



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

LEYDIANE DA PAIXÃO SERRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* NA
RESEX MARINHA DA BAIÁ DO IGUAPE - BA, POR MEIO DE
MARCADORES ISSR**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2019**

LEYDIANE DA PAIXÃO SERRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* NA
RESEX MARINHA DA BAIÁ DO IGUAPE - BA, POR MEIO DE
MARCADORES ISSR**

Trabalho de Conclusão de Curso
submetido à Coordenação do Curso de
Graduação em Engenharia de Pesca, da
Universidade Federal do Recôncavo da
Bahia, como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia de Pesca.

Orientadora: Dr. Soraia Barreto Aguiar
Fonteles.

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
2019**

LEYDIANE DA PAIXÃO SERRA

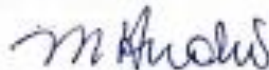
DIVERSIDADE GENÉTICA DE OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* DA
REGIÃO DE CAPANEMA - BA, POR MEIO DE MARCADORES ISSR

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: 15 de Fevereiro de 2019



Prof. Dr^a. Soraia Barreto Aguiar Fonteles
Orientadora
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr^a. Maria Vandery Andréa
Membro 1
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. Moacyr Serafim Júnior...
Membro 2
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha Família por me proporcionar amor incondicional, por ser a alegria dos meus dias e o que me motiva a buscar ser uma pessoa cada vez melhor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre presente na minha vida, me guiando e me dando forças para continuar superando as dificuldades dia após dia.

A minha mãe Alene, ao meu pai Val, pelo seu amor incondicional durante toda a minha vida, combustível principal para a concretização desse sonho.

A minha querida orientadora Dra. Soraia Fonteles, que me acolheu e me deu a oportunidade de iniciar na pesquisa, foi para mim uma segunda mãe. Muito obrigada pela paciência, pelos ensinamentos transmitidos e por caminhar comigo durante esse período de conclusão.

A toda minha família, em especial aos meus irmãos Leonardo, Leandro, Leomar e Lorena, pelo carinho e conhecimento compartilhado, por escutar mesmo sem querer os meus estudos. Pelas inúmeras resenhas e risadas, tornando fonte de inspiração para essa conquista, amo vocês! As minhas Tias Paula e Ione, pela ajuda e preocupação.

Ao meu melhor amigo que foi responsável por toda essa trajetória. A minha amiga e comadre Taís, e ao meu afilhado Neto, e o grupo de WhatsApp, da galera da fubica! que me proporciona inúmeros momentos de felicidade!

Aos professores e aos meus amigos do Curso, que se fizeram presentes até aqui. Aos colegas do LAGOA, Vitória, Joemille, Rodrigo e Nane, em especial as gatas Nane Teles e Joemille que me acolheram e não hesitaram em transmitir seus conhecimentos, me ajudando nos momentos mais difíceis, meu muito obrigada!

Ao grupo ONG RARE e a FAPESB, a CSO por fornecer os fomentos necessários para a realização desse trabalho. Ao professor Ricardo Franco Cunha Moreira pela sua contribuição com a estatística deste trabalho, As marisqueiras da comunidade, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus amigos que entraram junto comigo nessa caverna do dragão, turma de 2014, presente que a UFRB me deu! Em especial a Ângela, Muito obrigada por todos esses anos de convivência e pelos inúmeros momentos compartilhados.

E enfim, um obrigada a todos que me ajudaram direta ou indiretamente nesta jornada.

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	8
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	<i>O extrativismo</i>	11
2.2	<i>Gênero Crassostrea</i>	13
2.3	<i>Crassostrea rhizophorae</i>	16
2.4	<i>Crassostrea brasiliana</i>	17
2.5	<i>Marcadores Moleculares em Ostras</i>	18
3.	OBJETIVOS	20
3.1	<i>Objetivo geral</i>	20
3.2	<i>Objetivos específicos</i>	20
4.	MATERIAL E MÉTODO	20
4.1	<i>Área de estudo</i>	20
4.2	<i>Extração e quantificação de DNA</i>	23
4.3	<i>Caracterização molecular</i>	24
4.4	<i>Tratamento dos dados</i>	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.2	<i>Reação de PCR</i>	25
5.3	<i>Estrutura Populacional e Diversidade Genética</i>	26
6.	CONCLUSÃO	33
7.	REFERENCIAS	35

LISTAS DE ABREVIATURA

AMOVA – Analyses of Molecular Variance – Análise de Variância Molecular

BA – Bahia

DNA – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

DNTP – Desoxinucleotídeo Tri-fosfato EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAO – Food And Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

ISSR – Inter Simple Sequence Repeat – Sequências Simples Entre Repetições

PCR – Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia de Polimerase

RESEX – Reserva Extrativista da Baía do Iguape

µg – Micrograma

µL – Microlitros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Conchas de ostra do genero *Crassostrea* obtidas no estuario Vaza Barris, Sergipe, *Crassostrea brasiliana* (a), (b) e (c) e *Crassostrea rhizophorae* (d) (e) e (f). (SILVA 2015)..... 14
- Figura 2. 1 e 2- *C. rhizophorae* de coletor vista da valva superior e inferior; 3 e 4- *C. rhizophorae* de repicagem vista da valva superior e inferior. 16
- Figura 3. 1 e 2- *C. brasiliana* de coletor vista da valva superior e inferior; 3 e 4- *C. brasiliana* de repicagem vista da valva superior e inferior. 17
- Figura 4 - Mapa da localização da comunidade de Capanema, onde foram coletados os indivíduos. 22
- Figura 5: retirada do músculo adutor..... 23
- Figura 6. Dredrograma representativo da distância genética entre os 90 indivíduos coletados, obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), utilizando o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, com base em marcadores ISSR. Os indivíduos em vermelho representam os espécimes coletados em ambiente totalmente submerso (1-49), e o de preto os espécimes coletados nas raízes do mangue (50-90). 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores ISSR selecionados na análise de variabilidade genética entre ostras do gênero <i>Crassostrea</i>	26
Tabela 2. Estimativas de identidade (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) de Nei (1972) entre as populações naturais de ostra <i>Crassostrea</i> sp.....	26
Tabela 3. Diversidade genética das populações naturais de <i>Crassostrea</i> sp.	27
Tabela 4. Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional (GST) e fluxo gênico (Nm) para as populações de Ostra <i>Crassostrea</i> spp.	29
Tabela 5. Análise de variância molecular dentro e entre as populações da espécie de <i>Crassostrea</i> sp.	31

RESUMO

Moluscos bivalves do gênero *Crassostrea* sp são indivíduos que habitam as regiões estuarinas e de águas salobras. Esses animais são de grande importância para as comunidades ribeirinhas que através do extrativismo complementam a renda familiar. Esse trabalho tem como objetivo caracterizar, através de marcadores moleculares ISSR, a espécie *Crassostrea* sp, coletadas dos ambientes submerso e das raízes do mangue com o objetivo de obter maior conhecimento acerca da diversidade genética dentro e entre as populações de ostras coletadas na região de Capanema, tentando identificar a possibilidade de ocorrência de espécies diferentes do gênero *Crassostrea* nos pontos amostrados. Os 90 espécimes amostrados foram levados vivos para análise no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos (LAGOA), na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Foram realizados os procedimentos para as extrações do DNA total tendo como material biológico o músculo adutor de cada indivíduo, através do protocolo de extração de Fenol:Clorofórmio, e em seguida foi realizada a análise com marcadores moleculares. Foram utilizados um total de 6 *primers* ISSR. A análise dos padrões de bandas obtidos a partir destes marcadores foi transformada em matriz binária de presença/ausência através do programa estatístico Darwin 6, realizando o agrupamento de dissimilaridade pelo método das médias não ponderadas das distâncias genéticas. Foi possível afirmar que iniciadores tipo ISSR, foram competentes para detectar uma alta variabilidade genética intrapopulacional e alta estruturação genética. Com os resultados obtidos de identidade genética alta (0,9456) e distância genética baixa (0,0560) entre as duas populações de ostras estudadas, a média de diversidade genética de Nei (H) foi de 0,2007 ($\sigma \pm 0,18$) para os indivíduos coletadas nas raízes do mangue e 0,2154 ($\sigma \pm 0,17$) para os submersos. Não foi identificada a possibilidade de serem populações compostas por espécies diferentes. A análise de variância molecular evidenciou que 75,70% da variação total encontram-se dentro das populações estudadas e 24,30% entre as populações. Encontramos um valor de F_{ST} de 0,243, apresentando uma alta estruturação genética. Indicamos um sequenciamento de genes para a comprovação final das espécies analisadas nesse estudo. Assim, ostras coletadas fixas nas pedras (submersas) ou em raízes de mangue na comunidade de Capanema apresentaram alta variabilidade genética oferecendo a possibilidade de serem utilizadas em programas de conservação e melhoramento genético.

