada em sequências do gene COI de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Maranhão.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8- Número de transição (s) e transversão (v) versus divergência genética de seqüências do gene COI em ostras do gênero *Crassostrea*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Oito haplótipos foram encontrados na análise conjunta das amostras de *C. rhizophorae*, com uma diversidade haplotípica (h) de 0,795 e nucleotídica (π) de 0,002. Quando analisado isoladamente cada população observou-se que os maiores valores de diversidade haplotípica ocorreram para as amostras de São José de Ribamar com $h = 0,933$ (Tabela 4). Valores semelhantes em populações agrupadas de *C. rhizophores* com COI na costa brasileira foram encontrado por Lazoski et al., (2011). Dentre os oito haplótipos encontrados, os haplótipos H1 e H3 foram os mais frequentes, ocorrendo nas duas populações com frequência de oito e cinco vezes, respectivamente. Foram observados quatro haplótipos exclusivos para a população de São José de Ribamar (H4, H5, H6 e H7) e um para população de Paço do Lumiar (H2). O haplótipo H8 ocorreu duas vezes e foi exclusivo da população de São José de Ribamar (Tabela 5).

A rede de haplótipos não enraizada mostrada na figura 9 ilustra a distribuição dos oito haplótipos obtidos para espécie *C. rhizophorae*. Os números representam a

posição das mutações que separam os haplótipos, e o tamanho dos círculos é proporcional à frequência com que estes ocorrem. Foi observada a existência de haplótipos compartilhados (H1 e H3) pelas duas localidades amostradas e haplótipos únicos.

Tabela 4- Diversidade molecular em ostras *Crassostrea rhizophorae* baseado em 640 pb do gene COI.

Populações	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
				H	π
Paço do Lumiar	10	3	02	0,600	0,001
São José de Ribamar	10	7	07	0,933	0,002
Populações agrupadas	20	8	08	0,795	0,002

N = número amostral **NH** = número de haplótipos **S** = sítios polimórficos **h** = diversidade haplotípica e **π** = diversidade nucleotídica

Fonte: Elaborado pelo autor

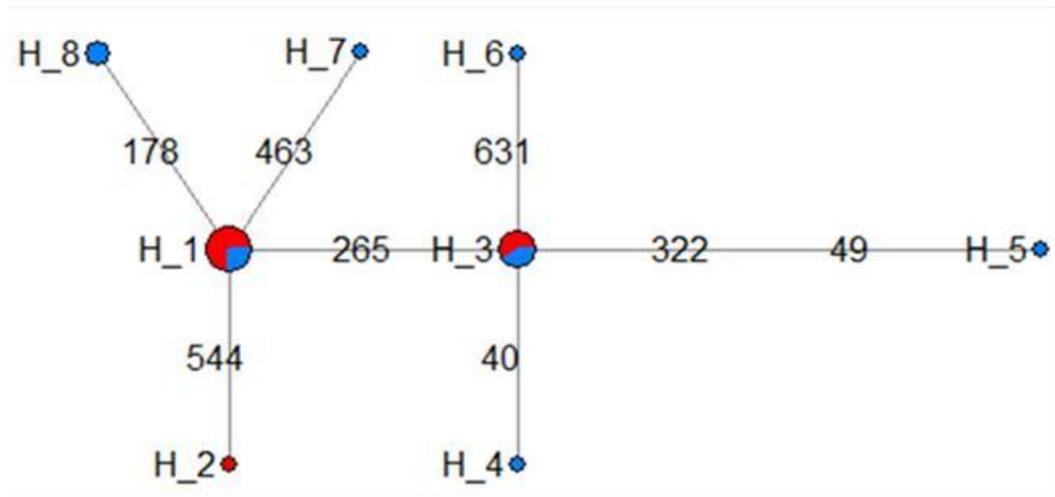
Tabela 5- Haplótipos de *C. rhizophorae* com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no fragmento de 640 pb do gene COI.

Hap	Sítios Polimórficos	Freq	Populações	
	123456		SJR	PL
	44762643			
	09852341			
H1	TCCCCCTT	08	02	06
H2C.	01	-	01
H3	...T....	05	02	03
H4	C..T....	01	01	-
H5	.T.TT...	01	01	-
H6	...T...G	01	01	-
H7T..	01	01	-
H8	..G.....	02	02	-

Hap= Haplotipos, **Freq** = Frequência, **SJR**= São José de Ribamar, **PL**= Paço do Lumiar

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9- Rede de haplótipos de *C. rhizophorae* com base no gene COI. A população de Paço do Lumiar está representada pela cor vermelha e a população de São José de Ribamar pela cor azul.



Fonte: Elaborado pelo autor

Na análise das sequências de *C. gasar* quinze haplótipos foram encontrados, com uma diversidade haplotípica (h) de 0,428 e nucleotídica (π) de 0,002. Valores semelhantes foram observados por Lazoski et al., (2011) para populações de *C. gasar* da costa do Brasil. Na análise isolada de cada população observou-se valores elevados de $h = 0,879$ e $\pi = 0,0051$ para as amostras de Primeira Cruz e valores baixos para amostras de Cururupu ($h = 0,195$ e $\pi = 0,0002$). As amostras do ponto da Raposa apresentaram um único haplótipo (Tabela 6). Dentre os quinze haplótipos encontrados, o H1 foi o mais frequente ocorrendo 59 vezes, distribuídas em todas as populações analisadas. Haplótipos únicos foram observados na população de Primeira Cruz (H3, H4, H5 e H7), Carutapera (H8, H9, H10 e H11), Cururupu (H14 e H15) e em Tutóia (H12). O Haplótipo 13 ocorreu duas vezes exclusivamente em Tutóia. O haplótipo H2 foi compartilhado pelas populações de Primeira Cruz e Tutóia enquanto o haplótipo H6 foi compartilhado em Primeira Cruz e Carutapera (Tabela 7). Nos resultados encontrados o número de haplótipos (4) observados para espécie de *C. gasar* em Tutóia foi semelhante aos resultados publicados por Melo (2010), para essa mesma população.

A rede de haplótipos não enraizada da figura 10 mostra a relação entre os quinze haplótipos obtidos para espécie *C. gasar*. O Haplótipo H1 foi mais frequente e compartilhado por todas as localidades amostradas. Segundo Kidd & Ritchie

(2006), os haplótipos mais frequentes são mais antigos e geralmente encontram-se no interior da rede e os de menor frequência são os mais recentes e ocupam as extremidades. De acordo com os resultados o H1 possivelmente seja o mais antigo.

