



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

RAFAEL BITTENCOURT VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE OSTRAS *Crassostrea* Spp DA
REGIÃO DE GRACIOSA E SANTIAGO DO IGUAPE - BA, POR MEIO
DE MARCADORES ISSR**

CRUZ DAS ALMAS

2016

RAFAEL BITTENCOURT VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE OSTRAS *Crassostrea Spp* DA
REGIÃO DE GRACIOSA E SANTIAGO DO IGUAPE - BA, POR MEIO
DE MARCADORES ISSR**

Trabalho de Conclusão do Curso (TCC),
apresentado ao curso de graduação em
Engenharia de Pesca da Universidade
Federal do Recôncavo da Bahia, como
requisito para obtenção do grau de
Engenheiro de Pesca.

Orientadora: Dr^a Soraia Barreto Aguiar
Fonteles

CRUZ DAS ALMAS

2016

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE OSTRAS *Crassostrea Spp*
DA REGIÃO DE GRACIOSA E SANTIAGO DO IGUAPE - BA,
POR MEIO DE MARCADORES ISSR**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi submetido à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

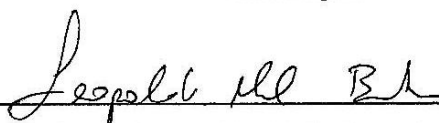
Aprovado em 18 / 02 / 2016



Profa. Soraia Barreto Aguiar Fonteles, D.Sc.

Orientadora

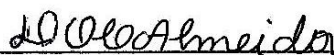
Instituição



Prof. Leopoldo Melo Barreto, M.Sc.

1º Membro

Instituição



Profa. Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida, D.Sc.

2º Membro

Instituição

Dedico esse trabalho a Deus. A minha querida esposa Karina Zanoti Fonseca, companheira em todos os momentos. Acredito que essa graduação deve-se mais a ela que a mim mesmo, pois toda a força, orientação e inspiração vieram dela. Aos meus queridos e amados pais, meu amado avô Sr. Francisco José Bittencourt *in memoriam* pelo exemplo de humildade em vida e a Deus.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Aos meus queridos pais David Tavares Vieira e Neuza Maria Bittencourt Vieira pela vontade de fazer sempre o melhor para os filhos.

A minha amada esposa Karina Zanoti Fonseca pela profunda inspiração.

A querida amiga e orientadora Soraia Barreto Aguiar Fonteles por seu carinho com a ciência e a sua capacidade de transmitir conhecimento de forma efetiva e sutil.

Ao grande amigo Cassiano Ricardo pela presença em minha vida acadêmica e pessoal.

Ao professor Clóvis Matheus Pereira, por todos os seus ensinamentos, tanto no âmbito acadêmico e profissional quanto no pessoal.

A Engenheira de Pesca Laís Novaes pelos conhecimentos e pela parceria nas práticas laboratoriais.

Ao Professor Ricardo Franco Cunha Moreira; por sua ajuda e ensinamentos;

A Colega Claudivane Sá Teles pelo companheirismo e dedicação durante os trabalhos laboratoriais.

A todos os colegas de laboratório.

A querida Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida por sua pré-disposição em ajudar sempre, e pelo seu grande exemplo de vida.

Ao professor Aureo Silva de Oliveira, por sua presença marcante em minha graduação.

A confraria por todos os momentos divertidos e agradáveis.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta, contribuíram na realização deste trabalho.

A Deus, novamente e sempre por tudo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO GERAL.....	17
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
5. RESULTADOS.....	26
5.1 Análise estatística.....	28
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÃO.....	33
8. REFERÊNCIAS.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Relação dos <i>Primers</i> ISSR testados e das temperaturas de anelamento utilizadas.....	22
Tabela 02: Relação dos <i>Primers</i> ISSR e das temperaturas de anelamento utilizados no trabalho.....	23
Tabela 03: Reagentes componentes da mistura de reação de PCR utilizada e seus volumes respectivos.....	23
Tabela 04: Estágios do termociclador para realização do PCR das amostras de DNA para os <i>primers</i> escolhidos.....	24
Tabela 05: Análise de variância molecular dentro e entre as populações da espécie <i>Crassostrea</i> spp.....	28
Tabela 06: Distância genética de Nei (1972) (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) por comparação par a par entre as populações cultivadas da espécie <i>Crassostrea</i> spp.....	29
Tabela 07: Diversidade genética entre populações cultivadas da espécie <i>Crassostrea</i> spp.....	29
Tabela 08: Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional (G_{ST}) e fluxo gênico (N_m) entre populações cultivadas da espécie <i>Crassostrea</i> spp.....	30
Tabela 09: Polimorfismo das populações da espécie <i>Crassostrea</i> spp. analisadas no trabalho.....	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Método de extração de DNA total a partir de tecido de organismos aquáticos descrito por Sambrook et. al.....	20
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Espécimes de <i>Crassostrea</i> spp. coletadas em Santiago do Iguape.....	14
Figura 02: Mapa do estado da Bahia indicando os pontos de coleta de <i>Crassostrea</i> spp. realizados no estudo.....	18
Figuras 03, 04, 05 e 06: Coleta de ostras <i>Crassostrea</i> spp. em Santiago do Iguape, BA.....	19
Figura 07: <i>Transluminador UV L.PIX Loccus</i> Biotecnologia – <i>Molecular Imaging</i> acoplado ao computador. Utilizado para a foto-documentação do gel.....	21
Figura 08: Amostras sendo levadas ao termociclador.....	22
Figura 09: Termociclador <i>Veriti (Applied Biosystems)</i> , em processo de PCR.....	22
Figuras 10 e 11: Amostras sendo acondicionadas no gel de agarose para corrida eletroforética.....	25
Figura 12: Cuba com o gel de agarose contendo as amostras em processo de corrida eletroforética.....	25
Figura 13: Gel de agarose 2% contendo as amostras de 01 a 29 coletadas em Graciosa, BA, para a checagem da presença de DNA.....	26
Figura 14: Gel de agarose 2% contendo as amostras de 01 a 29 coletadas em Santiago do Iguape, BA, para a checagem da presença de DNA.....	27
Figura 15: Perfil de eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando o <i>primer</i> ISSR 21 em 33 amostras de <i>Crassostrea</i> spp. coletadas em Santiago do Iguape, BA.....	27
Figura 16: Perfil de eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando o <i>primer</i> ISSR 14 em 33 amostras de <i>Crassostrea</i> spp coletadas em Graciosa, BA.....	27
Figura 17: Dendrograma derivado através de UPGMA (<i>Unweighted pair group method, arithmetic mean</i>) das populações cultivadas de <i>Crassostrea</i> spp. baseado na distância genética de Nei (Nei, 1972).....	30

SIGLAS

ISSR - *Inter Simple Sequence Repeat*

SPAR - *Single Primers Amplifications Reactions.*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

DNA/ADN Deoxyribonucleic acid; ou em português: ácido Desoxirribonucleico

RNA – Ácido Ribonucléico;

UPGMA - (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Método par a par de médias ponderadas.

RESUMO

A atividade de ostreicultura de espécies nativas no Brasil geralmente é realizada de forma empírica e carece de desenvolvimento de tecnologia para se consolidar. A genética se apresenta como uma importante ferramenta nessa busca. A caracterização genética e a determinação da variabilidade genética das populações naturais são os primeiros passos a serem dados no sentido de se desenvolver a atividade de forma comercial. No presente trabalho foi realizado um estudo por meio de marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) sobre a genética de 33 exemplares de ostra do gênero *Crassostrea* provenientes de Graciosa, sub-região do baixo sul, município de Taperoá, Bahia e 33 provenientes de Santiago do Iguape, banhado pela baía do Iguape, povoado pertencente ao município de Cachoeira, Bahia. As populações estudadas apresentaram alta variabilidade genética intrapopulacional, todavia, a variabilidade se mostrou maior entre os indivíduos de cada população do que entre as duas populações. Portanto, as populações de ostras estudadas oferecem a possibilidade de formação de plantel com boa diversidade genética permitindo sua utilização em cultivos e em programas de conservação. Devido a grande variabilidade genética encontrada, não foi possível caracterizar geneticamente as populações de *Crassostrea* spp. A prática realizada com marcador ISSR se apresentou efetiva e permitiu inferir com segurança sobre a variabilidade genética das populações amostradas. Cita-se, portanto, que mais estudos devem ser realizados com pontos de coleta compreendidos geograficamente entre a região de Graciosa e Santiago do Iguape a fim de se construir um mapeamento da interação genética entre as duas populações.