PALAVRAS-CHAVE: genética; marcador molecular; DNA;

ABSTRACT

Crassostrea sp are bivalve molluscs that inhabit the estuarine and brackish waters. These animals are of great importance to the riverine communities that through extractivism complement the income of these families, representing an important social role since the activity is usually carried out by autonomous workers (mostly women) or organized in associations and cooperatives that live in capture and processing of shellfish. This work aims to characterize, through ISSR molecular markers, the species *Crassostrea* sp collected from submerged environments and mangrove roots in order to obtain a better knowledge of the genetic diversity within and among the populations of oysters collected in the region of Capanema, trying to identify the possibility of occurrence of different species of the genus *Crassostrea* in the points sampled. The 90 specimens sampled were taken alive for analysis at the Laboratory of Genetics of Aquatic Organisms (LAGOA), at the Federal University of Recôncavo da Bahia (UFRB). These data include a set of information for the conservation of the species and maintenance of commercial fishing activity in the Capanema-Bahia region. The procedures for the extractions of the total DNA were carried out using the biological material of the adductor muscle of each individual, through the protocol of extraction of Phenol: Chloroform, and then analysis with molecular markers. A total of 6 ISSR primers were used. It was possible to affirm that primers type ISSR, were competent to detect a high genetic variability intrapopulacional and high genetic structuration. With the results of high genetic identity (0.9456) and low genetic distance (0.0560) between the two oyster populations studied, the mean genetic diversity of Nei (H) was 0.727 ($\sigma \pm 0, 18$) for the individuals collected in the mangrove roots and 0.2154 ($\sigma \pm 0.17$) for the submersed. The possibility of being populations composed of different species has not been identified. The analysis of molecular variance showed that 75.70% of the total variation is within the studied populations and 24.30% among the populations. We found an F_{ST} value of 0.243, presenting a high genetic structure. We indicated a gene sequencing for the final confirmation of the species analyzed in this study. Thus, oysters collected from the rocks (submerged) or mangrove roots in the community of Capanema showed high genetic variability, offering the possibility of being used in conservation and breeding programs.

Key words: Genetic variability; Bivalve molluscs; DNA;

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma extensa área de manguezal a qual se destaca mundialmente. É no mangue onde muitas famílias das comunidades retiram seu sustento por meio da pesca artesanal e de subsistência, como fonte de renda necessária à sua sobrevivência (SILVA, OLIVEIRA e NUNES, 2007). A produção brasileira de moluscos bivalves, segundo dados do extinto Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2013), foi de 13.989,4 toneladas em 2011, com 1.233,7 toneladas de ostras, porém, apenas uma pequena parte está representada pelo cultivo de espécies de ostras nativas, *Crassostrea gasar*, Adanson, 1757 e *Crassostrea rhizophorae*, Guilding 1828.

De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization*) (2004), dentre os bivalves cultivados no Brasil, 93% tem origem no estado de Santa Catarina, principal produtor nacional. As outras áreas importantes de cultivo são observadas ao longo da costa do Sudeste. No entanto, estuários localizados no Norte e Nordeste possuem grande potencial para a aquicultura, especialmente para ostras nativas.

No Nordeste brasileiro, a extração de moluscos bivalves representa importante papel social para boa parte da população estuarina, uma vez que as correntes marinhas que banham essa costa não sustentam grandes cardumes de peixes (SANTOS *et al.*, 2017). A atividade é desenvolvida geralmente por trabalhadores autônomos (em sua maioria mulheres), ou organizados em associações e cooperativas que vivem da captura e beneficiamento dos mariscos, e que detém conhecimento sobre as marés, as fases lunares e a heterogeneidade da fauna e flora do mangue (BEZERRIL, 2012; FAO, 2010).

Mundialmente as ostras do gênero *Crassostrea* (SACCO, 1897) se destacam por apresentar grande relevância econômica, principalmente devido ao valor da “carne” e também ao uso de suas conchas como matéria prima na fabricação de artesanatos, industriais e medicinais (COSTA, 1985; ERSE & BERNADES, 2008).

Segundo Silva (2015), espécimes do gênero *Crassostrea* ocorrem nas regiões estuarinas de baixa e média salinidade do litoral do Brasil e recebem o nome popular de ostra do mangue. Destas, duas espécies se destacam por sua relevância no

extrativismo e na aquicultura brasileira: *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (LAMARK, 1819).

A morfologia externa de algumas espécies de ostras, inclusive do gênero *Crassostrea* sp., modifica de acordo com as características ambientais às quais estão sujeitas, de modo que a variação morfológica entre indivíduos de mesma espécie causa conflitos na identificação (SILVA *et al.*, 2015). Dessa maneira, o processo de distinção das espécies com base em características externas da concha, como forma, cor, cicatriz do músculo e estrutura não é totalmente confiável (IGNACIO *et al.*, 2000). Nesse sentido, métodos moleculares são imprescindíveis para estabelecer as pequenas diferenças entre as espécies (THORPE & SOLÉ-CAVA, 1994; GUO *et al.*, 2012).

A identificação por caracteres fenotípicos entre as duas espécies brasileiras de ostras do mangue pode ser dificultada tendo em vista que ambas possuem morfologia bastante semelhante, situam-se no mesmo habitat e, fixam-se nos mesmos substratos (SIQUEIRA, 2008). A plasticidade fenotípica exibida pelas formas adultas de ambas as espécies, em relação ao substrato ao qual estão fixadas, reforça a dificuldade e controvérsia na identificação taxonômica (ABSHER, 1989).

A partir da década de 1990 observa-se na literatura a utilização de várias técnicas moleculares para avaliar a diferenciação de estoque de ostras. Dentre as metodologias empregadas podemos citar aloenzimas, eletroforese, análise polimorfa de DNA mitocondrial e DNA nuclear, minisatélites e marcadores de microssatélites (SHAKLEE & BENTZEN 1998; THORPE *et al.*, 2000).

Os indivíduos de *C. brasiliiana* (sinonímia de *C. gasar*), até meados da década de 1970, era identificada erroneamente como *C. rhizophorae*, baseando-se estritamente na observação de caracteres morfológicos. De acordo com Rios (1973), *C. rhizophorae* já foi considerada sinônimo de *C. brasiliiana*, no entanto, através do estudo realizado por Christo & Absher (2008) observando a morfologia larval, foi possível observar a diferenciação genética entre as duas espécies e sua ocorrência em estuários brasileiros.

Um dos métodos mais confiáveis para resolver este dilema, e a genética molecular, já utilizada para questões semelhantes em estuários de outras regiões

(BUROKER *et al.*, 1979; GAFFNEY & ALLEN JR, 1993; THORPE & SOLÉ-CAVA, 1994; PIE *et al.*, 2006; LUDWIG *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2013).

A grande variação morfológica observada nas populações da ostra do mangue no litoral brasileiro merece estudos aprofundados, uma vez que são importantes para preservação e conhecimento dos estoques naturais e servirão de base para estudos que se aplicarão no processo de cultivo das mesmas. A existência de diferentes morfotipos com crescimentos diferenciados pode incrementar a produtividade dos cultivos e consolidar a malacocultura no nordeste, produzindo novos empregos e promovendo o desenvolvimento das regiões de cultivo, além de permitir a exportação da tecnologia desenvolvida para outras regiões do país.

De acordo com relatos das marisqueiras que moram na RESEX, foi observado a possibilidade de ser encontradas duas espécies do gênero *crassostrea* na região, devido o fato de que alguns indivíduos crescem mais que outros. A partir desse questionamento foi testado as seguintes hipóteses 1: os indivíduos coletados em raízes de mangue e fixas em rochas, pertencerem a mesma espécie. Hipotese 2: os indivíduos coletados nas raízes do mangue e nas rochas pertencerem a espécies diferentes.