Para ambas as espécies (*C. rhizophorae* e *C. gasar*) o compartilhamento de haplótipos sugere que as populações possuam uma baixa diferenciação, como foi observado na matriz de distância genética entre os haplótipos de cada uma das espécies (Tabela 9). Para Frankham et al., (2004), toda população de uma determinada espécie pode exibir vários níveis de divergência genética de outras populações baseado no nível de fluxo gênico entre elas, ou seja, populações próximas geograficamente, e que possuem fluxo gênico regular, tenderão a ser mais semelhantes geneticamente entre si do que com populações afastadas geograficamente com fluxo gênico reduzido ou fluxo gênico ausente.

Tabela 6- Diversidade molecular em ostras *Crassostrea gasar* baseado em 695 pb do gene COI.

Populações	N	NH	S	Índice de Diversidade Molecular	
				H	π
Primeira Cruz	12	7	11	0,879	0,0051
Tutóia	17	4	08	0,419	0,0015
Raposa	10	1	0	0,000	0,0000
Cururupu	20	3	2	0,195	0,0002
Carutapera	19	6	11	0,468	0,0025
Populações agrupadas	78	15	20	0,428	0,0020

N = número amostral **NH** = número de haplótipos **S** = sítios polimórficos **h** = diversidade haplotípica e π = diversidade nucleotídica

Fonte: Elaborado pelo autor

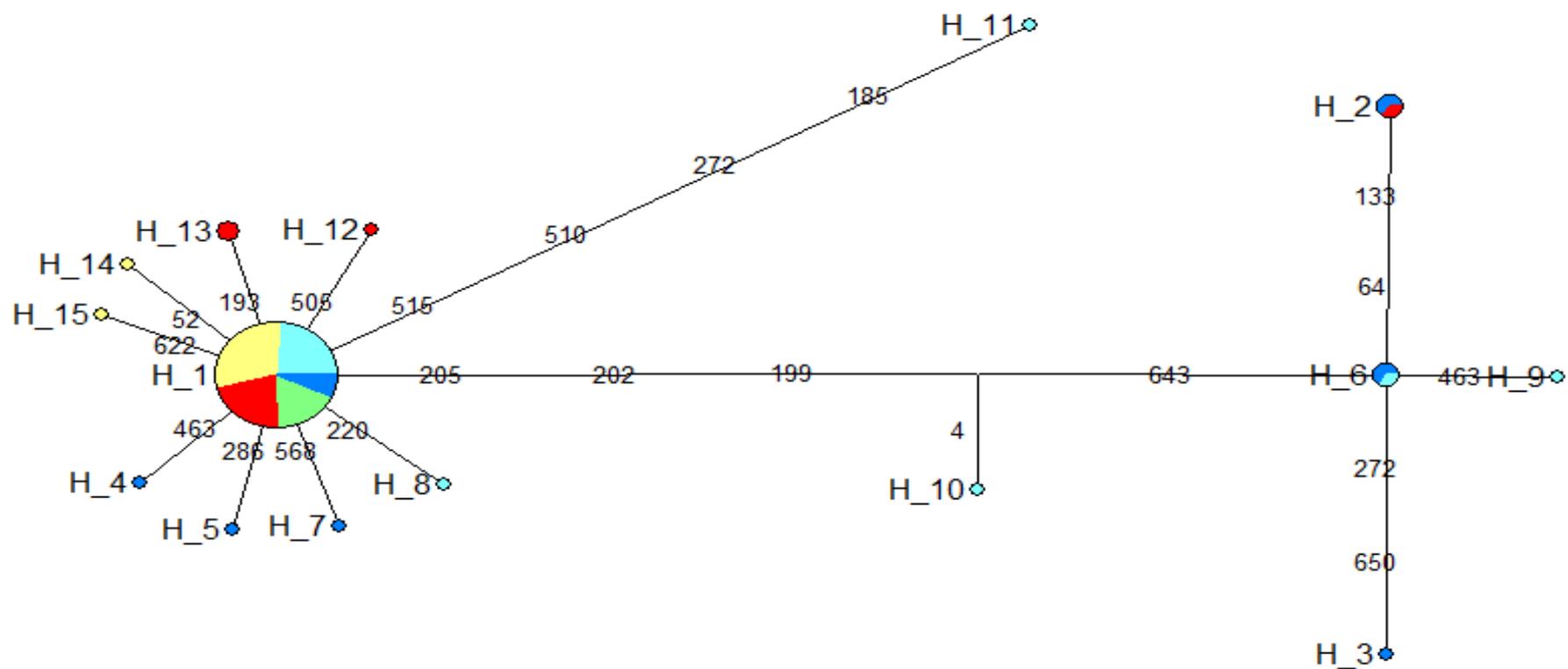
Tabela 7- Haplótipos de *C. gasar* com suas respectivas frequências e localidades de coleta baseados no fragmento de 695 pb do gene COI.

Hap	Sítios informativos	Freq	População				
			CAR	CUR	RAP	PC	TUT
	11112222245555666 5638990027860116245 42435392502635058230						
H1	CTGAGACGGAGCAGTGTTC	59	14	18	10	4	13
H2	..AG..TAA.....T.	03	-	-	-	02	01
H3TAA.A.....TC	01	-	-	-	01	-
H4C.....	01	-	-	-	01	-
H5A.....	01	-	-	-	01	-
H6TAA.....T.	03	01	-	-	02	-
H7G...	01	-	-	-	01	-
H8G.....	01	01	-	-	-	-
H9TAA...G....T.	01	01	-	-	-	-
H10	G.....TAA.....	01	01	-	-	-	-
H11A.....A...AA....	01	01	-	-	-	-
H12A.....	01	-	-	-	-	01
H13G.....	02	-	-	-	-	02
H14	.G.....	01	-	01	-	-	-
H15C..	01	-	01	-	-	-

Hap= Haplotipos, **Freq** = Frequência, **CAR** = Carutapera, **CUR**= Cururup,u **RAP**= Raposa, **PC**= Primeira Cruz e **TUT** = Tutóia.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10- Rede de haplótipos com base no gene COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência com que o haplótipo ocorreu na população. Nas representações por cores de cada população, amarelo = Cururupu; vermelho = Tutóia, azul escuro = Primeira Cruz; verde = Raposa; azul claro = Carutapera.