Palavras Chave: Caracterização genética; Variabilidade genética; Ostreicultura

ABSTRACT

The oyster farming activity of native species in Brazil usually is carried out empirically and lacks technology development to consolidate. The gene appears as an important tool in this quest. Genetic characterization and the determination of the genetic variability of natural populations are the first steps to be taken in order to develop commercial activity form. In this work a study was conducted by ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers on the genetics of 33 gender oyster copies *Crassostrea* from Graciosa, from down south sub-region, the municipality of Taperoá, Bahia and 33 from Santiago do Iguape, bathed in the bay Iguape, village in the municipality of Cachoeira, Bahia. The populations studied showed high genetic variability intra population, however, the variability was larger among individuals of each population than between the two populations. Therefore, the populations studied oysters offer the possibility of squad training with good genetic diversity allowing its use in crops and conservation programs. Due to the great genetic variability found, was not genetically characterize populations of *Crassostrea* spp. The practice carried out with ISSR marker performed effectively and safely possible to infer on the genetic variability of the sampled populations. Quotes, therefore, that further studies should be carried out with collection points understood geographically between the region of Graciosa and Santiago do Iguape in order to build a mapping of genetic interaction between the two populations.

Keywords: Genetic characterization; Genetic variability; Oyster farming.

1. INTRODUÇÃO

Genética pode ser definida como o conjunto de conhecimentos e saberes pertinentes ao estudo dos genes e como estes são transmitidos aos descendentes. Entre tantas outras possibilidades, ela permite manipular esses genes de forma a condicionar organismos pré-determinados a atenderem algum tipo de demanda humana seja ela alimentar, comercial ou preservacionista (ALVAREZ, 2010). A genética é uma ciência relativamente nova e divide-se historicamente em duas etapas principais: Clássica ou Mendeliana, embasada nas leis do monge agostiniano austríaco Gregor Mendell e a moderna baseada na ideia da molécula de DNA em dupla hélice concebida em 1953 por James Watson e Francis Crick. Ao longo dos últimos 30 anos, a genética molecular vem inovando o campo das ciências biológicas, possibilitando o desenvolvimento de métodos para estudar geneticamente indivíduos e populações (FREELAND, 2005; TENEVA, 2009).

A genética moderna oferece ferramentas eficazes para a análise dos sistemas biológicos, que são imprescindíveis no entendimento e compreensão desses sistemas para a assimilação dos processos naturais a fim de reproduzi-los em ambientes artificiais ou naturais com o intuito de preservar as espécies, incrementar a produção e oferecer longevidade ao processo produtivo (ANDRADE, 2014).

Melhoramento genético, ou a seleção de características específicas que possam ser reproduzidas na prole, é algo tão antigo quanto as primeiras civilizações humanas. As espigas de milho de cor amarela e sabor adocicado consumidas por nós hoje são bastante diferentes do seu provável ancestral selvagem, o teosinte. A domesticação do milho começou há 6.000 anos no sudeste do México e os Maias pré-colombianos já consumiam variedades de milho melhoradas por eles mesmos (BRANDÃO e FERREIRA, 2009). A manipulação genética é realizada com o intuito de ressaltar ou inibir características fenotípicas por meio da manipulação do genótipo, podendo ser realizada por simples seleção de indivíduos com características as quais se deseja ressaltar ou por manipulação *in vitro* do DNA dos organismos que se deseja modificar (MENK e VENTURA, 2007).

A variabilidade genética é necessária para a continuidade evolutiva, pois pode ser entendida como o conjunto de genes diferentes presentes em organismos de

uma mesma espécie (ANDRADE, 2014). Quanto maior for a variabilidade genética de uma população, maior será sua adaptabilidade, sendo assim, quanto maior for a variabilidade genética de uma população, maiores serão as chances dessa se perpetuar. Portanto a variabilidade genética é o fundamento de toda biodiversidade. A variação genética é originada por mutação e intensificada por mecanismos recombinatórios e sexuais, se manifestando inicialmente no nível genotípico e dependendo da condição do habitat essa mutação pode se apresentar também no fenótipo (GONÇALVES, 2010).

Um fator relevante no estudo de variabilidade genética é a interação do genótipo com o meio, trata-se da comunicação do DNA com o ambiente, essa comunicação ativa dispositivos de adaptabilidade do organismo por modificação do genótipo e conseqüentemente no fenótipo (KANG, 1998). Portanto, uma espécie com boa produtividade em um ambiente pode não apresentar o mesmo desempenho em um ambiente diferente por já estar adaptada ao primeiro (BUITRAGO et al, 2009). Da perspectiva evolutiva, a interação genótipo com meio torna-se importante na manutenção da variabilidade genética e na adaptação de espécies. A compreensão dos fatores genéticos associados à evolução e à ecologia pode ser utilizada no melhoramento genético, uma vez que a seleção é um ponto comum a essas áreas (KANG, 1998). Outro fator a ser considerado no estudo da variabilidade genética é a idéia de fluxo gênico. O fluxo gênico indica a migração de genes entre populações. De acordo com Romero e Cetina (2011) a manutenção das espécies depende diretamente do comportamento do fluxo gênico e da estrutura genética populacional, fatores que refletem a heterogeneidade genética das populações.

Os organismos escolhidos como objetos de estudo nesse trabalho são as ostras do gênero *Crassostrea* que possuem nome popular de ostras do mangue, oriundas de cultivos situados em Graciosa, município de Taperoá e de Santiago do Iguape ambos na Bahia. Esses locais se distanciam por aproximadamente 100 km que é basicamente a mesma distancia de alcance das sementes de ostra *Crassostrea gigas* cultivadas em Santa Catarina no sul do Brasil (MELO, 2010).

Definidas como moluscos bivalves, filtradores, pertencentes a família *Ostreidae* (RIOS, 1994) as ostras são utilizadas como fonte de alimento desde a

antiguidade. Contudo, a atividade de ostreicultura iniciou-se no século XIX na França, através de cultivos em balsas flutuantes (MARQUES, 1997).

As ostras são organismos que apresentam crescimento rápido e são encontradas em várias partes do mundo inclusive em todo o litoral baiano (SILVA, 2007). A atividade extrativista sobre os estoques de ostras nativas no Brasil evidencia a existência de recursos naturais que têm potencialidades para exploração econômica, o clima tropical do litoral da Bahia viabiliza o cultivo e o torna uma boa opção de geração de alimento e renda (SILVA, 2007; GRADVOHL, 2014).

Na reprodução das ostras ocorre a liberação de óvulos e espermatozoides na água, pelas fêmeas e pelos machos, respectivamente. Os óvulos quando fecundados eclodem dando início a fase larval, pelágica, movimentando-se através das correntes, que possibilitam o deslocamento dos indivíduos (MELO, 2010). Nessa fase as ostras são denominadas sementes (POLI, 2006).

O cultivo de ostras consiste basicamente em coletar as sementes na natureza ou adquiri-las de laboratórios produtores, acondicioná-las em uma espécie de gaiola chamada de lanterna e mantê-las em água livre de contaminação e com boa quantidade de matéria orgânica, essa última será filtrada e utilizada como alimento. A identificação das espécies de ostras na fase de semente é importante para determinar a disponibilidade de larvas no ambiente, devem-se selecionar os pontos mais adequados para captação de larvas e subsidiar atividades de cultivo adequadas à espécie na região (SIQUEIRA, 2008); as condições ideais para o crescimento das ostras mantidas nas lanternas são oferecidas pelo ambiente, o local de cultivo será determinado pelas condições naturais do local a ser escolhido pelos produtores (POLI, 2006).

Na costa brasileira o cultivo de ostras da espécie *Crassostrea* spp. (Figura 01) tem um grande potencial de desenvolvimento, devido à extensão do litoral aliado às características oceanográficas favoráveis (POLI, 2006; SIQUEIRA, 2008).