Com isso, nesse trabalho objetivou-se verificar a possibilidade de ocorrência de duas espécies do gênero *Crassostrea* nos dois ambientes amostrados, e avaliar a diversidade genética dentro e entre as populações de ostras coletadas na região de Capanema, utilizando marcadores ISSR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O extrativismo

A maricultura vem se desenvolvendo rapidamente no Brasil, isso se dá pelo crescente aumento da produção nas regiões nordeste e sul com a produção de moluscos (ostras e mexilhões). A expansão da produção de moluscos é desenvolvida cada vez mais por pescadores e marisqueiras com uma alternativa de renda e alimento, contribuindo para a fixação da população jovem em seu local de origem, utilizando os recursos naturais para geração de fonte de renda (SOUZA, 2014).

Na Bahia, o cultivo de ostras tem se uma alternativa viável para complementar a renda de comunidades estuarinas e minimizar a sobre-exploração dos estoques naturais. No entanto, a atividade mais realizada ainda é a extração desses indivíduos (SANTOS, 2017).

O extrativismo é desenvolvido em comunidades litorâneas, gerando emprego, renda, uma ótima fonte nutricional e incentivando a exploração racional dos recursos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A ostra do mangue (*Crassostrea rhizophorae*) extraída artesanalmente nos bancos naturais passou a ser cultivada, em estados das regiões Sudeste e Nordeste a partir da década de 70, com cultivos experimentais instalados nos estados de São Paulo e na Bahia, porém técnicas de cultivo desta espécie ainda são incipientes no Brasil (GUZENSKI, 2000).

A coleta do molusco é feita de forma artesanal e muitas vezes não respeita a preservação do ecossistema, levando a diminuição das ostras em bancos naturais (SANTOS, 2017).

Segundo Bezerril (2012) a pesca no mangue, ou mariscagem, é, segundo relatos das marisqueiras, uma prática desenvolvida por populações ribeirinhas há bastante tempo. Trata-se de uma tradição familiar os pais levarem seus filhos as atividades de pesca, de forma a repassarem seus conhecimentos sobre a arte de mariscar, além de obter um aumento na renda familiar através da ajuda destes (DALTRO, 2013).

A utilização de recursos pesqueiros (extração de ostras de bancos naturais) tem sido marcada pela degradação dos ecossistemas locais, e isto se faz em resultado da captura descontrolada de organismos aquáticos de interesse comercial para geração de alimento e renda, por comunidades ribeirinhas (CHRISTO, 2006).

Em função desta degradação ambiental proveniente das ações antrópicas, atividades como a ostreicultura vem sendo incentivada, tanto por iniciativas particulares como por incentivos governamentais, com o intuito de substituir parcialmente o extrativismo em uma atividade aquícola, evitando assim a redução dos estoques naturais (SANTOS, 2011).

Dado o alto valor comercial de ostras, sobretudo de *C. brasiliiana*, devido ao seu maior tamanho, é essencial certificar a identidade das espécies através de fatores que não sejam influenciados pelo ambiente (IGNACIO *et al.*, 2000). Deve-se levar em consideração que a correta identificação possibilita o melhoramento em técnicas na aquicultura e no biomonitoramento, fornecendo também dados importantes para a preservação das espécies (REBELO *et al.*, 2003).

Souto e Martins (2009) em um estudo etnoecológico na mariscagem de moluscos bivalves no manguezal do distrito e Acupe, Santo Amaro, BA, evidenciou por meio de entrevistas às marisqueiras da região que elas citam que “só há uma marca de ostra”, porém elas recebem nomes diferentes de acordo com o sítio de coleta: “ostras de mangues” para aquelas encontradas nas raízes de manguezais e “ostra de laje” para aquelas que são encontradas aderidas as pedras.

A pesca em si pode afetar a composição ou mesmo a variabilidade de uma espécie dependendo de diversos fatores, mas principalmente a seletividade. Assim, para as espécies de valor comercial, a pesca é um dos fatores principais de mortalidade de animais adultos, muitas vezes comprometendo o recrutamento dos estoques. A genética molecular é um dos métodos mais confiáveis para resolver este dilema, sendo utilizada para questões semelhantes em estuários de outras regiões (LUDWIG *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2013).

2.2 Gênero *Crassostrea*

No Brasil espécimes do gênero *Crassostrea*, são conhecidos popularmente como ostra do mangue, pois são encontradas em raízes de mangue (*Rhizophora mangle*) além de se fixarem formando bancos nas zonas entre mares, no infra litoral e em bancos rochosos (ABSHER 1989).

Os moluscos bivalves deste gênero caracterizam-se como uma fonte rica de proteínas e minerais, em função do valor alimentício da “carne”, além de possuírem baixo valor calórico e utilização da concha como matéria prima para a composição de diversos produtos (BISPO *et al.*, 2004; COSTA, 1985).

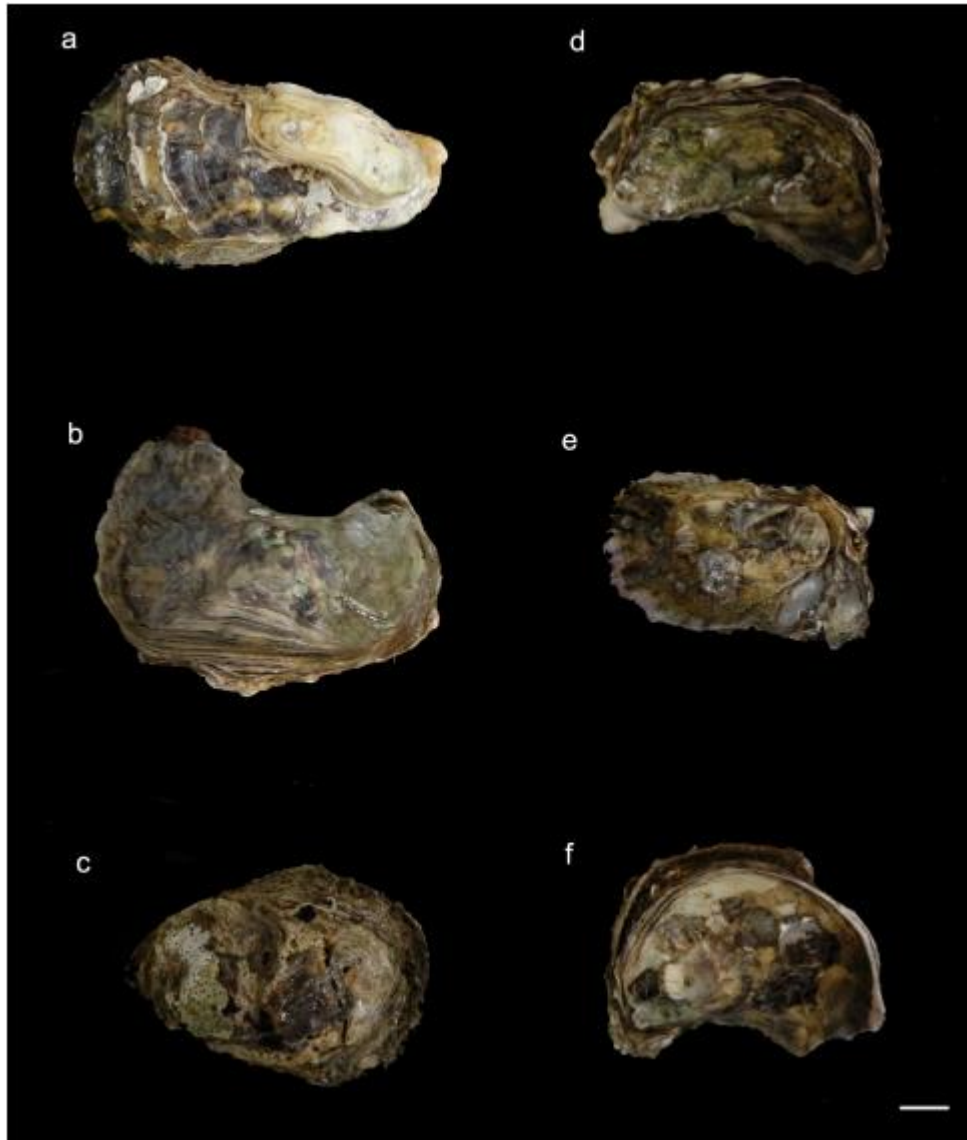
As espécies do gênero *Crassostrea* são consideradas eurihalinas (suportam largas faixas de variação de salinidade) e euritêrmicas (toleram largas faixas de mudança de temperatura), podem habitar diversos ambientes, sobretudo estuários (PRITCHARD, 1967; AMARAL 2010). A interação entre a água salgada e água doce ocasiona variações de salinidade e está associada ao grande aporte de matéria orgânica e alta produtividade primária que dá aos estuários características fundamentais para sobrevivência destes animais (PRITCHARD, 1967).