Fonte: Elaborado pelo autor

A árvore de haplótipos gerada baseada utilizando a abordagem de agrupamento de vizinhos (NJ) através do modelo de Kimura-2-Parâmetros (K2P) revelou a formação de clados fortemente suportados agrupando todos os haplótipos de *C. rhizophorae* em um clado basal (100% de *bootstrap*). Os haplótipos de *C. gasar* constituíram um segundo clado fortemente suportado (Figura 11). A clara separação de *C. rhizophorae* e *C. gasar* em grupos distintos confirma a ocorrência de duas espécies de *Crassostrea* no litoral maranhense, sendo corroborada pelos altos valores de divergência genética (23,9% a 25,9%) entre os haplótipos desses dois táxons (Tabela 9). A estrutura da árvore haplotípica neste estudo é semelhante com aquela obtida por Melo et al. (2010) e Lazoski et al., (2011) com o marcador COI, como também com as árvores obtidas por Lapégue et al., (2002) e Varela et al., (2007) com rRNA16S. Os resultados obtidos não confirmam os apontamentos encontrados pelo estudo morfológico do gênero *Crassostrea* de Amaral e Simone (2014) quanto descrição das espécies nativas e sua distribuição. A espécie *C. gasar* foi encontrada em todos os pontos de coleta, sugerindo se tratar de uma espécie nativa e não exótica do continente africano como sugerido por esses autores. Do mesmo modo a espécie *C. rhizophorae* também é identificada como nativa brasileira (VARELA et al., 2007), estando presente em dois pontos de coleta do litoral do Maranhão (São José de Ribamar e Paço do Lumiar). A espécie *Crassostrea mangle* identificada por Amaral e Simone (2014), não foi confirmada pela presente pesquisa.

As médias de divergências genéticas intraespecíficas mostraram valores de 0,20% para ambas as espécies. Quando avaliadas as sequências de ostras das espécies *C. gasar* x *C. rhizophorae* a média das divergências interespecíficas revelou valor bastante elevado de 23,6 % (Tabela 8). Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Melo et al., (2010) que obtiveram valores de divergência interespecífica entre essas mesmas espécies de 26,1%. Na análise da divergência genética com uso do mesmo marcador (COI) para espécies de *Crassostrea*, Lazoski et al., (2011) obtiveram também médias altas que variaram entre 16% e 27%. Segundo Cywinska et al., (2006) sistemas de identificação de espécies fundamentado em dados moleculares

depende da competência de distinguir a variação intraespecífica da variação interespecífica. Os valores dos resultados da relação intra e interespecíficas obtidas para *C. gasar* e *C. rhizophorae* validam a proposta do DNA BARCODE em identificar e discriminar diferentes espécies. Para o sucesso do código de barras de DNA, as sequências de DNA dentro de uma mesma espécie necessitam apresentar maior similaridade do que entre espécies (CARVALHO et al., 2008).

Os resultados obtidos nesta pesquisa, bem como, em outros estudos utilizando o mesmo fragmento do gene COI em ostras do gênero *Crassostrea* da região Sul-América (MELO et al., 2010; LAZOSKI et al., 2011), geraram informações importantes no campo da identificação e do manejo e conservação desses recursos pesqueiros. No entanto, ainda se faz necessário a utilização de marcadores mais sensíveis e específicos que possam apontar resultados mais profundos. Cavaleiro et al., (2013), afirmam que em muitos casos os estoques pesqueiros apresentam uma diferenciação sutil, e que métodos de avaliação das regiões de microsatélite e da região controle mitocondrial de ostras devam ser desenvolvidos para uma análise mais refinada da estruturação dos estoques dessas espécies. Esses mesmos autores afirmam que existem dois estoques distintos e coincidentes para as espécies *C. gasar* e *C. rhizophorae* entre as regiões norte/nordeste e sul/sudeste da costa brasileira. Portanto é necessário estudos que colaborem para a delimitação das subdivisões na variação gênica desses grupos.

Esse ponto ganha relevância no aspecto da aquicultura quando levado em consideração as questões da produção de sementes de ostras e a conservação genética das populações nativas. A população da Raposa foi tão homogênea que não houve diversidade haplótipica (**h**), pois, a mesma apresentou somente um haplótipo que corresponde ao haplótipo de maior frequência (H1) obtido para *C. gasar*, sendo este compartilhado por todas as localidades amostradas. Esse ponto de coleta correspondeu a uma área onde se desenvolve uma atividade de cultivo experimental de ostras, onde os milheiros de sementes utilizadas são oriundas de sementeiros do estado do Pará (Ícaro Gomes Antonio, comunicação pessoal). Essa condição justifica a homogeneidade dessa população já que provavelmente as sementes cultivadas representam uma linhagem voltada para o cultivo. Portanto é

plausível que se tenha uma preocupação com a sustentabilidade desta atividade aquícola enquanto impacto genético nas populações nativas, na medida em que possa está ocorrendo à dispersão desta linhagem de larvas de ostras para o ambiente de estuário. Cavaleiro et al., (2013), apontam que a inserção de sementes de ostras de regiões diferentes da qual se desenvolve o cultivo pode ter um efeito devastador nas populações naturais, principalmente em populações com estruturas bem diferentes.