Figura 01: Espécimes de *Crassostrea* spp coletadas em Santiago do Iguape.

Fonte: Acervo do autor

O Brasil possui diversos recursos naturais, dentre eles as ostras *Crassostrea* spp, todavia, é um país que carece de desenvolvimento de pesquisa que permita o melhor aproveitamento dessa riqueza no sentido de se extinguir os grandes problemas sociais e diferenças econômicas existentes (SIQUEIRA, 2008). A implantação de uma ostreicultura melhorada com a utilização das novas tecnologias disponíveis incluindo a genética, utilizando espécies nativas pode diminuir a pressão sobre as populações naturais e concomitantemente elevar a produtividade. Além de melhorar a renda das comunidades, pois a atividade beneficia os pescadores artesanais, promovendo a permanência desses no local de origem através da geração de empregos e renda (PEREIRA et al, 2000; SIQUEIRA, 2008). O cultivo de ostras gera maior receita do que o de outros moluscos por necessitar de pouca ou quase nenhuma mão de obra, embora haja algum custo de implantação. Devido a esse fator a procura pela atividade na forma comercial tem aumentado (SEBRAE, 2010).

De acordo com o boletim de estatística divulgado em 2012 pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA) a captura de ostras no Brasil no ano de 2011 foi de 1.233,7 t. Já a produção de cultivos no Brasil em 2011 somou 2.538,4 t de ostras (MPA, 2012).

O plano de desenvolvimento para a aquicultura brasileira – 2015/2020 lançado em 2015 pelo MPA prevê investimento da ordem de R\$500.000.000,00 na

aquicultura brasileira e estipula a meta de incremento da produção nacional de ostras em 10.000 toneladas até 2020 (MPA, 2015). As espécies exploradas nos cultivos brasileiros são representadas em grande parte pela *Crassostrea gigas*, que apresenta grande produção no sul do Brasil, porém, essa é exótica e só se adapta em águas com temperaturas mais amenas (MELO, 2010). A ostra nativa *Crassostrea* spp carece, ainda, de tecnologia que permita melhor desenvolvimento em seu cultivo (GRADVOHL, 2014). A genética pode e deve ser utilizada continuamente no sentido de se incrementar a produção uma vez que se trata de uma ferramenta eficaz para melhorar diversas variáveis tais como velocidade de crescimento e sobrevivência (PEREIRA, 2000). A ostra nativa é bem aceita pelo mercado consumidor, portanto fatores como variabilidade e melhoramento genético devem estar presentes na pauta de quem busca ampliar e se profissionalizar na atividade de ostreicultura (SIQUEIRA, 2008).

A atual situação do gênero *Crassostrea* no Brasil justifica os estudos e esforços no sentido de se obter um incremento nas informações acerca da biologia das espécies nativas para garantir o amplo conhecimento dos estoques naturais capazes de se perpetuarem e promover um correto manejo dos mesmos em condições de cultivo de forma maximizada tornando cada vez mais viável e promissora a atividade de ostreicultura (GRADVOHL, 2014).

Além dos fatores já citados, existe a preocupação com a manutenção dos estoques naturais de ostra, pois são de grande importância no ambiente por serem organismos filtradores e fazerem parte da subsistência de populações ribeirinhas, se mostrando como uma boa fonte de proteína para pessoas que, na maioria das vezes, dependem exclusivamente de atividades de pesca para prover as necessidades proteicas. Nesse contexto se faz presente a preocupação com a manutenção da espécie pela preservação da variabilidade genética dos estoques, pois essa é a base da conservação de espécies (YEEH et al, 1996; CASTRO, 2009).

O desafio quando se trata de atividades de cultivo é construir ferramentas capazes de extrair informações dos sistemas biológicos e depois aplicá-las no mesmo sistema com a intenção de maximizar o desenvolvimento desses organismos, portanto a aplicação de métodos de marcadores moleculares, sequenciamento de DNA e comparação da variabilidade genética podem e devem

ser utilizados no sentido de se obter êxito no cultivo, seja ele com fins comerciais ou de preservação ambiental (TENEVA, 2009).

Um dos estudos que pode auxiliar no aumento da produção é a identificação da variabilidade genética das espécies (BORÉM e CAIXETA, 2009). Uma das técnicas utilizadas para esse fim utiliza marcadores moleculares. Dentre os marcadores utilizados para fins de estudos populacionais estão os microssatélites.

A técnica de microssatélites identifica regiões do genoma que contêm número variável entre uma a cinco bases de repetições em tandem (HILLIS et al., 1996). São classificados em quatro grupos: 1) compostos (GAGAGAATATATAT); 2) imperfeitos (AGAGAGTGAGAG); 3) interrompidos (AGAGCCCAGAG) e 4) perfeitos (ACACACACACAC). Tais regiões são amplificadas via PCR e são úteis em estudos genéticos por serem altamente polimórficos e estarem amplamente distribuídos pelo genoma, os microssatélites vem sendo empregados em estudos de âmbito populacional e comportamental de diferentes espécies (BORÉM e CAIXETA, 2009).

A técnica ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) utiliza *primers* com sequências repetitivas entre microssatélites (PIE et al, 2006). Entende-se Primer como o próprio marcador molecular. A técnica ISSR se baseia na amplificação via PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de regiões flangeadoras de microssatélites, para isso utiliza um único *primer* com quatro repetições em tandem. A amplificação via PCR foi desenvolvida em meados da década de 80 pelo pesquisador britânico Kery Mulis, ele descobriu um processo simples de multiplicar *in vitro*, de forma exponencial a quantidade de DNA de uma amostra. A reação é baseada em ciclos repetidos de replicação da molécula de DNA. Cada molécula gerada em um processo serve como DNA molde no processo subsequente, os desoxiribonucleotídeos (DNTP) fornecem os complementos, ou seja, as bases correspondentes para a formação das novas moléculas de DNA (BORÉM e CAIXETA, 2009). Segundo Matioli e Passos-Bueno (2012), o desenvolvimento da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR) aumentou muito a eficiência de detecção de variações genéticas surgidas por consequência de mutações, polimorfismos, no nível do DNA.

Os *primers* ISSR com sequências tetranucleotídicas constituem marcadores estáveis, sendo eficientes na produção de padrões polimórficos informativos intraespecíficos e interespecíficos uma vez que amplificam regiões que se encontram entre dois blocos de microssatélites. Esses fragmentos amplificados constituem marcadores estáveis e com pouca variação intraespecífica, enquanto são frequentemente encontrados polimorfismos interespecíficos, produzindo marcadores espécie-específicos (CASTRO et al, 2009). Marcadores ISSR são recomendados para análises genéticas obtendo-se resultados confiáveis devido a sua abundância e dispersão no genoma, sendo marcadores de alta reprodutibilidade, com locos polimórficos em quantidades satisfatórias e por apresentarem rapidez em seus resultados com custos menores em comparação aos outros marcadores (RODRIGUES, 2010). A vantagem do marcador ISSR está no fato de que a taxa evolutiva de mudanças é consideravelmente mais alta do que em qualquer outro tipo de marcador de DNA, aumentando a probabilidade de polimorfismo nessas sequências (REDDY et al, 2002; ANDRADE, 2014).

Espera-se que o levantamento realizado neste trabalho possa contribuir com informações consistentes sobre as populações de ostras nativas brasileiras permitindo sua preservação e cultivo de forma mais efetiva, contribuindo no avanço da ostreicultura da ostra do mangue de forma comercial. Como já ocorre com o cultivo da *Crassostrea gigas* no estado de Santa Catarina (MELO, 2010).

2. OBJETIVO GERAL

- Apresentar informações acerca da caracterização genética de espécies do gênero *Crassostrea* cultivadas na região de Graciosa pertencente ao município de Taperoá, Bahia (13°33'59.5"S, 38°57'28.6" O), e Santiago do Iguape (12°41'04.18" S, 38°51'39.15" O), banhado pela baía do Iguape, povoado pertencente ao município de Cachoeira, Bahia, utilizando marcadores ISSR.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a variabilidade genética entre as populações amostradas na região de Taperoá e Santiago do Iguape, utilizando marcadores ISSR.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletados 33 exemplares de ostra do gênero *Crassostrea* provenientes de Graciosa, sub-região do baixo sul, município de Taperoá, Bahia e 33 provenientes de Santiago do Iguape, banhado pela baía do Iguape, povoado pertencente ao município de Cachoeira, Bahia (Figura 02).