De forma geral, o gênero *Crassostrea* tem sido atribuído às espécies com a valva direita menor e plana, a valva esquerda mais côncava e aderida ao substrato. O resílio é estriado longitudinalmente. O exterior é geralmente cinza claro a branco, amarronzado e ou púrpura. O interior é branco, com a cicatriz do músculo adutor roxa, próxima ao centro, podendo estar pigmentada ou não. O ligamento é externo. O gênero apresenta indivíduos dioicos, sem dimorfismo sexual, produzindo de 30 a 50 milhões de ovos por desova (AMARAL, 2010; BOSS, 1982).

A identificação morfológica de ostras do gênero *Crassostrea* em nível de espécie é difícil, devido à intensa influência ambiental no desenvolvimento da valva (LAM & MORTON, 2003). O número de espécies de ostra nativas na costa sul-americana permanece incerto (MELO *et al.*, 2010a). *Crassostrea brasiliiana* (LAMARCK, 1819) e *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) foram inicialmente descritas em manguezais do Atlântico Sul-americano (NASCIMENTO, 1991). Na figura 1 podemos observar conchas de ostra do genero *Crassostrea* obtidas no estuario Vaza Barris,

Sergipe, *Crassostrea brasiliiana* (a), (b) e (c) *Crassostrea rhizophorae* (d) (e) e (f). (SILVA 2015).

Figura 1. Conchas de ostra do genero *Crassostrea* obtidas no estuario Vaza Barris, Sergipe, *Crassostrea brasiliiana* (a), (b) e (c) e *Crassostrea rhizophorae* (d) (e) e (f). (SILVA 2015).



Grandes diferenças encontradas na fase larval, principalmente no que diz respeito às taxas de crescimento e na morfologia têm contribuído para a classificação as ostras brasileiras em duas espécies. Entretanto, Singarajah (1980) propôs que *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae* eram sinônimas, e assim, com base em características morfológicas e fisiológicas, descreveram uma nova espécie, *Crassostrea paraibanensis*,

originária do estuário do rio Paraíba (estado da Paraíba, Brasil). Este também sugeriu a existência de outras espécies do gênero *Crassostrea* ainda não identificada sendo esta encontrada na lagoa da Tijuca (Rio de Janeiro).

De acordo com IGNACIO *et al.*, (2000) e MELO *et al.*, (2010b) evidências genéticas bioquímicas e moleculares suportam a existência de duas espécies nativas de *Crassostrea*, identificadas como *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae*. Entretanto, Lapègue *et al.* (2002), ao usar evidências moleculares (sequências de rRNA 16S e haplótipos RFLP) e análise citológica, descobriram a presença de duas espécies da costa sul-americana, nomeadamente *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) e *C. rhizophorae*.

Varela *et al.* (2007), com base em sequências 16S, concordaram com os últimos autores e mencionaram a presença de uma terceira espécie para o gênero *Crassostrea* no norte do Brasil, que estava mais intimamente relacionada com as ostras indo-pacíficas. Melo *et al.*, (2010b) identificaram a presença de apenas três espécies de *Crassostrea* ao longo da costa brasileira, *C. gasar* (= *C. brasiliiana*) e *C. rhizophorae*, ambas com distribuições relativamente amplas e *Crassostrea* sp.

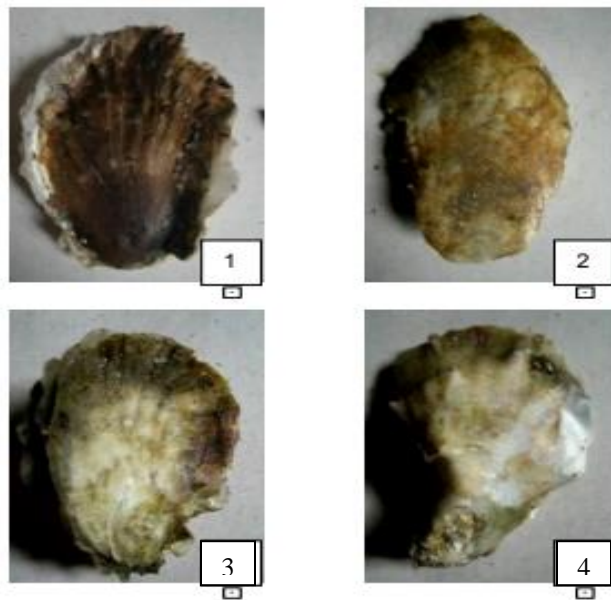
No Brasil, existem pelo menos três espécies do grupo *Crassostrea* que estão distribuídas pela costa, sendo as duas espécies nativas: *C. rhizophorae* (Guilding 1828) e *C. brasiliiana* (Lamarck 1819), (por alguns pesquisadores, denominada de *C. gasar*) e a terceira, *C. gigas*, espécie exótica que foi introduzida na década de 1970 (POLI & LITTLEPAGE, 1998).

Por serem animais de profundo interesse econômico, suas relações vêm sendo estudadas por vários pesquisadores das mais diversas áreas, pois ainda não são conhecidas ao certo suas distribuições geográficas e nem mesmo suas afinidades filogenéticas. Os estudos moleculares de Varela *et al.* (2007) revelaram uma forte similaridade entre a ostra nativa da região norte do Brasil e *C. gasar* africana. (IGNACIO *et al.*, 2000). Nesse sentido, métodos moleculares são imprescindíveis para estabelecer as pequenas diferenças entre as espécies (THORPE & SOLÉ-CAVA, 1994; GUO *et al.*, 2012).

2.3 *Crassostrea rhizophorae*

C. rhizophorae (Figura 2) é uma espécie hermafrodita protândrica que se distribui do Caribe ao Atlântico Sul-americano (até o Sul do Brasil). Estas ostras apresentam o tamanho médio da concha de 6,5 cm em estágio adulto, sendo grossa e de formato variável, geralmente larga, e de tonalidade que varia de clara a escura (VILLARROEL *et al.*, 2003; LAZOSKI *et al.*, 2011).

Figura 2. 1 e 2- *C. rhizophorae* de coletor vista da valva superior e inferior; 3 e 4- *C. rhizophorae* de repicagem vista da valva superior e inferior.



Fonte: Oliveira, 2014

Sua distribuição se estende ao longo de zonas tropicais, onde ocorre principalmente, fixadas às raízes aéreas do mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), ou nas zonas intertidais de costões rochosos, desse modo são conhecidas por ostra do mangue ou ostra nativa (NASCIMENTO, 1983; AMARAL 2010).

Segundo Rios (1994) a taxonomia da *C. rhizophorae* se dá da seguinte forma:

Reino Animalia;

Filo Molusca;

Classe Bivalvia;

Ordem Ostreoida;

Família Ostreidae;

Gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897)

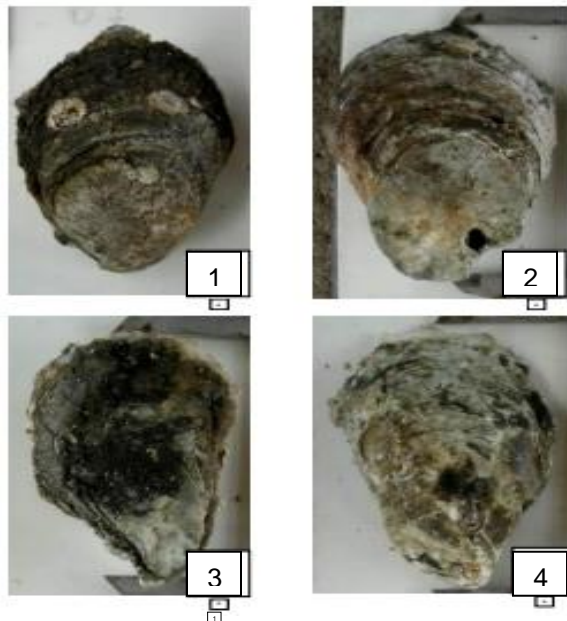
Espécie *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828).