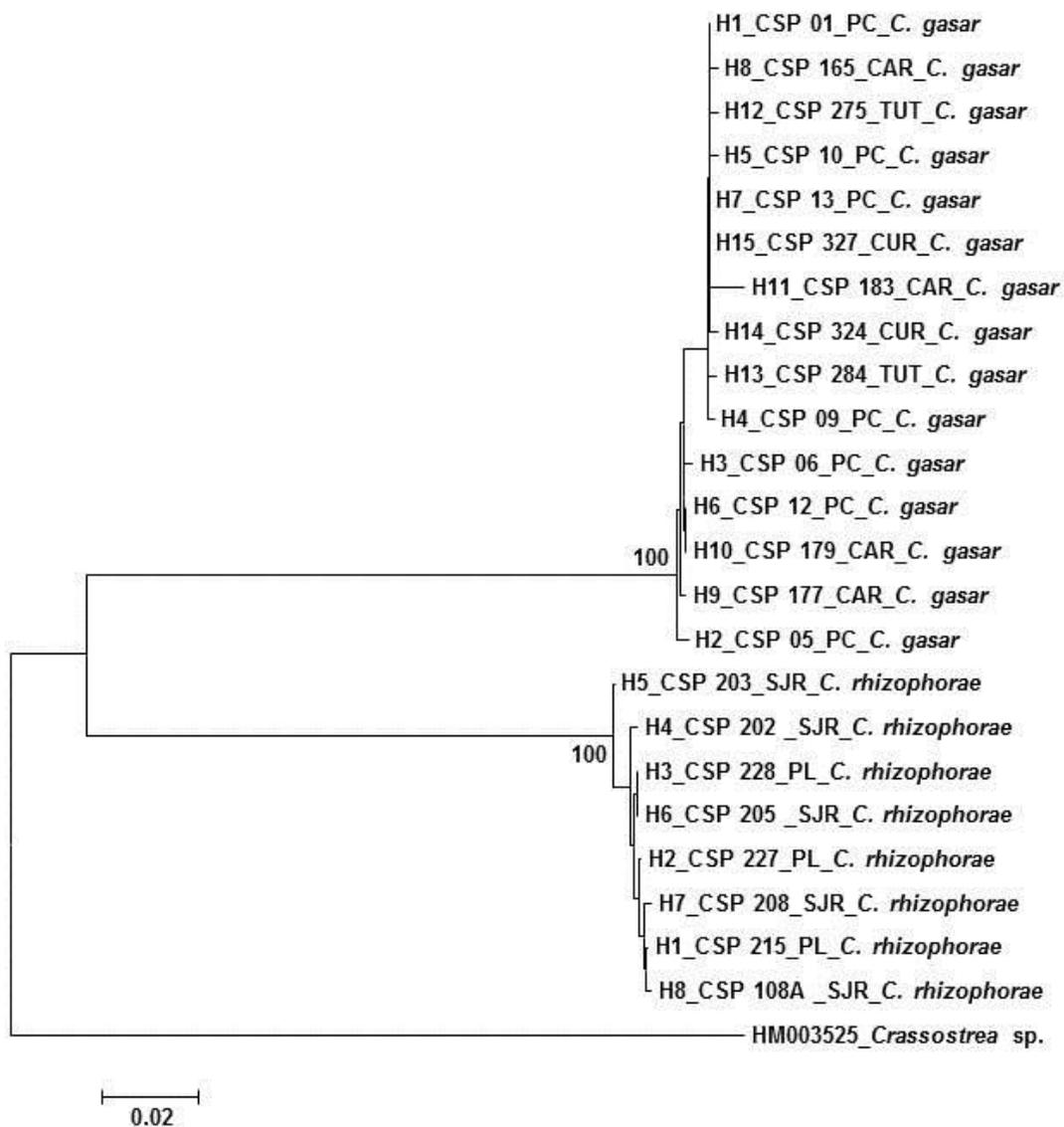
Tabela 8- Divergência genética (K2P) intra e interespecífica de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Maranhão.

Categoria	Espécie	N	Divergência K2P (%)
			Média
Intraespecífica	<i>C. rhizophorae</i>	20	0,20
	<i>C. gasar</i>	78	0,20
Interespecífica	-	98	23,6

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 11- Árvore de haplótipos de agrupamento de vizinhos (NJ) utilizando o modelo K2P baseada em sequências do gene COI em ostras do gênero *Crassostrea*. Os números dos nós representam os valores de bootstrap (1000 réplicas). CAR = Carutapera, CUR= Cururupu, PC=

Primeira Cruz e TUT = Tutóia, SJR= São José de Ribamar e PL= Paço do Lumiar.



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 9- Matriz de distância genética (K2P) entre os haplótipos de ostras obtidas a partir de sequências do gene COI

Haplótipos	% Distância Genética																						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1-H1_CSP_01_PC_ <i>C. gasar</i>	-																						
2- H2_CSP_05_PC_ <i>C. gasar</i>	0,9	-																					
3- H3_CSP_06_PC_ <i>C. gasar</i>	0,7	0,6	-																				
4- H4_CSP_09_PC_ <i>C. gasar</i>	0,2	1,1	0,9	-																			
5- H5_CSP_10_PC_ <i>C. gasar</i>	0,2	1,1	0,9	0,4	-																		
6- H6_CSP_12_PC_ <i>C. gasar</i>	0,6	0,4	0,2	0,7	0,7	-																	
7- H7_CSP_13_PC_ <i>C. gasar</i>	0,0	0,9	0,7	0,2	0,2	0,6	-																
8- H8_CSP_165_CAR_ <i>C. gasar</i>	0,2	1,1	0,9	0,4	0,4	0,7	0,2	-															
9- H9_CSP_177_CAR_ <i>C. gasar</i>	0,7	0,6	0,4	0,7	0,9	0,2	0,7	0,9	-														
10- H10_CSP_179_CAR_ <i>C. gasar</i>	0,6	0,4	0,2	0,7	0,7	0,0	0,6	0,7	0,2	-													
11- H11_CSP_183_CAR_ <i>C. gasar</i>	0,7	1,7	1,1	0,9	0,9	1,3	0,7	0,9	1,5	1,3	-												
12- H12_CSP_275_TUT_ <i>C. gasar</i>	0,2	1,1	0,9	0,4	0,4	0,7	0,2	0,4	0,9	0,7	0,9	-											
13- H13_CSP_284_TUT_ <i>C. gasar</i>	0,2	1,1	0,9	0,4	0,4	0,7	0,2	0,4	0,9	0,7	0,9	0,4	-										
14- H14_CSP_324_CUR_ <i>C. gasar</i>	0,2	1,1	0,9	0,4	0,4	0,7	0,2	0,4	0,9	0,7	0,9	0,4	0,4	-									
15- H15_CSP_327_CUR_ <i>C. gasar</i>	0,0	0,9	0,7	0,2	0,2	0,6	0,0	0,2	0,7	0,6	0,7	0,2	0,2	0,2	-								
16- H1_CSP215_PL_ <i>C. rhizophorae</i>	24,8	24,8	25,1	24,5	25,0	24,8	24,8	25,1	24,8	24,8	25,9	25,1	24,5	24,7	24,8	-							
17- H2_CSP227_PL_ <i>C. r rhizophorae</i>	24,5	24,5	24,8	24,2	24,7	24,5	24,5	24,8	24,5	24,5	25,6	24,8	24,2	24,5	24,5	0,2	-						
18- H3_CSP228_PL_ <i>C. rhizophorae</i>	24,5	24,5	24,8	24,2	24,7	24,5	24,5	24,8	24,5	24,5	25,6	24,9	24,2	24,5	24,5	0,2	0,4	-					
19- H4_CSP202_SJR_ <i>C. rhizophorae</i>	24,5	24,5	24,8	24,2	24,7	24,5	24,5	24,8	24,5	24,5	25,6	24,8	24,2	24,5	24,5	0,4	0,6	0,2	-				
20- H5_CSP203_SJR_ <i>C. rhizophorae</i>	23,9	23,9	24,2	23,7	24,2	23,9	23,9	24,2	23,9	23,9	25,0	24,2	23,7	23,9	23,9	0,6	0,7	0,4	0,6	-			
21- H6_CSP205_SJR_ <i>C. rhizophorae</i>	24,5	24,5	24,8	24,2	24,7	24,5	24,5	24,8	24,5	24,5	25,6	24,8	24,2	24,5	24,5	0,2	0,4	0,0	0,2	0,4	-		
22- H7_CSP208_SJR_ <i>C. rhizophorae</i>	24,8	24,8	25,1	24,8	25,0	24,8	24,8	35,1	24,8	24,8	25,9	25,1	24,5	24,7	24,8	0,2	0,4	0,4	0,6	0,7	0,4	-	
23- H8_CSP108A_SJR_ <i>C. rhizophorae</i>	24,8	24,8	25,1	24,6	25,1	24,8	24,8	25,1	24,8	24,8	25,9	25,1	24,5	24,8	24,8	0,2	0,4	0,4	0,6	0,7	0,4	0,4	-