Figura 02 – Mapa do estado da Bahia indicando os pontos de coleta de *Crassostrea* spp realizadas no estudo. Fonte: INPE e Libra Developmentseed

O período de investigação foi compreendido entre agosto de 2013 e agosto de 2014. As ostras foram obtidas de cultivos particulares (Figuras 03, 04, 05 e 06) e foram transportadas vivas ao Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos (LAGOA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.



Figuras 03, 04, 05 e 06: Coleta de ostras *Crassostrea spp.* em Santiago do Iguape, BA. Fonte: Acervo do autor

Já no laboratório foi retirado $\sim 1\text{cm}^3$ de material biológico proveniente do músculo adutor de cada exemplar. Foi utilizado o protocolo Fenol-clorofórmio, descrito por Sambrook et al (1989), para extração de DNA total a partir de tecido de organismos aquáticos como descrito no Quadro 01.

Quadro 01: Método de extração de DNA total a partir de tecido de organismos aquáticos descrito por Sambrook et al (1989)

Passo	Diretriz
01	Colocar um pequeno pedaço de tecido que já estava fixado em álcool em um micro tubo tipo eppendorf. Cortar em pequenos pedaços, com o cuidado de lavar com água destilada e secar as tesouras e pinças utilizadas antes de passar para outra amostra (evitar contaminação) e deixar 2h na estufa a 37° C para retirar o excesso de álcool da fixação.
02	Adicionar o tampão de extração: 4µl (microlitros) de Tris-Cl 1M pH 8,0 + 160µl de EDTA 0,25M Ph 8,0, em cada tubo eppendorf.
03	Adicionar 20 µl de SDS 10% (espécie de sabão para limpar o material).
04	Nessa etapa completa-se com 216 µl de água destilada.
05	Levar a estufa a 37° C por uma hora.
06	Colocar 2 µl de Proteinase K (20µl/ml), deixar overnight.
07	Adicionar de 1 volume de fenol – agitar durante 15 min; (+ ou – 400 µl).
08	Centrifugar por 5 min. a 6000 RPM; em outro tubinho conservar o sobrenadante.
09	Por 1 volume de fenol de igual valor (+ ou - 350 µl) – agitar durante 15 min.
10	Centrifugar por 5 min. a 6000 rpm; em outro tubinho conservar o sobrenadante (retirar agora 300 µl) e descartar o material que precipitou (de baixo).
11	Por um volume de igual valor de Álcool isoamílico-clorofórmio (1:20), (agora 300 µl) e agitar por 15 min.
12	Centrifugar por 10 min a 6000 rpm; em outro tubinho conservar o sobrenadante (retirar agora 250 µl) e descartar o material que precipitou (de baixo).
13	Por NaCl 6M em um volume correspondente a 10% do volume final.
14	Agitar cuidadosamente.
15	Por etanol absoluto gelado em um volume correspondente a 2,5 x o volume que ficou no tubo; Agitar cuidadosamente e verificar se forma a nuvem de DNA.
16	Centrifugar por 5 min a 13000 rpm
17	Lavar com etanol a 70% (+ ou – 1 ml).
18	Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm.
19	Por os tubinhos de ponta cabeça para secar em papel de filtro e deixar overnight.
20	No dia seguinte diluir em TE (tampão) +/- 100 µl, deixar 48 h na estufa a 37° C para diluir bem o DNA.
21	Levar ao espectrofotômetro para medir a concentração e o volume de cada amostra.
22	Verificar a necessidade de se aplicar RNase em alguma amostra que não se apresente satisfatoriamente.
23	Estocar em freezer a -20° C.

O processo de extração, realizado no laboratório, teve duração variando entre 04 e 05 dias, pois é um protocolo trabalhoso composto por um grande número de etapas. Decorrida a extração, a presença do DNA nas amostras foram checadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio (2 μ L). Devidamente preparadas as amostras foram levadas a corrida eletroforética, foi utilizado 70 V e 500 mA, por 45 minutos. A foto-documentação do gel foi efetuada através do transluminador UV L.PIX Loccus Biotecnologia – Molecular Imaging acoplado a um computador contendo o *Software* com o mesmo nome (Figura 07), obtendo-se desta forma a confirmação indicando a presença ou não de DNA nas amostras pela visualização da fotografia gerada.

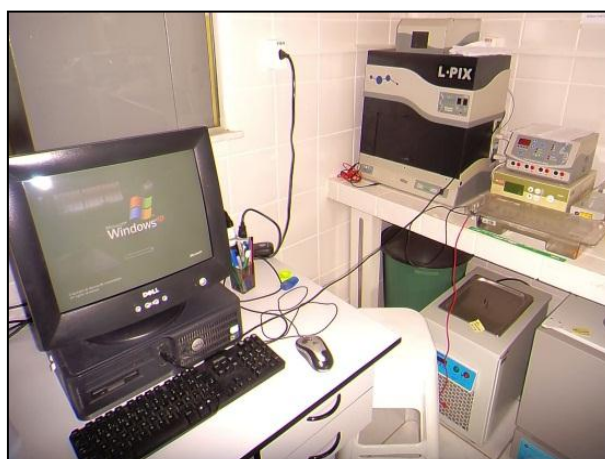


Figura 07: Transluminador UV L.PIX Loccus Biotecnologia – Molecular Imaging acoplado ao computador. Utilizado para a foto-documentação do gel.

Fonte: Acervo do autor

As amostras de DNA selecionadas foram diluídas novamente a taxa de 1: 20 μ l e submetidas ao processo de amplificação pela reação em cadeia de polimerase (Figura 08), esse processo é realizado com a utilização do equipamento Termociclador Veriti da marca Applied Biosystems (Figura 09), empregando-se *primers* tetranucleotídicos de sequência repetitiva simples (ISSR - *Inter Simple Sequence Repeats*).



Figura 08: Amostras sendo levadas ao termociclador.

Fonte: Acervo do autor



Figura 09: Termociclador Veriti (Applied Biosystems), em processo de PCR.

Fonte: Acervo do autor

Foram testados 12 *primers* ISSR (Tabela 01), desses foram escolhidos os cinco por se apresentarem mais informativos para posterior utilização na execução do PCR em todas as amostras. O tipo de marcador foi escolhido tendo em vista suas características, de acordo com Rodrigues (2010), esse tipo de marcador é recomendado para análises genéticas obtendo-se resultados confiáveis com rapidez em seus resultados e com custos menores.

Tabela 01: Relação dos *Primers* ISSR testados e das temperaturas de anelamento utilizadas

Número do <i>Primer</i>	Sequencia de bases do <i>Primer</i>	Temperatura °C
ISSR 10	(GA)8YG	54 e 56
ISSR 11	(CT)8RA	54 e 56
ISSR 12	(AC)8YG	54 e 56
ISSR 13	GGACGGACGGACA	54 e 56
ISSR 14	GGACGGACGGACC	54 e 56
ISSR 15	GGACGGACGGACT	54 e 56
ISSR 16	AACCAACCAACCAACC	54 e 56
ISSR 17	GGACGGACGGACGGAC	54 e 56
ISSR 18	TAGGTAGGTAGGTAGG	54 e 56
ISSR 19	GACAGACAGACAGACA	54 e 56
ISSR 20	GGATGGATGGATGGAT	54 e 56
ISSR 21	AAGCAAGCAAGCAAGC	54 e 56

Dentre os doze *primers* testados, foram escolhidos aqueles que apresentaram melhor amplificação assim como as temperaturas de anelamento; dispostos na Tabela 02.