As ostras da espécie *C. rhizophorae* são animais ovíparas hermafroditas protrândricos com fecundação externa e desenvolvimento larval planctotrófico e não apresentam dimorfismo sexual (WAKAMATSU, 1973). Podem ser classificadas como eurihalina e osmoconformadora, adaptada para ambientes com salinidade de 0 a 40 unidades práticas de salinidade-PSU (SANTOS, 2014).

2.4 *Crassostrea brasiliiana*

C. brasiliiana (sinonímia de *C. gasar*), até meados da década de 1970, era identificada erroneamente como *C. rhizophorae*, baseando-se estritamente na observação de caracteres morfológicos (SINGARAJAH, 1980). Porém, é notório o fato de *C. brasiliiana* apresentar melhor performance de crescimento em cultivos (PEREIRA et al., 2003). Além disso, é uma espécie que apresenta distribuição em zonas infralitoral do Sudeste do Brasil e em áreas mais próximas ao trópico de Capricórnio. Sua concha em estágio adulto apresenta tamanho variável, com valores entre 5 a 19 cm (LAZOSKI et al., 2011).

Figura 3. 1 e 2- *C. brasiliiana* de coletor vista da valva superior e inferior; 3 e 4- *C. brasiliiana* de repicagem vista da valva superior e inferior.



Fonte: Oliveira 2014

Segundo Lazoski (2014) essa espécie de ostra se faz presente no Nordeste brasileiro indicando uma alta estruturação populacional assim como ocorre nas regiões Norte e Sudeste.

Segundo Rios (1994) a taxonomia da *C. brasiliana* se dá da seguinte forma:

Reino Animalia;

Filo Molusca;

Classe Bivalvia;

Ordem Ostreoida;

Família Ostreidae;

Gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897)

Espécie *Crassostrea brasiliana* (Lamarck 1819).

A espécie *C. brasiliana* (Figura 3) apresenta concha com forma ovóide, larga e delgada, altura de 50 a 130 mm. Coloração esverdeada, amarronzada com feixes brancos. Valva direita (superior) opercular e larga. Valva esquerda (inferior) forma de taça rasa, com uma leve depressão sob o umbo (AMARAL, 2010).

Possui fecundação externa eliminando seus gametas, sem indícios de incubação prévia, diretamente na água, onde ocorre a fertilização e o desenvolvimento completo do estágio larval (SILVA & BOEHS, 2007).

2.5 Marcadores Moleculares em Ostras

O uso de técnicas moleculares para a caracterização de espécies é uma ferramenta confiável e eficaz, permitindo a resolução de problemas taxonômicos de espécies, como ostras, que são de difícil separação (MELO *et al.*, 2010b).

A escolha do tipo de marcador se dá em acordo com suas características. Segundo Rodrigues (2010), Marcadores moleculares do tipo ISSR são recomendados para análises genéticas obtendo-se resultados confiáveis com rapidez em seus resultados e com custos menores.

Baseado nessa necessidade, diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de polimorfismos genéticos. Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares que cobre todo o genoma do organismo (ANTONINI *et al.*, 2004).

O uso de marcadores baseados no DNA permite uma avaliação das relações filogenéticas entre espécies, gêneros e famílias, bem como entre populações. Essa técnica traz como vantagem fato que as diferenças encontradas nas sequências de DNA não são modificadas pela ação do ambiente, como nos marcadores morfológicos ou mesmo nos marcadores protéicos (aloenzimas e isoenzimas), pois são fixadas no momento da fertilização. (NGUYEN *et al.*, 2006)

Ao se avaliarem as diferenças genéticas com marcadores neutros, trata-se da estimativa indireta da variabilidade genética subjacente em genes envolvidos nos processos de adaptabilidade e evolução de uma população (NGUYEN *et al.*, 2006). Diversos marcadores genéticos têm sido desenvolvidos com base na sua herança e padrão de evolução (PARK & MORAN, 1994). Um marco no aprimoramento e na universalização do uso de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase - PCR (SAIKI *et al.*, 1988).

Nos últimos anos, um grande número de tecnologias da genética molecular são utilizados para fornecimento de informações favoráveis ao desenvolvimento dos programas de conservação e uso de recursos genéticos (FALEIRO, 2007). A escolha desta técnica molecular dependerá do objetivo do estudo, da infra-estrutura local, dos recursos financeiros e humano disponíveis além do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (SOUZA., 2015; COSTA *et al.* 2016)..

Descrito quase que simultaneamente por Meyer *et al.* (1993), Wu *et al.* (1994) e Zietkiewicz *et al.* (1994) os marcadores moleculares ISSR são utilizados em uma variedade de estudos genéticos com espécies de ostras (DALTRO *et al.*,2016; VIEIRA *et al.*, 2017). A técnica se baseia em iniciadores de repetição di, tri ou tetranucleotídica para amplificação do DNA numa determinada porção do genoma situada entre dois microsatélites similares de orientação reversa à cadeia de DNA, que estão vastamente distribuídos no genoma (ROUX *et al.*, 2007).

A taxonomia do gênero *Crassostrea* avançou muito com o advento dos marcadores moleculares, que passaram a ser utilizados na investigação da distribuição das espécies no ambiente e esclarecer a sistemática das ostras no sul do Brasil (MACCACCHERO *et al.*, 2007). Estas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares cobrindo todo o genoma do

organismo (LOREDELO, 2014). Baseados em polimorfismos moleculares PIE *et al.*, (2006) confirmou a existência e co-ocorrência das três espécies de ostras presentes no estado do Paraná no Brasil, sendo elas a *C. rhizophorae*, *C. brasiliiana*, e a *C. gigas* (exótica) utilizando a metodologia RFLP/PCR para discriminar as três espécies.

Espera-se que o estudo realizado neste trabalho possa contribuir com informações consistentes sobre as populações de ostras nativas brasileiras, permitindo a preservação e o cultivo de forma sustentável e mais efetiva.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterização genética de ostras do gênero *Crassostrea* amostrados em dois ambientes distintos na RESEX Marinha da Baía do Iguape - BA, utilizando marcadores moleculares tipo ISSR.

3.2 Objetivos específicos

Apresentar informações preliminares acerca da caracterização genética de duas populações de ostras do gênero *Crassostrea* nativas da região de Capanema, Bahia, utilizando uma abordagem molecular através do marcador ISSR;

Verificar a variabilidade genética entre e dentro das populações amostradas, utilizando o marcador molecular ISSR;

Verificar a existência de mais de uma espécie nos ambientes amostrados, utilizando o marcador molecular ISSR.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Área de estudo

A RESEX Reserva (Extrativista da Baía do Iguape) está localizada nos municípios de Maragogipe e Cachoeira, no estado da Bahia, tem como área de abrangência 8.117,53 ha envolvendo dois ambientes: 2.831,24 ha inclui terrenos de manguezais e 5.286,29 ha de águas internas brasileiras. A atividade extrativista da Baía do Iguape é realizada por cerca de 68,3% das famílias, sendo que 31,67% se dedicam à pesca e à mariscagem, deste universo e em torno de 31% dessas famílias tem na

mariscagem sua principal atividade consistem de mulheres e crianças (PROST, 2010; FREITAS, 2017).

A Cidade da Cachoeira possui uma barragem (Pedra do Cavalo) de grande importância para o Estado tendo em vista que o lago, que esta protege, abastece um número significativo de pessoas, além de proporcionar condições de sobrevivência à população ribeirinha. Essa modificação no curso natural do rio influencia diretamente na vazão e na sazonalidade modificando as condições físico-químicas, provocando alterações no sistema natural dos estuários conseqüentemente na dinâmica dos manguezais (GENZ, 2006; COUTO *et al.*, 2012).

O manguezal representa um ecossistema costeiro de alta produtividade, sendo considerado como um berçário ambiental para diversas espécies, tendo uma importância fundamental para manutenção da vida. Situado na foz de um rio, o manguezal cumpre muitas funções, tais como retenção de sedimentos e matéria orgânica, proteção das margens. Essa riqueza, expressa entre as mais altas produtividades primárias, do ponto de vista biológico, promovendo o sustento de inúmeras populações costeiras, no mundo e no Brasil, não sendo diferente na Baía do Iguape (PROST, 2010)

Ao entorno da RESEX várias comunidades conseguem manter uma renda através do extrativismo, é notório o um grau de tecnologia extremamente simples utilizados pela população para a captura dos organismos aquáticos, na pesca artesanal. As mulheres se voltam preferencialmente para a atividade de mariscagem, ou seja, de coleta de mariscos diversos em áreas de manguezal ou em bancos de areia. Os pescadores dispõem, na sua maioria, apenas de canoas a remo, eventualmente movidas a vela, quando o vento permite. Os barcos motorizados são uma exceção na RESEX (HATJE, 2009).