Na identificação molecular o limite estabelecido pelo CBOL (*Consortium for the Barcode of Life*) como valor de corte para delimitação de espécie é cerca de 2% a 3% de divergência genética. Na prática, significa que, se a sequência de DNA de um exemplar diferir menos que 3% (ou obter um índice de similaridade superior a 97% no BOLDSYSTEMS) da sequência de uma das espécies já conhecidas, ele será identificado como pertencente àquela espécie (SOLÉ-CAVA; WÖRHEIDE, 2007; SOLÉ-CAVA, 2008). Embora essa seja uma média aproximada voltada para organismos vertebrados, COI Melo et al., (2010) constataram médias que diferenciavam espécies do gênero *Crassostrea* (*C. gigas* e *C. angulata*) com valores de aproximadamente 2%.

As sequências de COI obtidas foram submetidas na plataforma BOLDSYSTEMS (*Barcode of Life Data Systems*) a fim de se obter a identificação molecular a partir da comparação com sequências presentes nesse sistema. A porcentagem de identificação das espécies no BOLDSYSTEMS variou de 97,01% a 98,37% de similaridade de sequências para a espécie *C. rhizophorae* (Tabela 10). Na comparação das sequências de *C. gasar* observou-se que os percentuais de similaridade foram compatíveis tanto para *C. brasiliiana*, quanto para *C. gasar* com percentuais de similaridade variando de 97,55% a 99,84% (Tabela 11 e 12) evidenciando uma problemática na sua taxonomia. Considerando os dados da literatura propostos por Amaral e Simone (2014), de que *C. gasar* seria uma espécie exótica originária da África e diferente de *C. brasiliiana*, foram utilizadas sequências obtidas no Genbank de *C. gasar* africana (F717645) e de *C. brasiliiana* (F717640, F717641, F717642, F717643, F717644, F717645, F717646, F717647, F717648, F717649, F717650 e F717651) para gerar uma árvore de haplótipos e testar essa possível distinção entre os táxons. Os resultados observados mostraram um agrupamento robusto corroborando para condição de sinonímia entre *C. gasar* e *C. brasiliiana* (Figura 12).

Varela et al., (2007), já apontava que as sequências descritas por PIE et al., (2006), para *C. brasiliiana* e por Lapègue et al., (2002), para *C. gasar*, na realidade se tratavam da mesma espécie. Entretanto Simone e Amaral (2014) afirmam que *C. brasiliiana* e *C. gasar* são espécies diferentes, sendo a primeira a espécie de fato nativa brasileira e a segunda exótica. Possivelmente a diferença nos resultados encontrados se deva a questão do uso de métodos de avaliação diferentes. Embora

não se tenha incluído análises morfológicas no presente estudo, como as realizadas por Simone e Amaral (2014), os resultados obtidos estão em conformidade com outras pesquisas recentes que confirmam essa abordagem taxonômica (MELO et al., 2010; LAZOSKI et al., 2011; CAVALEIRO et al., 2013).

Tabela 10- Percentual de similaridade genética obtida por comparações das sequências de COI no BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) para *C. rhizophorae*.

Identificação Morfológica	Identificação Molecular	Similaridade (%)
<i>Crassostrea</i> sp 215 – H1	<i>C. rhizophorae</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp 227 – H2	<i>C. rhizophorae</i>	98,21
<i>Crassostrea</i> sp 228 – H3	<i>C. rhizophorae</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp 202 – H4	<i>C. rhizophorae</i>	97,05
<i>Crassostrea</i> sp 203 – H5	<i>C. rhizophorae</i>	97,22
<i>Crassostrea</i> sp 205 – H6	<i>C. rhizophorae</i>	97,01
<i>Crassostrea</i> sp 208 – H7	<i>C. rhizophorae</i>	98,21
<i>Crassostrea</i> sp 108A –H8	<i>C. rhizophorae</i>	98,21

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 11- Percentual de similaridade genética obtida por comparações das sequências de COI no BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) para *C. gasar*.