Tabela 02: Relação dos *Primers* ISSR e das temperaturas de anelamento utilizados no trabalho

Número do <i>Primer</i>	Sequencia de bases do <i>Primer</i>	Temperatura °C
ISSR 14	GGACGGACGGACC	56
ISSR 15	GGACGGACGGACT	56
ISSR 17	GGACGGACGGACGGAC	56
ISSR 19	GACAGACAGACAGACA	56
ISSR 21	AAGCAAGCAAGCAAGC	56

Em cada microtubo foi adicionado 30 µL da mistura de reação de PCR composta pelos reagentes relacionados na Tabela 03. Os estágios do processo de PCR e suas respectivas temperaturas de execução estão dispostos na Tabela 04.

Tabela 03: Reagentes componentes da mistura de reação de PCR utilizada e seus volumes respectivos

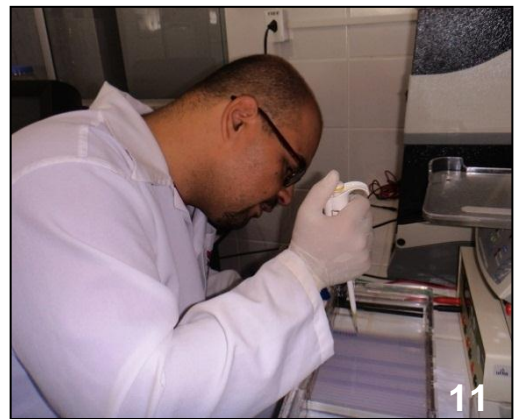
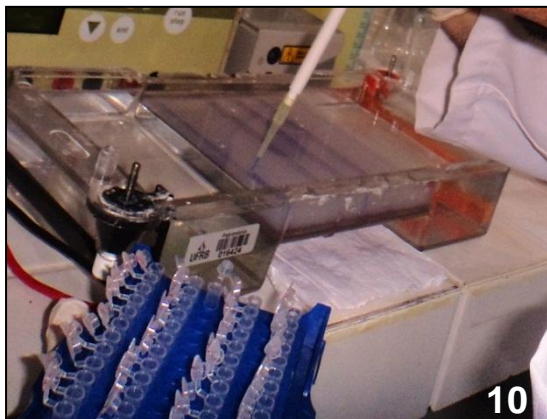
Reagente	Volume (µL)
H2O MQ	14,65
MgCl ₂	2,5
MgCl ₂ Buffer	2,5
dNTPs	5,0
Taq DNA <i>polymerase</i> (Invitrogen, Carlsbad, CA)	0,25
<i>Primer</i>	2,5
Solução DNA	3,0
Total	30

Tabela 04: Estágios do termociclador para realização do PCR das amostras de DNA para os *primers* escolhidos

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1
Amplificação	--	--	--
Desnaturação	94°C	40 segundos	30
Anelamento	56°C	40 segundos	35
Extensão	72°C	1 minuto	30
Extensão final	72°C	4 minutos	1
Resfriamento	4°C	Indeterminado	∞

Decorrido o tempo de permanência no termociclador as amostras foram retiradas desse e receberam o azul de bromofenol para que se tornassem visíveis refletindo parte da luz branca na faixa do azul marinho, essa visualização é imprescindível no processo subsequente.

Em seguida as amostras foram levadas a corridas eletroforéticas em gel de agarose a 2,0%, em tampão TBE 1x, corados com 4 µL de brometo de etídio e levadas à cuba de eletroforese (Figuras 10 e 11). As corridas eletroforéticas (Figura 12) ocorreram com voltagem de 60 V e 100 mA durante duas horas e quarenta e cinco minutos. Depois dessa etapa as placas do gel de agarose uma por vez foram expostas à luz ultravioleta e fotografadas em sistema de foto documentação de gel. As bandas de ISSR reproduzíveis foram fotografadas e avaliadas como ausente ou presente para cada um dos indivíduos analisados. Com a posse de todas as fotografias obtidas no processo de fotodocumentação, contemplando os cinco *primers* ISSR utilizados com 33 amostras de cada local de coleta montou-se as tabelas de códigos binários que foram utilizadas na estatística molecular. A tabela de códigos binários construída utiliza como base a presença ou ausência de bandas reproduzíveis do marcador dominante visualizadas nos géis de agarose admitindo um (1) para presença e (0) para a ausência de banda.



Figuras 10 e 11: Amostras sendo acondicionadas no gel de agarose para corrida eletroforética.

Fonte: Acervo do autor

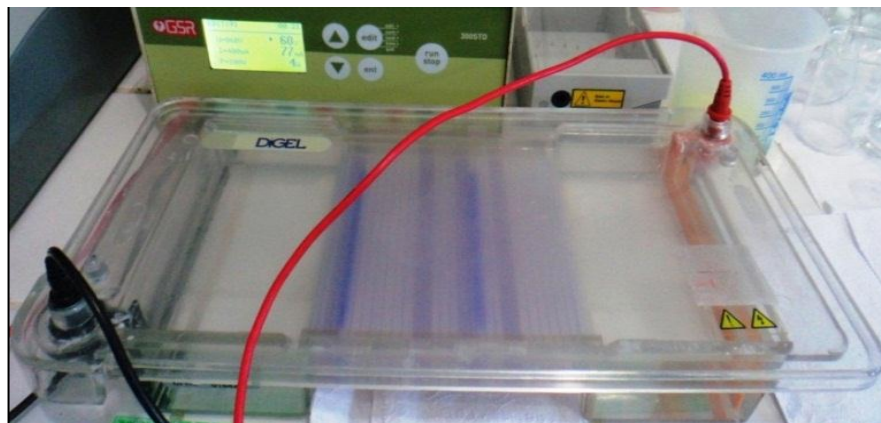


Figura 12: Cuba com o gel de agarose contendo as amostras em processo de corrida eletroforética.

Fonte: Acervo do autor

Para avaliar a variação significativa entre as populações do estudo, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA; Excoffier et al, 1992) através do programa computacional ARLEQUIN 3.01.

A avaliação do fluxo gênico (N_m), diversidade genética (G_{ST}), Diversidade de gene de Nei (H), índice de Shannon (I) e Porcentagem de bandas polimórficas (PBP) foi realizada no programa POPGENE versão 1.32. O dendrograma foi obtido com base na distância genética de Nei (1978) pelo método par a par de médias ponderadas (UPGMA), com 1000 permutações de *bootstrap* com o uso do programa computacional MEGA 6.06 (Tamura et al, 2013).

5. RESULTADOS

As ostras coletadas tanto em Graciosa quanto em Santiago do Iguape apresentaram bom estado de saúde aparente, chegaram vivas ao laboratório e ofereceram boa quantidade de material biológico, proporcionando boas condições de extração de tecido muscular o que possibilitou uma formação adequada de um banco de tecidos de segurança caso fosse necessário a realização de repetições do processo de extração de DNA celular. Esse material encontra-se no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos (LAGOA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, mantido em álcool e refrigerado de forma a atender a trabalhos posteriores ou mesmo a desdobramentos do trabalho aqui descrito.

O método para extração de DNA descrito por Sambrook et al (1989) mostrou-se eficiente e ofereceu amostras com boa quantidade e qualidade de DNA. Embora seja um processo meticuloso, composto por muitas etapas, devendo ser realizado com o máximo de atenção.

Os resultados obtidos na verificação da presença de DNA nas amostras realizada por meio da corrida eletroforética foram positivos, ou seja, foi verificado que realmente conseguiu se extrair DNA dos tecidos de *Crassostrea* spp utilizadas no trabalho validando, portanto, o método proposto por Sambrook et al (1989). Pode-se observar nas Figuras 13 e 14 a presença de DNA nas amostras atendendo ao pré-requisito para ascender a etapa posterior.

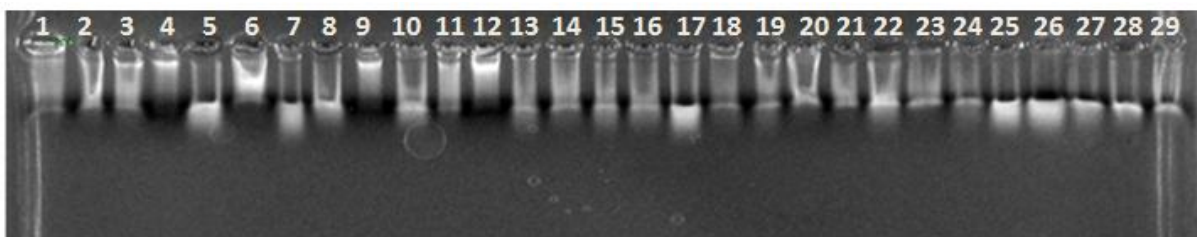


Figura 13: Gel de agarose a 2% contendo as amostras de 01 a 29 coletadas em Graciosa, BA, para a checagem da presença de DNA.