Capanema esta localizada na cidade de Maragogipe, em se tratando da importância do extrativismo de moluscos bivalves para a comunidade, pode ser considerada expressiva e de relevante importância para a complementação da renda familiar. Entretanto, apesar dos relatos por parte da comunidade trata-se de uma atividade bastante precária e esse conhecimento tradicional é transmitido de geração em geração.

Durante as amostragens foi observado que as ostras coletadas em fundos rochosos (Ponto 1) permaneciam 100% submersas durante as 24 horas do dia e o material amostrado a partir de raízes de vegetação de mangues (Ponto 2) ficava parcialmente exposto a luz e calor durante 12 horas e submersos as outras 12 horas do dia.

A pesquisa se deu com a coleta de 90 espécimes de ostra do gênero *Crassostrea* na RESEX, comunidade de Capanema, localizada na cidade de Maragogipe – BA (Figura 4), sendo 45 indivíduos coletados em um ambiente totalmente submerso aderidas a substrato rochoso (Ponto 1) e 45 indivíduos coletados nas raízes do mangue (Ponto 2). A distância entre os pontos era de aproximadamente 2 km.

Figura 4 - Mapa da localização da comunidade de Capanema, onde foram coletados os indivíduos.



Fonte: www.google.com.br/maps

A coleta ocorreu no mês de junho de 2016, onde os exemplares foram transportados vivos até o Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos (LAGOA), localizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, na cidade de Cruz das Almas. Cada indivíduo foi aberto individualmente com o auxílio de uma faca apropriada, tendo cuidado para não ocorrer contaminação entre os indivíduos. Com auxílio de pinças e tesouras devidamente esterilizadas, foi retirada uma porção do músculo adutor de cada indivíduo (Figura 5) e armazenada em microtubos devidamente etiquetados, fixando com etanol absoluto. Após esta etapa, foram realizados os procedimentos para as extrações do DNA.

Figura 5: retirada do músculo adutor



Fonte: Serra, 2016.

4.2 Extração e quantificação de DNA

Do material amostrado, foi retirada uma alíquota do tecido para realizar a extração do DNA. As amostras foram deixadas por 2h na estufa a 37° C para a retirada do excesso do álcool. O DNA total dos exemplares foi extraído de acordo com o protocolo fenol:clorofórmio descrito por Sambrook et al. (1989). O DNA foi estocado em tampão TE (TRIS+EDTA) e posteriormente estocadas em freezer a -20°C.

A concentração e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (1,5 µL). Para a corrida eletroforética foi utilizado uma voltagem de 70 V e amperagem de 500 mA, por 1 hora. 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, obtendo-se desta forma uma média da concentração em ng/L a partir da quantificação visual, utilizando-se um programa Excel com dados fixos.

4.3 Caracterização molecular

Logo após a quantificação, o DNA obtido de cada amostra foi diluído em água ultra pura (mili-Q) e padronizado para concentração aproximada de 25 ng/ μ L. O DNA total foi submetido às amplificações pela reação em cadeia de polimerase (PCR).

O DNA molde (20 ng) foi amplificado, em um volume final de 30 μ L contendo 20 ng de DNA genômico, 20 mM de TrisHCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,3 mM do iniciador e 1,0 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen). Esse processo foi realizado com a utilização do Termociclador Veritti da marca Applied Biosystems, empregando-se iniciadores (*primers*) tetranucleotídicos de sequência repetitiva simples (ISSR - Inter Simple Sequence Repeats). Foram testados um total de 14 *iniciadores* diferentes, destes foram selecionados seis que apresentaram melhores resultados para as análises.

O processo de amplificação do DNA foi realizado nas seguintes condições: desnaturação em temperatura de 94°C durante um tempo de 40 segundos por 30 ciclos, anelamento em temperatura de 56°C por 40 segundos, extensão em temperatura de 72°C por 1 minuto e por fim extensão final que ocorreu na temperatura de 72°C por 5 minutos em um ciclo. Após a conclusão do processo houve o resfriamento a 4°C por tempo indeterminado. A amplificação foi realizada em termociclador Veritti 96.000, Applied Biosystems. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio (3 μ L) (Figura 6). A visualização dos padrões foi feita sob luz ultravioleta e os géis fotografados em sistema de fotodocumentação de gel, molecular Imaging L.PIX, Loccus.

4.4 Tratamento dos dados

As bandas de ISSR reproduzidas foram avaliadas como ausente (0) ou presente (1) para cada um dos indivíduos analisados. Com a posse de todas as fotografias obtidas no processo de fotodocumentação, das amostras de cada local de

coleta, foi montado as tabelas de códigos binários que serão utilizadas na estatística molecular. O locus foi considerado polimórfico quando o alelo foi visualizado em uma frequência não superior a 0,99 ou foi $p \geq 0,05$. As diferenças de acordo com a qualidade na intensidade das bandas não foram consideradas.

Para a caracterização molecular dos espécimes trabalhados, foi calculada a distância de Jaccard. Os agrupamentos hierárquicos das análises a partir das matrizes de distância genética foram obtidos pelos métodos de UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (SNEATH & SOKAL, 1973) e gerados pelo programa de computador Genes. Os dendrogramas foram obtidos pelo programa Statistica (STATSOFT, 2005).

A avaliação do Fluxo gênico (N_m), a Diversidade genética (GST), a Diversidade de gene de Nei (H), o Índice de Shannon (I) e a Porcentagem de bandas polimórficas (PBP) foram realizados no programa POPGENE versão 1.32 (YEH & BOYLE, 1997). 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). A análise de variância molecular (AMOVA) e o nível de diversidade genética (F_{ST}) para estimativa de estruturação genética foi feita com o auxílio do programa o Alerquin (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 Reação de PCR

Os seis iniciadores selecionados geraram um número total de 77 fragmentos (72 polimórficos e 5 monomórficos), com tamanho de pares de base variando entre 200 e 3000 pb, conforme a tabela 1. Os fragmentos que possuíam o mesmo peso molecular foram considerados como pertencente ao mesmo loco. O número total de loci variou de acordo com os iniciadores, sendo o maior número de loci produzidos pelo ISSR21 e o menor pelo ISSR 04 e 19. (Tabela 1)

Tabela 1. Iniciadores ISSR selecionados na análise de variabilidade genética entre ostras do gênero *Crassostrea*.

Iniciador	Sequencia	Ta*	Tamanho bandas	Número de loci polimórficos	Número de loci monomórfico
ISSR04	(GA)8C	54,0° C	200-1200	8	1
ISSR11	(CT)8RA	54,0° C	270- 1500	14	1
ISSR12	(AG) 8YG	54,0° C	400- 2700	14	0
ISSR16	(AACC)4	54,0° C	300- 3000	9	2
ISSR19	(GACA)4	54,0° C	200-1000	8	1
ISSR21	(AAGC)4	54,0° C	150- 1100	19	0
Total				72	5

*Ta: Temperatura de anelamento do iniciador.

Valores semelhantes de *loci* monomórfico foi encontrado por Daltro *et al.*, (2013), com o *primer* (GACA)4. Segundo o mesmo essa baixa variabilidade genética torna-se um ponto negativo para a população, pois, aumenta a possibilidade de ocorrer distorções morfológicas nos indivíduos que podem ocasionar a mortalidade desses espécimes.

5.3 Estrutura Populacional e Diversidade Genética

Os resultados encontrados para as populações mostraram que as medidas para a comparação de identidade genética de Nei (1972) foi de 0,9456 e as medidas para comparação de distância genética foi de 0,0560 (Tabela 2).

Tabela 2. Estimativas de identidade (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) de Nei (1972) entre as populações naturais de ostra *Crassostrea* sp.