Identificação Morfológica	Identificação Molecular	Similaridade (%)
<i>Crassostrea</i> sp – H1	<i>Crassostrea gasar</i>	98,20
<i>Crassostrea</i> sp – H2	<i>Crassostrea gasar</i>	97,71
<i>Crassostrea</i> sp – H3	<i>Crassostrea gasar</i>	97,88
<i>Crassostrea</i> sp – H4	<i>Crassostrea gasar</i>	98,04
<i>Crassostrea</i> sp – H5	<i>Crassostrea gasar</i>	98,04
<i>Crassostrea</i> sp – H6	<i>Crassostrea gasar</i>	98,04
<i>Crassostrea</i> sp – H7	<i>Crassostrea gasar</i>	99,52
<i>Crassostrea</i> sp –H8	<i>Crassostrea gasar</i>	98,04
<i>Crassostrea</i> sp – H9	<i>Crassostrea gasar</i>	97,88
<i>Crassostrea</i> sp – H10	<i>Crassostrea gasar</i>	98,04
<i>Crassostrea</i> sp – H11	<i>Crassostrea gasar</i>	97,55
<i>Crassostrea</i> sp – H12	<i>Crassostrea gasar</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp – H13	<i>Crassostrea gasar</i>	98,04
<i>Crassostrea</i> sp – H14	<i>Crassostrea gasar</i>	98,04
<i>Crassostrea</i> sp –H15	<i>Crassostrea gasar</i>	98,04

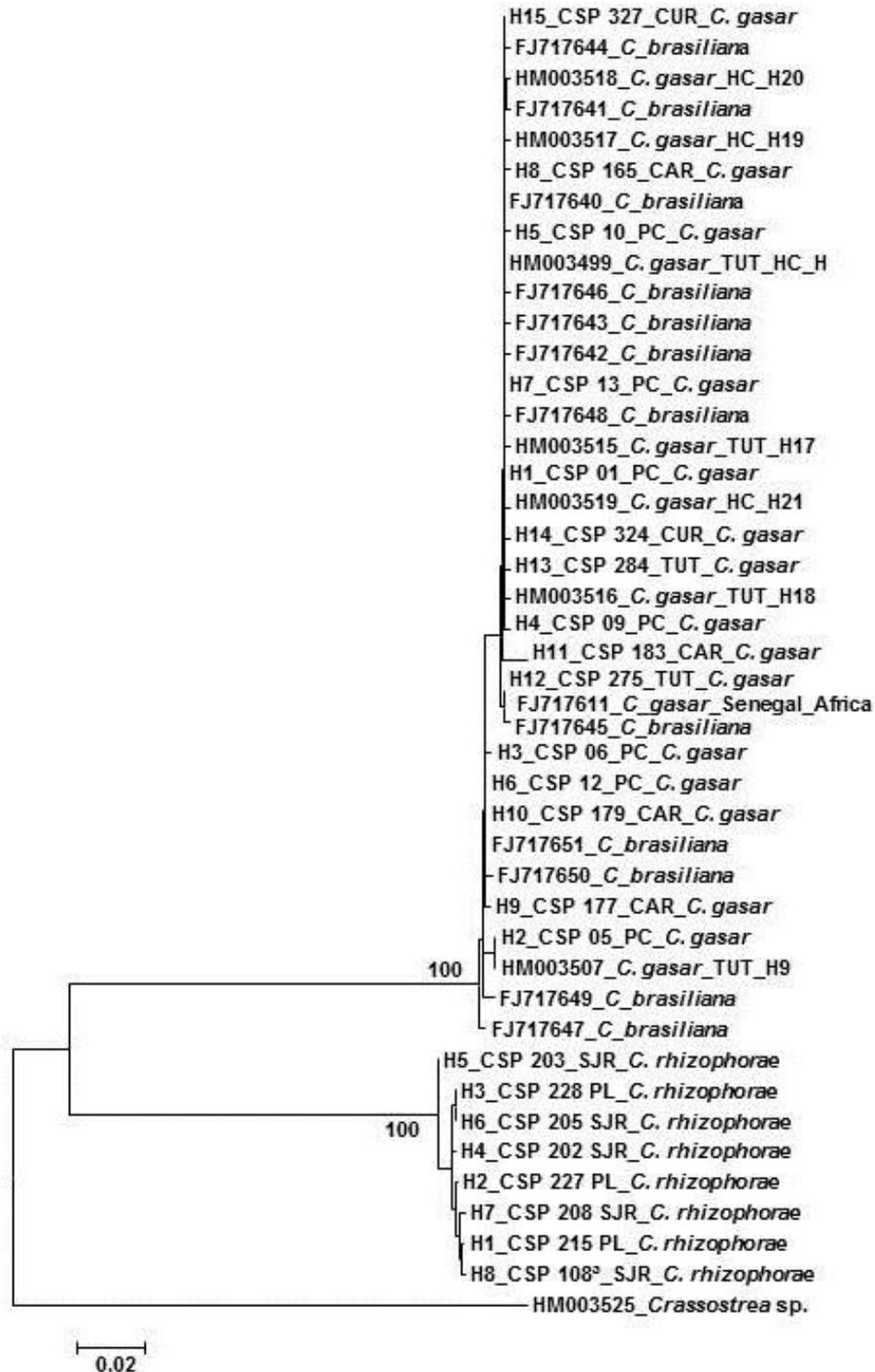
Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 12- Percentual de similaridade genética obtida por comparações das sequências de COI no BOLDSYSTEMS (Barcode of Life Data Systems) para *C. brasiliiana*.

Identificação Morfológica	Identificação Molecular	Similaridade (%)
<i>Crassostrea</i> sp – H1	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,53
<i>Crassostrea</i> sp – H2	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,2
<i>Crassostrea</i> sp – H3	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp – H4	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp – H5	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp – H6	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,53
<i>Crassostrea</i> sp – H7	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	99,84
<i>Crassostrea</i> sp –H8	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp – H9	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp – H10	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,53
<i>Crassostrea</i> sp – H11	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	97,88
<i>Crassostrea</i> sp – H12	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp – H13	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp – H14	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37
<i>Crassostrea</i> sp –H15	<i>Crassostrea brasiliiana</i>	98,37

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 12- Árvore de haplótipos de agrupamento de vizinhos (NJ) utilizando o modelo K2P baseada em sequências do gene COI em ostras do gênero *Crassostrea*. Os números dos nós representam os valores de bootstrap (1000 réplicas). CAR = Carutapera, CUR= Cururupu, PC= Primeira Cruz e TUT = Tutóia, SJR= São José de Ribamar e PL= Paço do Lumiar.