Fonte: Acervo do autor

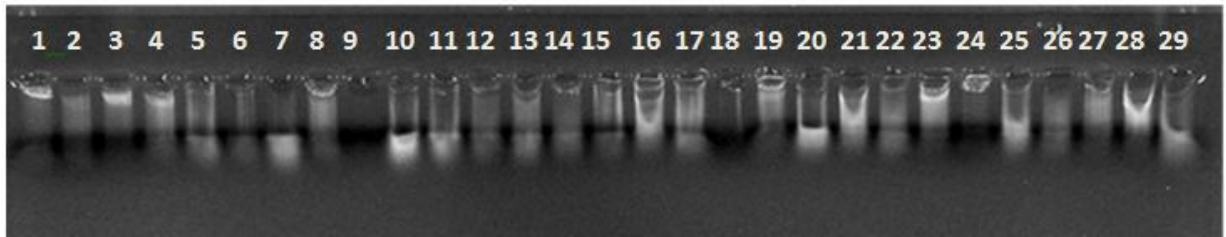


Figura 14: Gel de agarose a 2% contendo as amostras de 01 a 29 coletadas em Santiago do Iguape, BA, para a checagem da presença de DNA.

Fonte: Acervo do autor

As Figuras 15 e 16 apresentam os perfis dois dos géis realizados no desenvolvimento do trabalho utilizando o primer ISSR 21 nas amostras de ostra coletadas em Santiago do Iguape e Graciosa -BA, evidenciando um perfil de bandas gerados para a avaliação proposta no estudo.

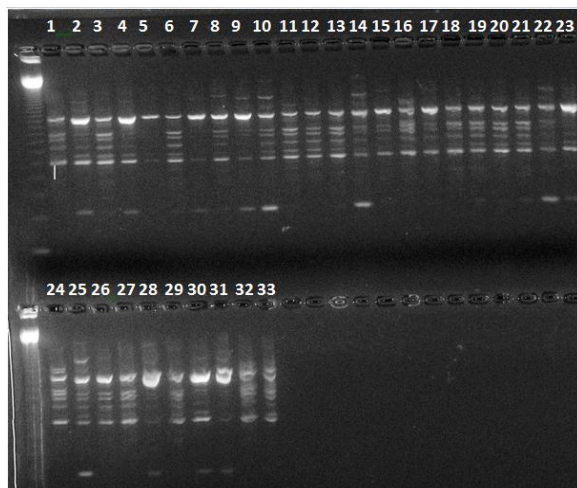


Figura 15: Perfil de eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando o *primer* ISSR 21 em 33 amostras de *Crassostrea* spp coletadas em Santiago do Iguape, BA.

Fonte: Acervo do autor

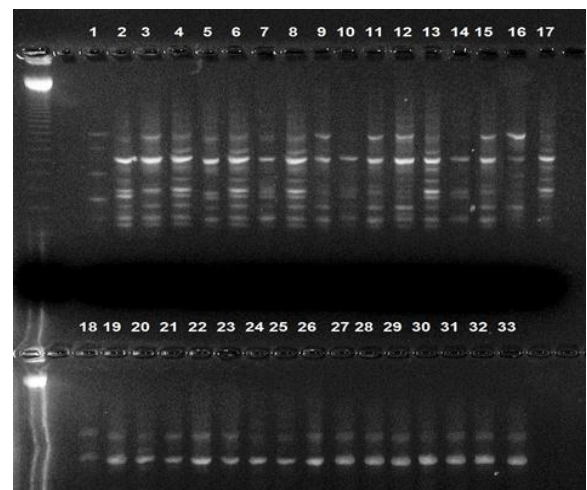


Figura 16: Perfil de eletroforese em gel de agarose a 2% utilizando o *primer* ISSR 14 em 33 amostras de *Crassostrea* spp coletadas em Graciosa, BA.

Fonte: Acervo do autor

5.1 Análise estatística

Utilizando-se como base os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) e o índice de fixação da população total (F_{ST}), presentes na Tabela 05 observa-se que 81,35 % da variação total encontra-se dentro das populações e 18,65 % entre as populações, portanto há maior variação genética dentro das populações do que entre as populações com significância estatística. Observa-se também o Índice de fixação população total de 0,18646.

Tabela 05: Análise de variância molecular dentro e entre as populações da espécie *Crassostrea* spp.

Fontes de Variação	Grau de Liberdade (gl)	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual de variação
Entre populações	1	66.076	1.76848 Va	18.65%
Dentro das populações	64	493.818	7.71591 Vb	81.35%
Total	65	559.894	9.48439	

*Índice de fixação População total $F_{ST}=0,18646$

Na Tabela 06, estão apresentados os resultados referentes as medidas de comparação de distância genética de Nei (1972) das populações do estudo. Foi observado que as medidas para comparação da distância genética variaram de 0,0521 a 0,9493, o valor máximo estimado da distância de Nei ficou entre a população de cultivo de Graciosa e o valor mínimo em Santiago do Iguape.

Os resultados presentes na Tabela 07 indicam que o índice de Shannon (I) apresenta que a diversidade entre as populações variou de 0,4177($\sigma\pm 0.2151$) na população de Graciosa e 0,3500 ($\sigma\pm 0.2399$) para a população de Santiago do Iguape.

A média de diversidade genética de Nei teve variação entre 0,2700 ($\sigma\pm 0,1627$) e 0,2233 ($\sigma\pm 0,1755$) sendo a menor média apresentada pelas amostras de cultivo de Santiago do Iguape e a maior média pelas de Graciosa. O valor inferido no número de alelos observados encontra-se entre 1,9216 ($\sigma\pm 0,2715$) para Graciosa e 1,8627 ($\sigma\pm 0,3475$) para Santiago do Iguape. Para o número de alelos efetivos a população de Graciosa apresentou 1,4407($\sigma\pm 0,3304$) e a população de

Santiago do Iguape, uma vez mais, apresentou valores menores, da ordem de 1,3619 ($\sigma \pm 0,3419$).

Com base na Tabela 08 observou-se que a diversidade genética total (H_T) para todas as populações foi de 0,2659 ($\sigma \pm 0,0206$) e a diversidade esperada (H_s) 0,2466 ($\sigma \pm 0,0177$). A diferenciação genética estimada pela média (G_{ST}) resultou em 0,0725 e o número de migrantes nas populações indicado pelo fluxo gênico, resultou 6,3929.

Tabela 06: Distância genética de Nei (1972) (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) por comparação par a par entre as populações cultivadas da espécie *Crassostrea* spp.

Cultivo	Graciosa	Santiago do Iguape
Graciosa	****	0.9493
	0.0521	****

Tabela 07: Diversidade genética entre populações cultivadas da espécie *Crassostrea* spp.

Cultivo	na	ne	H	I	n° de loci polimórficos	% de loci polimórficos
Graciosa	1,9216 ($\sigma \pm 0.2715$)	1,4407 ($\sigma \pm 0.3304$)	0,2700 ($\sigma \pm 0.1627$)	0,4177 ($\sigma \pm 0.2151$)	47	92,16
Santiago do Iguape	1,8627 ($\sigma \pm 0.3475$)	1,3619 ($\sigma \pm 0.3419$)	0,2233 ($\sigma \pm 0.1755$)	0,3500 ($\sigma \pm 0.2399$)	44	86,27

*na = número de alelos observados

*ne = número efetivo de alelos

*H = diversidade genética de Nei (1972)

*I = índice de informação de Shannon

Tabela 08: Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional (G_{ST}) e fluxo gênico (N_m) entre populações cultivadas da espécie *Crassostrea* spp

	H_T	H_S	G_{ST}	N_m
População total	0.2659 ($\sigma \pm 0.0206$)	0.2466 ($\sigma \pm 0.0177$)	0.0725	6.3929

* H_T = diversidade total

* H_S = diversidade esperada

* G_{ST} = diferenciação populacional

* N_m = estimativa do fluxo gênico

Observa-se na Tabela 09 que a porcentagem de Polimorfismo chegou a 92,16% nas amostras de Graciosa, provocado pela localização de 47 locos polimórficos e a 86,27% nas amostras de Santiago do Iguape correspondentes a presença de 44 locos polimórficos.