Populações	Submersas	Fixa em raízes
Submersas	****	0,9456
Fixas em raízes	0,0560	****

Com os resultados obtidos de identidade genética (0,9456) e distancia genética (0,0560) encontrados para as comparações entre as duas populações amostradas (Tabela 2), ostras coletadas em fundos rochosos (submersas) e as coletadas fixas em raízes de mangues, não apresentaram um indicio de serem populações compostas por duas espécies diferentes. Visto que a identidade genética mostrou-se alta enquanto que a distancia genética apresentou um índice baixo.

Vieira *et al.* (2017) ao caracterizarem a genética de ostras *Crassostrea* sp.

cultivadas na região de Graciosa e Santiago do Iguape - BA, por meio de marcadores ISSR, apresentaram resultados referentes às medidas de comparação de distância genética de Nei (1972). A comparação de identidade entre as duas populações foi de 0,9493 e a medida para comparação de distância genética foi de 0,0521. Desse modo podemos observar valores bastante similares ao encontrado nesse trabalho.

Conforme a Tabela 3 o número de alelos observados mostrou que houve uma pequena variação de 1,8442 ($\sigma \pm 0,49$) e 1,8312 ($\sigma \pm 0,49$) para as ostras coletadas nas raízes do mangue e as coletadas submersas respectivamente. Quanto ao número de alelos efetivos, os valores ficaram entre 1,3481 ($\sigma \pm 0,33$) e 1,3291 ($\sigma \pm 0,34$) para as ostras coletadas nas raízes do mangue e as coletadas submersas respectivamente.

O mesmo foi observado no trabalho de Vieira *et al.* (2017). Como o número de alelos efetivo foi inferior ao número de alelos observados, há a possibilidade de melhorias na presença de alelos nessa espécie.

Tabela 3. Diversidade genética das populações naturais de *Crassostrea* sp.

	Na*	Ne*	H*	I*	Nº de loci polimórficos	% de loci polimórfico
Submersa	1,8312 ($\sigma \pm 0,37$)	1,3291 ($\sigma \pm 0,34$)	0,2007 ($\sigma \pm 0,18$)	0,3142 ($\sigma \pm 0,25$)	64	83,12
Raiz de mangue	1,8442 ($\sigma \pm 0,49$)	1,3481 ($\sigma \pm 0,33$)	0,2154 ($\sigma \pm 0,17$)	0,2539 ($\sigma \pm 0,24$)	65	84,42

* Na = número de alelos observados; * Ne = Número efetivo de alelos; *H = diversidade genética de Nei (1972); I = índice de informação de Shannon .

No presente estudo a média de diversidade genética de Nei (H) foi de 0,2007 ($\sigma \pm 0,18$) para os indivíduos coletados nas raízes do mangue e 0,2154 ($\sigma \pm 0,17$) para os submersos, esses valores estão inferiores ao encontrado por Vieira *et al.*, (2017) que coletando em outros pontos da Baía de Todos dos Santos obteve 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-BA localizado na cidade de Cachoeira e a maior média pelas de Graciosa-BA localizado em Taperoá. Isso se justifica possivelmente pelo fato de Viera *et al.*, (2017) ter amostrado a partir de um experimento com ostras cultivadas, ainda que os indivíduos tenham sido coletados em ambiente natural, possivelmente o local de coleta tenha sido em um ponto fixo, o que possivelmente tenha gerado essa variação

Com relação ao índice de Shannon (I) (tabela 3), foram encontrados valores de 0,3142 ($\sigma \pm 0,25$) para ostras submersas e 0,2539 ($\sigma \pm 0,24$) para as ostras fixas nas raízes do mangue. Este índice pode variar de 0 a 1, no qual a menor diversidade genética é representada por valores mais próximos de zero, assim podemos dizer que esse resultado foi obtido possivelmente por causa da capacidade de dispersão das sementes no ambiente, como também pela proximidade entre os dois locais de amostragem.

Resultado condizente com Vieira *et al.* (2017) que com o mesmo marcador encontraram para este parâmetro genético os seguintes valores nos respectivos locais de coleta: 0,4177 ($\sigma \pm 0,2151$) na população de Graciosa-BA e 0,3500 ($\sigma \pm 0,2399$) para a população de Santiago do Iguape-BA.

Daltro *et al.* (2013) em seu trabalho de variabilidade genética de ostra no estuário do rio Subaé, utilizando marcador ISSR, encontraram valores do índice de Shannon variando de 0,33 a 1,0 nos indivíduos estudados, no estuário.

Do ponto de vista molecular, a diversidade genética é o polimorfismo entre indivíduos de uma população, em um ou mais fragmentos de DNA demonstrado pela presença e ausência de bandas, no caso de marcadores dominantes (RAMALHO *et al.*, 2012). Neste sentido a análise do percentual de loci polimórfico nos dois pontos de coleta foram superiores a 80% o que demonstra uma alta variabilidade genética dentro das populações.

Daltro *et al.*, (2013) identificaram uma alta variabilidade genética entre as populações amostradas, sendo detectado um alto grau de polimorfismo.

A tabela 4 apresenta a média da diversidade genética total (HT) para todas as populações 0,2297 ($\sigma \pm 0,0288$) e a média de diversidade esperada (HS) 0,2081 ($\sigma \pm 0,2333$). Vieira *et al.* (2017) de forma similar a este estudo encontraram valores de diversidade total superior aos valores de diversidade esperada de forma que o valor de diversidade genética total (HT) para todas as populações foi de 0,2659 ($\sigma \pm 0,0206$) e a diversidade esperada (Hs) 0,2466 ($\sigma \pm 0,0177$), apresentando valores um pouco maior quando comparado aos resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 4. Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional (GST) e fluxo gênico (Nm) para as populações de Ostra *Crassostrea spp.*

	Ht	Hs	Gst	Nm
População total	0,2297 ($\sigma \pm 0,0288$)	0,2081 ($\sigma \pm 0,2333$)	0,0939	4,8225

*HT = diversidade total; *HS = diversidade esperada ; *GST = diferenciação populacional; *Nm = estimativa do fluxo gênico

A diferenciação genética estimada pela média GST no presente estudo resultou em 0,0939, valor superior ao encontrado por Vieira *et al* (2017) que em seu estudo obteve o valor deste parâmetro genético com a média de 0,0725.

O número de migrantes nos pontos de coleta foi indicado pelo fluxo gênico, resultou em Nm= 4,8225, este resultado é condizente com a alta diferenciação genética encontrada dentro das populações. É válido ressaltar que um fluxo gênico maior que quatro migrantes é suficiente para contrapor os efeitos de deriva genética (SLATKIN, 1987). A dispersão de larvas de ostras tem influência direta no fluxo gênico de populações. Nos dados aqui apresentados isso se justifica ainda pelo fato dos pontos terem uma proximidade de aproximadamente dois Km um do outro. Vieira *et al.*, (2017) também obtiveram em dois pontos da Bahia de Todos os Santos um alto valor de fluxo gênico de 6,3929.

A distribuição de organismos marinhos adultos, sedentários como moluscos está diretamente relacionada com os efeitos dispersivos das correntes marinhas e das condições climáticas (SELKOE e TOONEN, 2011). As ostras em especial merecem devida atenção, pois em sua fase larval são organismos planctônicos e ficam à deriva, fato que também justifica os valores altos de fluxo gênico encontrados. Apenas na fase pedivéliger que a larva sofre metamorfose, tornando-se bentônica, fixando-se em substrato e recebendo a denominação de semente (CHRISTO et al., 2010).

Galvão e Hilsdorf 2015 ao avaliarem a diversidade genética das populações naturais da ostra de mangue *Crassostrea rhizophorae* ao longo da região de Cananeia no estado de São Paulo, com uso de marcadores microssatélites, obtiveram dados de fluxo gênico com valores de Nm = 3,459 na área de amostragem de Ilha da Casca, seguido de Nm= 2,986 pelas áreas Mandira, Nm = 2,907 para o material coletado no rio Tapera e Nm = 2,821 para o material do Instituto Oceanográfico. Todos esses valores

foram mais baixos do que aqueles apresentados para os indivíduos amostrados no presente estudo. Segundo os autores os valores podem ser explicados a partir da hidrodinâmica do sistema da lagoa que influenciam na taxa de dispersão larval e, conseqüentemente migração e divergência genética.