Fonte: Elaborado pelo autor

A identificação molecular das espécies de ostras nativas do litoral do Maranhão pelo marcador COI validou os resultados gerados pelo PCR Multiplex. Do ponto de vista da aquicultura os resultados obtidos revelam que no estado do Maranhão existem condições de obtenção de sementes de ostra com qualidade em ambiente natural. É possível que, além de Carutapera, Cururupu, Raposa, Primeira Cruz e Tutóia, que apresentaram a espécie de melhor desempenho zootécnico na ostreicultura, *C. gasar* (ABSHER, 1989, PEREIRA, et al., 2001), outros pontos do litoral possuam boas condições para o recrutamento desses bivalves, já que o número de municípios amostrados foi limitado.

6. CONCLUSÃO

O PCR Multiplex demonstrou-se eficaz na identificação das espécies de ostra do gênero *Crassostrea*, do litoral maranhense. A eficiência dessa metodologia representa uma alternativa prática de monitoramento da distribuição das espécies de ostras, bem como uma ferramenta mais acessível ao produtor aquícola.

Os valores da distância genética intra e interespecífica e o percentual de similaridade das comparações das sequências de COI na plataforma BoldSystems permitiu inferir quanto à identificação de *C. gasar* e *C. rhizophorae* no litoral maranhense.

A presença de mais de uma espécie nativa no litoral maranhense implica na necessidade de estudos da biologia reprodutiva, de ambas as representantes, mais detalhados, para que seja possível avaliar as condições reais desse recurso pesqueiro. Portanto, novas pesquisas, com maiores amostragens genéticas devem ser geradas para os grupos de ostras do litoral maranhense como forma de esclarecimento das condições desse recurso pesqueiro e dados mais informativos sobre as populações existentes.

REFERÊNCIAS

- ABSHER, T. M. **Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná: desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento.** 1989. 140p. Tese (PhD) - Instituto de Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
- AKABOSHI, S. Notas sobre o comportamento da ostra japonesa, *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1795), no litoral do estado de São Paulo, Brasil. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 6, n. único, p. 93-104, 1979.
- AMARAL, V. S. do; SIMONE, L. R. L. Revision of genus *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) of Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge, v. 94, n. 04, p. 811–836, 19 fev. 2014.
- ARAÚJO, C. M. **Biologia reprodutiva do berbigão *Anomalocardia brasiliana* (Mollusca: Bivalvia, Veneridae) na Reserva Extrativista Marinha do Pirajubaé (REMAPI), Estado de Santa Catarina.** 2011. 203 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- CARRIKER, M. R.; GAFFNEY, P. M. A catalogue of selected species of living oysters (*Ostreacea*) of the world, 1996. In: KENNEDY, V. S.; NEWELL, R. I. E.; EBLE, A. F. (Eds.). **The eastern oyster: *Crassostrea virginica*.** Maryland Sea Grant Book, Maryland, 1996. p.1-18.
- CARVALHO, D. C.; SEERIG, A.; MELO, D. C. de; SOUSA, A. B. de; PIMENTA, D.; OLIVEIRA, D. A. A. Identificação molecular de peixes: o caso do Surubim (*Pseudoplatystoma* spp.). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 4, p. 215-219, 2008.
- CAVALEIRO, N. P.; SOLÉ-CAVA, A. M.; LAZOSKI, C.; CUNHA, H. A. Polymorphic microsatellite *loci* for two Atlantic oyster species: *Crassostrea rhizophorae* and *C. gasar*. **Molecular Biology Reports**, Springer Netherlands, v. 40, n. 12, p. 7039-7043, dez. 2013.
- CHRISTO, S. W. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea sacco*, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná–Brasil): Um subsídio ao cultivo.** 2006. 146f. Tese (Doutorado em Ciências) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- DE PAULA, N. R. F.; GOMES, L. A.; MELO, A. G. C.; BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H. Estudos populacionais de *Crassostrea gasar* do Pará e do Maranhão usando o gene COI. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA. 54., 2008, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. p. 398.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Washington, v. 39, n.4, p. 783-791. 1985.

FERREIRA, C. E. L.; GONÇALVES, J. E. A.; COUTINHO, R. Cascos de navios e plataformas como vetores na introdução de espécies exóticas. In: SILVA, J. S. V.; SOUZA, R. C. C. L. (Orgs.). **Água de lastro e bioinvasão**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004. p. 143-156.

FOLMER, O.; BLACK, M. B.; HOCH, W.; LUTZ, R. A.; VRIJEHOEK, R. C. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v.3, n. 5, p. 294-299. 1994.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

GALTSOFF, P. S. The american oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service**. Silver Springer, v. 64, p. 1-480. 1964.

GUNTER, G. The generic status of living oysters and the scientific name of common American species. **The American Midland Naturalist**, Indiana, v. 43, n.2, p. 438-449. mar. 1950.

HAJIBABAEI, M.; SINGER, G. A. C.; HEBERT, P. D. N.; HICKEY, D. A. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 4, p. 167-172, abr. 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic acids symposium series**, Oxford, v. 41, p. 95-98. 1999.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proc. R. Soc. Lond. B**, London, v. 270, p. S96-S99, 2003. Suplemento.

HEDGECOCH, D.; OKAZAKI, N. B. Genetic diversity within and between populations of american oyster (*Crassostrea*). **Malacologia**, Michigan, v.25, n. 2, p. 535-549. 1984.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOUHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **BioTechniques**, Westborough, v. 23, n.3, p. 504-511. set. 1997.

HENRIQUES, J. M. **Identificação molecular (DNA barcode) dos peixes da bacia do rio Ribeira de Iguape e dos rios costeiros do estado de São Paulo**. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Área de Zoologia - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, 2010.

IGNACIO, B. L.; ABSHER, T. M.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, v.136, n.6, p. 987-991, jan-jul. 2000.

LAM, K.; MORTON, B. Mitochondrial DNA and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta, Hong Kong, China. **Aquaculture**, v. 228, n. 1-4, p.1-13. 2003.

LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P. THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16s mtDNA and karyological analyses. **The Biological Bulletin**, Woods Hole, v.202, n.3, p.232-242, jun. 2002.

LAZOSKI, C.; GUSMÃO, J.; BOUDRY, P.; SOLÉ-CAVA, A. M. Phylogeny and phylogeography of Atlantic oyster species: evolutionary history, limited genetic connectivity and isolation by distance. **Marine Ecology Progress Series**, v.426, p. 197-212, mar. 2011.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n.11, p. 1451-1452. jun. 2009.