Tabela 09: Polimorfismo das populações da espécie *Crassostrea* spp. Analisadas no trabalho.

	Número de polimorfismo	Porcentagem de polimorfismo %
Graciosa	47	92.16
Santiago do Iguape	44	86.27

A análise de agrupamento gerou o dendrograma exposto na Figura 16, agrupando as populações de Graciosa e Santiago do Iguape no mesmo clado.

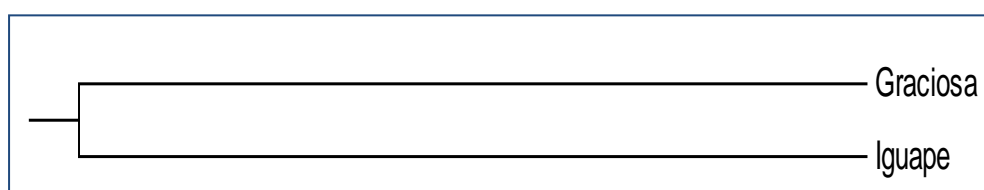


Figura 17: Dendrograma derivado através de UPGMA (Unweighted pair group method, arithmetic mean) das duas populações cultivadas de *Crassostrea* spp baseado na distância genética de Nei (Nei, 1972)

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que as técnicas genéticas utilizadas foram capazes de atender parte das perguntas realizadas, sanando a maioria os questionamentos impulsores do estudo. Esse fato vai ao encontro do que afirmou Varela et al (2007), segundo ele a genética moderna é imprescindível no entendimento e compreensão dos sistemas biológicos permitindo a assimilação dos processos naturais a fim de reproduzi-los em ambientes artificiais ou naturais com o intuito de preservar as espécies, incrementar a produção e oferecer longevidade ao processos produtivos.

Os marcadores ISSR foram aplicados com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre as populações de *Crassostrea* spp de duas populações de cultivo localizadas em Graciosa e Santiago do Iguape. Através dos resultados obtidos no trabalho pode-se inferir que os marcadores moleculares utilizados se mostraram eficientes na geração de informações sobre as populações de *Crassostrea* spp. De acordo com Andrade (2014) no marcador ISSR a taxa evolutiva de mudanças é consideravelmente mais alta do que em qualquer outro tipo de marcador de DNA, aumentando a probabilidade de polimorfismos nessas sequências. Dessa forma o marcador escolhido propiciou o cumprimento dos objetivos propostos no trabalho.

Através das análises pode-se inferir que as duas populações de *Crassostrea* spp estudadas possuem baixa variabilidade entre si (18,65%), porém apresentam alta taxa de variabilidade genética (81,25%) entre os espécimes de cada população separadamente. Todavia observou-se que a diversidade genética total (H_T) foi maior que a diversidade esperada (H_S). De acordo com Alarcón et al (2004) a diversidade genética é uma importante característica de espécies que estão em processo de domesticação, pois aquelas com níveis mais elevados de diferenciação são mais propensas a apresentar atributos genéticos para características produtivas.

A diferença entre a variabilidade genética de cada população na AMOVA pode ser atribuída a interação do genótipo com o meio, pois essa interação ocorre nos organismos e provoca modificações genótípicas e fenotípicas (KANG, 1998). Fatores como diferença de salinidade e temperatura relativas às condições físico-químicas da água nos pontos de coleta poderiam ocasionar diferenças genótípicas e

fenotípicas interferindo na variabilidade genética de cada população. A interação do genótipo com o meio torna os organismos vivos passíveis a atuação de ações evolutivas como, deriva genética, processos de mutação, forças adaptativas, dentre outros que podem modificar ao longo dos anos a sua estrutura genética (KANG, 1998).

A análise de variância molecular gerou um Índice de fixação de população total (F_{ST}) de 0,18646. De acordo com Wright (1978), os valores de F_{ST} que se encontram entre 0 e 0,05 configuram baixa estruturação genética; entre 0,05 e 0,15, estruturação moderada; entre 0,15 e 0,25, estruturação alta e acima de 0,25, forte estruturação genética.

Observa-se também que a quantidade de polimorfismos encontrados para as duas populações foi alta corroborando com os resultados de Daltro (2013) que verificou a presença de grande número de polimorfismos nas amostras de ostras do gênero *Crassostrea*, coletadas na Bahia do Iguape demonstrando boa variabilidade genética nos indivíduos, características que tornam os indivíduos distantes geneticamente uns dos outros na mesma população.

Existe fluxo gênico para todos os locos das populações estudadas que foi estimado em $Nm = 6,3929$ migrantes por geração de acordo com Nei (1972). Esse dado oferece a informação de que as populações de ostra encontram-se em bom estado de heterogeneidade genética. De acordo com Romero e Cetina (2011) a manutenção das espécies depende diretamente do comportamento do fluxo gênico e da estrutura genética populacional. Melo (2010) encontrou ostras da espécie *Crassostrea gigas*, que são exóticas, fixadas a aproximadamente 100 km de seus respectivos pontos de cultivo, demonstrando a capacidade de locomoção das sementes no ambiente seja por locomoção própria ou impulsionada pelas correntes marinhas, transportando, obviamente, seus genes.

Foi constatada grande variabilidade genética intrapopulacional, esse dado corrobora com o observado por Daltro (2013) que constatou características polimórficas que tornam alguns indivíduos distantes geneticamente de outros na mesma população. Assim sendo, as duas populações de ostras oferecem a possibilidade de formação de plantel com diversidade genética oferecendo a prática de seleção de caracteres desejados pelo produtor, e de serem utilizadas em

programas de conservação e melhoramento genético, todavia, de acordo com Gradwohl (2014) o cultivo de ostras, apesar de estar sendo realizado há mais de 10 anos na região de Graciosa, ainda carece de informações que propicie que se alcance o mesmo sucesso obtido com a *Crassostrea gigas*, em Santa Catarina.

7. CONCLUSÃO

Devido a grande variabilidade genética encontrada entre as populações e ao fluxo genético existente entre elas não foi possível caracterizar geneticamente as populações de *Crassostrea* spp em separado, ou seja, não se conseguiu distinguir uma população da outra através das técnicas utilizadas no trabalho.

As populações estudadas apresentaram alta variabilidade genética intrapopulacional e alta estruturação genética, portanto oferecem a possibilidade de formação de plantel com boa diversidade genética permitindo sua utilização em cultivos e em programas de conservação.

A variabilidade mostrou ser maior entre os indivíduos de cada população do que entre as duas populações, esse fato é compreensível pela própria biologia da reprodução do organismo que lança óvulos e espermatozoides na água. Logo se sugere que sejam realizados mais estudos com pontos de coleta compreendidos geograficamente entre a região de Graciosa e Santiago do Iguape a fim de se construir um mapeamento da interação genética entre as duas populações. Sugere-se também o estudo oceanográfico com o objetivo de se identificar as correntes existentes entre os dois pontos de coleta. Esses estudos são sugeridos com o objetivo de se conseguir mais informações genéticas inerentes a essas populações o que permitirá a implementação de programas ambientais de monitoramento, cultivo, conservação e melhoramento genético. Quanto a esse último, ficou explicitado no trabalho a possibilidade de melhoramento por seleção de caracteres desejados, para tal sugere-se que os ostreicultores sejam capacitados a realizar essa seleção por programas apropriados ou mesmo por projetos de extensão da própria Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

8. REFERÊNCIAS

ALARCÓN, J. A.; MAGOULAS, A.; GEORGAKOPOULOS, T.; ZOUROS, E.; ALVAREZ, M. C. **Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*)**. *Aquaculture*, v. 230, p. 65-80, 2004.

ALVAREZ, M.; **O contributo da genética para a evolução do pensamento evolutivo** Centro de Investigação em Antropologia e Saúde Departamento de Ciências da Vida Universidade de Coimbra, Portugal 2010.

ANDRADE, I. S. **Caracterização citogenética molecular e estudo da variabilidade genética por marcadores ISSR e COI na espécie *Lonchorhina aurita* (Chiroptera: Phyllostomidae)**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2014. 51f.

Banco de imagens do **Libra Development Seed**; Disponível em: <<http://libra.developmentseed.org>>. Acesso em: 20 dez 2015.

BARAHONA, A.; PIÑERO, D.; **GENÉTICA: LA CONTINUIDAD DE LA VIDA 1994**. Disponível em: <http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/125/htm/sec_3.htm>. Acesso em: 10 ago 2015.

BORÉM, A.; E CAIXETA. E.T. **Marcadores Moleculares**, 2^o Ed, Viçosa: UFV, 2009.

BRANDÃO, G. O.; FERREIRA, L. B. M.; **O ensino de Genética no nível médio: a importância da contextualização histórica dos experimentos de Mendel para o raciocínio sobre os mecanismos da hereditariedade**. *Filosofia e História da Biologia*, v. 4, p. 43-63, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura. Governo Federal: Brasília, fev. 2012. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20Estat%20C3%ADstico%20MPA%202010.pdf>. Acesso em: 20 Fev 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA. Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira - 2015/2020. Governo Federal: Brasília, 2015. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/files/docs/Outros/2015/Plano_de_Developolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf>. Acesso em: 06 Fev 2016.

BRASIL; INPE Banco de Imagens. Disponível em:< [http://www.dgi.inpe.br/CD SR/](http://www.dgi.inpe.br/CD%20SR/)> Acesso em: 20 Dez 2015.

BITRAGO, E.; BITRAGO, J.; FREITES, L.; LODEIROS, C. **Identificación de factores que afectan al crecimiento y la supervivencia de la ostra de mangle, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), bajo condiciones de cultivo suspendido en la laguna de La Restinga, Isla de Margarita, Venezuela.** Zootecnia Tropical, Maracay, v. 27, n. 1, p. 79-90, 2009.

CASTRO. N. K. AVANZI, V. M; GUEDES A. S; OLIVEIRA A.V; **Análise Genética de Espécies do Gênero *Hypostomus sp.* do Rio Ivaí, Através de Marcadores Moleculares ISSR;** EPCC 2009; ISBN 978-85-61091, 2009.

DALTRO, A. C. **Aspectos Socioeconômicos e Qualidade dos Moluscos Bivalves Através do Monitoramento Microbiológico e Genético.** Tese (Mestrado), 117p. Cruz das Almas; Bahia; Maio. 2013.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. **Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data.** *Genetics*, v. 131, p. 479-491, 1992.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology.** Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. PMCid:548581. 2005.

GONÇALVES, P.H.P. **Análise da variabilidade genética de uma pequena população de Frieseomelitta varia (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) por meio de análise do DNA mitocondrial, microssatélites e morfometria geométrica das asas.** Dissertação de Mestrado-Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2010.

GRADVOHL, M. P. G. M.; **Avaliação técnico-financeira de um cultivo da ostra-do-mangue Crassostrea brasiliana (LAMARCK, 1818) na comunidade de Graciosa, município de Taperoá, Bahia.** 71 ft; Tese (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza: 2014.

HILLIS, D. M.; CRAIG, M.; MABLE, B. K. **Molecular Systematics**, Second Edition. Canada. Copyright, 1996.

KANG, M.S. **Using genotype-by-environment interaction for crop cultivar development.** *Advances in Agronomy*, v.62, p.199-252, 1998.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. **Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos.** In: Matioli, S. R.; Fernandes, F.M.C.(Org.).

Biologia molecular e evolução. 2 ed. Ribeirão Preto: Holos, editora, 2012, p. 181-190.

MARQUES, H.L.A. **Criação comercial de mexilhões: Métodos e etapas, a produção e seus custos, a colheita e a comercialização**. São Paulo: Nobel. 111 p., 1997.

MENCK. C. F. M.; VENTURA . A. M.; Manipulando genes em busca de cura: o futuro da terapia gênica. **Revista USP**, São Paulo, n.75, p. 50-61, setembro/novembro 2007. Disponível em:< <http://www.usp.br/revistausp/75/05-carlos-armando.pdf>>. Acesso em: 19 Fev 2015.

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, vol.33 no.3 São Paulo 2010.

MELO C.M.R, SILVA F.C, GOMES C.H.A.M, CAVA A.M., LAZOSKI C. ***Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil**. Biol Invasions 12:441-449. 2010.

NEI, M. **Genetic distance between populations**. Am. Nat. 106:283-292. 1972.

NEI, M. **F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations**. Ann. Hum. Genet. 41:225-233. 1978

PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; HENRIQUES, M.B.; GALVÃO, M.S.N.; BASTOS, A.A. **Avaliação do estoque da ostra *Crassostrea brasiliana* (Lamarck, 1819) no manguezal da região estuarina-lagunar de Cananéia (25°S; 48°W)**. B. Inst. Pesca, 26(1): 49 – 62, 2000.

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 brasiliana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil**. Aquac. Res., 37: 1598 – 1600, 2006.

POLI, C.R. **Cultivo de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) no Sul do Brasil**. Tese de Livre Docência. UFSC, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis, 2006. 114 p.

REDDY MP, SARLA N, SIDDIQ EA **Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding**. Euphytica, 128:9-17. Reis NR, 2002.

RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. Rio Grande, RS, Ed. Fundação Universidade Rio Grande. 1994. 368p.

RODRIGUES, J.F. **Delimitação de espécies e diversidade genética no complexo *Cattleya coccínea* Lindl. e *C. Mantiqueirae* (Flowie) Van der Berg (Orchidaceae) baseada em marcadores moleculares ISSR**. Dissertação de Mestrado, 81p. ESALQ/USP. Piracicaba, 2010.

ROMERO, F. R.; CETINA, J. T. **Discontinuidad geográfica y variabilidad genética en *Crassostrea rhizophorae* guilding del sureste de México**. Universidad y Ciencia, Villahermosa, v. 27, n. 1, p. 71-83, 2011.

SAMBROOK J, FRITSCH E.F. AND MANIATIS T. **Molecular cloning**. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989.

SEBRAE, Serviços Brasileiro de Apoio as Micros e Pequenas Empresas. - **Cultivo de Ostras em Alagoas**, Maceió. 2010. Disponível em:<
[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8acbcc340a3fd6477532f8bdf655e684/\\$File/5840.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8acbcc340a3fd6477532f8bdf655e684/$File/5840.pdf)> Acesso em: 15 mar 2015.

SIQUEIRA, K. L. F. **Avaliação do sistema de cultivo de ostra do gênero Crassostrea (SACCO, 1897) no estuário do Rio vaza-barris (Sergipe)**. 77p.UNIT, Aracaju, 2008.

SILVA, J.R.; BOEHS, G. **Ocorrência e distribuição de larvas de ostras Crassostrea rhizophorae (Guilding, 1828) na baía de Camamu, Bahia**. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu - MG. Anais. Boehs Sociedade de Ecologia do Brasil. 2007.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: **Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.06**. *Molecular Biology And Evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TENEVA, A.; **Molecular markers in animal genome analysis**. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 25(5-6), 1267-1284. Institute for Animal Husbandry, Belgrade-Zemun, University of Forestry, Bulgaria, 2009.

VARELA. E.S; BEASLEY. C.R., SCHNEIDER. H, SAMPAIO .I, MARQUES-SILVA N.S. TAGLIARO CH.; **Molecular phylogeny of mangrove oysters (Crassostrea) from Brazil**. *J Molluscan Stud* 73:229-234. 2007.

YEEH, Y.; KANG, S. S.; CHUNG, M. G. **Evaluation of the natural monument populations of *Camellia japonica* (Thearaceae) in Korea based on allozyme studies.** Botanical Bulletin of Academia Sinica, Shanghai, v. 37, n. 1, p. 141-146, 1996.