LUDWIG, S.; PATELLA, R.; STOIEV, S.; CASTILHO-WESTPHAL, G.; GIROTTO, M. V. F.; OSTRENYK, A. A molecular method to detect and identify the native species of southwestern Atlantic *Crassostrea* (Mollusca: Ostreidae). **Zoologia** (Curitiba, Impr.): an international journal for zoology, v. 28, n. 4, p. 420-426, ago. 2011.

MACCACCHERO, G. B.; FERREIRA, J. F.; GUZENSKI, J. Influence of stocking density and culture management on growth and mortality of the mangrove native oyster *Crassostrea* sp. in southern Brazil. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, n. 3, p. 47-53. 2007.

MALOUF, R. E.; BREESE, W. P. Seasonal changes in the effects of temperature and water flow rate on the growth of juvenile Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), **Aquaculture**, v. 12, n.1, p. 1-13. 1977.

MANZONI, G. C.; SCHMITT, J. F. Cultivo de ostras japonesas *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia), na Armação do Itapocoroy, Penha, SC. In: BRANCO, J. O.;

MEDRANO, J. F.; AESEN, E.; SHARROW, L. DNA Extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v. 8, n. 1, p. 43. jan.1990.

MELO, A. G. C.; VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H., SAMPAIO, I.; GAFFNEY, P. M.; REECE, K. S.; TAGLIARO, C. H. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). **Genetics and Molecular Biology**. São Paulo, v. 33, n. 3, p.564–572, 2010.

MELO, M. A. D.; SILVA, A. R. B.; BEASLEY, C. R.; TAGLIARO, C. H. Multiplex species-specific PCR identification of native and non-native oysters (*Crassostrea*) in Brazil: a useful tool for application in oyster culture and stock management. **Aquaculture international**, v. 21, n. 6, p. 1325-1332. dez. 2013.

MORITZ, C.; CICERO, C. DNA barcoding: promise and pitfalls. **PLOS Biology**, San Francisco, v. 2, n. 10, p. 1529-1531. out. 2004.

NALESSO, R. C.; PARESQUE, K.; PIUMBINI, P. P.; TONINI, J. F. R.; ALMEIDA, L. G.; NICKEL, V. M. Oyster spat recruitment in Espírito Santo state, Brazil, using recycled materials. **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 281-288. 2008.

NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliiana* (Lamarck) in South and America Central. In: MENZEL W. (Ed.) **Estuarine and marine bivalve mollusk culture**. Boca Raton: CRC Press, 1991. cap.10. p 125-134.

PEREIRA, O. M.; MACHADO, I. C.; HENRIQUES, M. B.; YAMANAKA, N. Crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* semeada sobre tabuleiro em diferentes densidades na região estuarino-lagunar de Cananéia-SP (25°S, 48°W). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27, n.2, p.163-174, 2001.

PIE, M. R.; RIBEIRO, R. O.; BOEGER, W. A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R. M.; ANGELO, L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**, Malden, v. 37, n.15, 2006, p.1598-1600. 2006.

REECE, K. S.; CORDES, J. F.; STUBBS, J. B.; HUDSON, K. L.; FRANCIS, E. A.; Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. **Marine Biology**, v.153, n.4, p. 709-721. fev. 2008.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2.ed. Rio Grande: Fundação Universidade do Rio Grande, 1994. 492 p.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, jul. 1987.

SANGER, F.; NICHLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 74, p. 5463-5468, 1977.

SIMONE, L. R. L. Invertebrados Marinhos. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. (Orgs.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1999. v. 3, cap. 19, p. 131-136.

SINGARAJAH, K. V. On the taxonomy, ecology and physiology of a giant oyster, *Crassostrea paraibanensis*, a new species. **Bulletin of Marine Science**, v. 30, n. 4, p.833-847, 1980.

SOLÉ-CAVA, A. M. Códigos de barra de DNA: o rabo que abana o cachorro. **Ciência Hoje**, v. 41: n. 245, p. 65-67, 2008.

SOLÉ-CAVA, A. M.; WÖRHEIDE, G. The perils and merits (or The Good, the Bad and the Ugly) of DNA barcoding of sponges: a controversial discussion. In: CUSTÓDIO, M. R.; LÔBO-HAJDU, G.; HAJDU, E.; MURICY, G. (Eds.). **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 603-612, 2007. Série Livros.

SOUZA, S. Fixação de sementes *Crassostrea rhizophorae* (ostra nativa) em diferentes localidades do Maranhão. In: ENCONTRO MARANHENSE DE BIOLOGIA. 1., 1999, São Luís, **Anais...** São Luís, CEUMA, UFMA, UEMA, SVZ, 1999. 75p.

TAMURA, K; STECHER, G; PETERSON, D; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, dez. 2013.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, n. 22, p. 4673-4680. nov. 1994.

TURECK, C. R. **Sementes de ostras nativas no litoral de Santa Catarina/Brasil, como subsídio ao cultivo**. 2010. 140f. Tese (Doutorado em Aquicultura) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

VARELA, E. S.; BEASLEY, C. R.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N. S.; TAGLIARO, C. H. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **J. Mollus.Stud.**, v.73, n. 3, p.229-234. ago. 2007.

VASCONCELOS, R. F.; FEIJO, R. G.; MESQUITA, T. O. C.; GRANGEIRO, T. B.; GESTEIRA, T. C. V.; MAGGIONI, R.. **Variabilidade da região ITS-1 do cluster ribossômico nuclear em populações de ostras de três estuários da costa cearense**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OCEANOGRAFIA, 4., 2010, Rio Grande, CBO. **Anais...** Rio Grande, 2010. CD-ROM.

WAKAMATSU, T. **A ostra de Cananéia e seu cultivo**. São Paulo: Superintendência do Desenvolvimento do Litoral Paulista/Instituto Oceanográfico da USP, 1973. p.141.
WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 2, p. 329-356. fev. 2009.

WARD, R. D.; HANNER, R.; HEBERT, P. D. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology**, v. 74, n. 2, p. 329-356. Feb 2009.

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. **Journal of Heredity**, v. 92, n. 4, p. 371-373. jul. 2001.

YONGE, C. M. **Oysters**. London: Collins, 1960. 209p.

ZCM. **Zoneamento Costeiro do Maranhão**. Aspectos geológicos/ hidrológicos/ pedológicos/ geomorfológicos. IICA/UFMA/UEMA/NUGEO/LABGEO, São Luís, 2003.