Melo *et al.* (2010b) através do sequenciamento de indivíduos coletados no estuário do rio Paraíba (Estado da Paraíba, Brasil), encontraram ostras da espécie *Crassostrea gigas*, fixadas a aproximadamente 100 km de seus pontos de cultivo, demonstrando a alta capacidade de dispersão das sementes no ambiente seja por locomoção própria ou impulsionada pelas correntes marinhas, transportando, obviamente, seus caracteres. Tal estudo merece uma devida atenção, principalmente em se tratar de uma espécie exótica do litoral brasileiro e que tem sido descrita por muitos autores na costa do Brasil (MELO *et al.*, 2010b; LAZOSKI *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2013).

As preocupações com os efeitos do extrativismo como atividade econômica nas populações de ostra não são recentes, a diminuições do tamanho da população de *Crassostrea sp.* ocorrem ao longo de toda costa brasileira, devido a efeitos naturais ou antropogênicos (por exemplo, doenças, sobrepesca e deterioração das condições oceânicas) (CHRISTO, 2006). A diminuição dos estoques também foi relatada em populações chinesas e coreanas de *C. gigas* no Mar Amarelo (AN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2015). Cadernas (1984) descreveu a intensa exploração de bancos de ostra naturais na costa oeste do México, já Mancera e Mendo (1996) mostraram evidências da exploração imprudente, por métodos predatórios, de bancos de ostra naturais na Colômbia.

Com base nos resultados da AMOVA e dos índices de fixação (F_{ST}) (Tabela 5), verificou-se que não houve diferença significativa entre os pontos de coleta estudados as quais foram analisadas de uma forma geral. A análise de variância molecular ao considerar os dois pontos de coleta evidenciou que 75,70% da variação total encontram-se dentro das populações estudadas e 24,30% entre as populações, gerando um índice F_{ST} de 0,243.

Tabela 5. Análise de variância molecular dentro e entre as populações da espécie de *Crassostrea* sp.

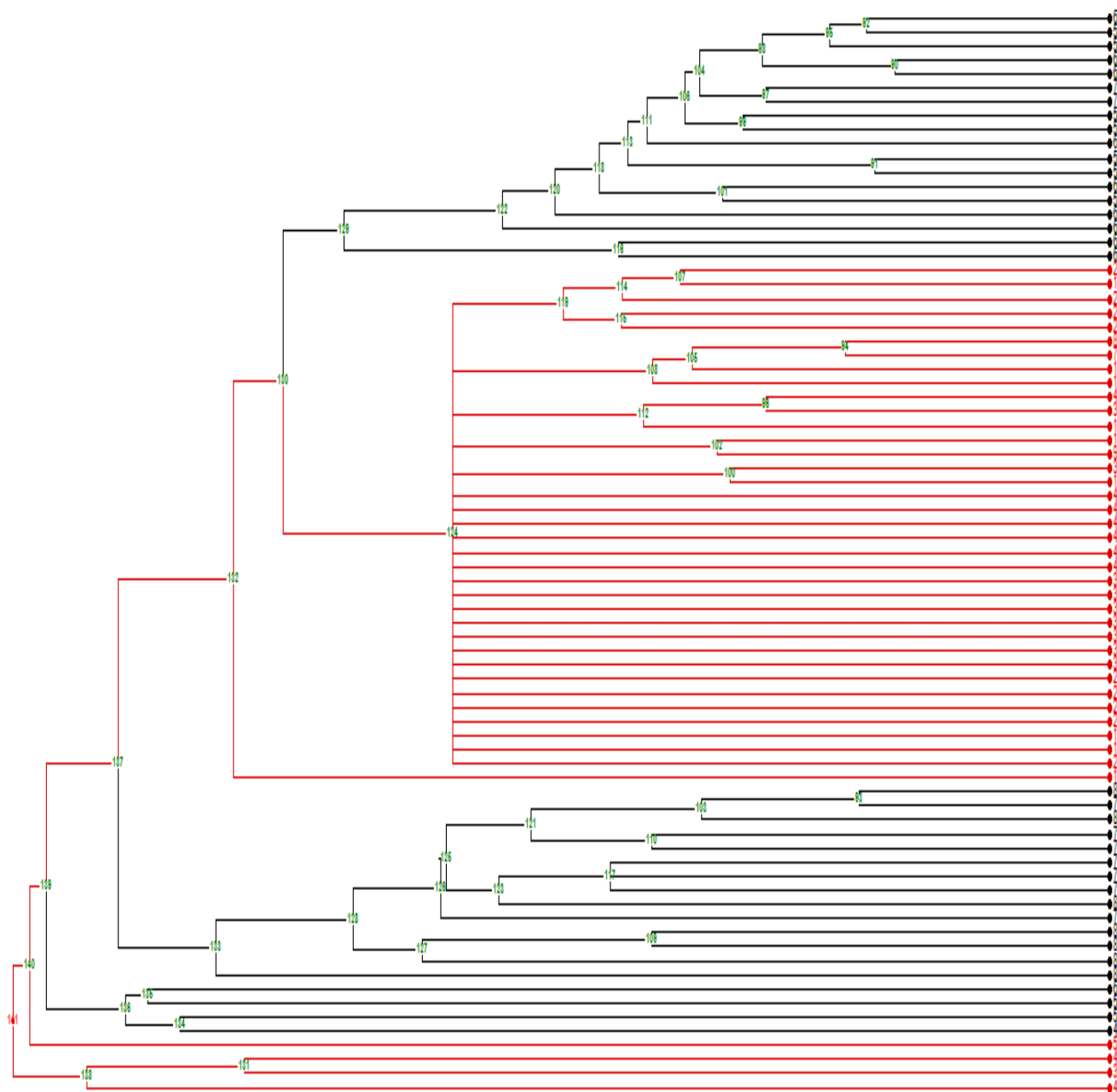
Fontes de Variação	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Percentual de variação
Entre as populações	134,198	2,88940	24,29952%
Dentro das populações	764,335	9,00137	75,70048%
Total	898,534	11,89077	100

*Índice de fixação População total $F_{ST}=0,243$

Para a análise de estruturação populacional segundo Wright (1978), os valores de F_{ST} que se encontram entre 0 e 0,05 configuraram 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. Desse modo podemos concluir que as ostras amostradas na comunidade de Capanema possuem uma alta estruturação genética indicando que os efeitos do extrativismo e outros fatores antrópicos ainda não atingiram diretamente a variabilidade genética das populações estudadas.

Ignacio *et al* 2000 ao avaliarem os níveis de estrutura da população em *C. rhizophorae* ao longo de 1300 km de costa brasileira identificaram um valor muito baixo ($F_{ST} = 0,026$) sugerindo endogamia da população e indicando que as larvas planctônicas e planktotróficas dessas espécies são capazes de dispersão a longo prazo.

Figura 6. Dredograma representativo da distância genética entre os 90 indivíduos coletados, obtido pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), utilizando o complemento aritmético do índice de Jaccard como medida de dissimilaridade, com base em marcadores ISSR. Os indivíduos em vermelho representam os espécimes coletados em ambiente totalmente submerso (1-49), e o de preto os espécimes coletados nas raízes do mangue (50-90).



O dendrograma (Figura 7) mostra que houve uma miscigenação dos grupos, indicando assim a possibilidade de ser apenas uma espécie. Desta forma, a partir da análise dos dados, observa-se que há indivíduos muito próximos, indicando que os mesmos compartilham alelos em comum. Assim, com a dispersão das larvas pela massa d'água, é possível sugerir a presença de apenas uma única espécie de ostra no local

amostrado.

Através das análises realizadas neste estudo, pode-se observar uma grande variabilidade genética intrapopulacional, esse dado corrobora com o analisado por Daltro *et al.* (2013), que constataram características polimórficas que tornam alguns indivíduos distantes geneticamente de outros na mesma população. Assim pelos parâmetros usados de base para essa análise genética observou-se que as ostras coletadas fixas nas pedras (submersas) ou em raízes de mangue na comunidade de Capanema apresentam alta variabilidade genética e a dispersão larval dessa espécie tem sido de grande importância para a manutenção da sua variabilidade genética o que oferece a possibilidade de serem utilizadas em programas de conservação e melhoramento genético.

6. CONCLUSÃO

A partir dos espécimes estudados na região de Capanema- BA foi possível afirmar que iniciadores tipo ISSR utilizados, foram eficientes para detectar uma baixa variabilidade genética intrapopulacional e uma moderada estruturação genética.

Com os resultados obtidos de identidade genética alta (0,9456) e distancia genética baixa (0,0560) encontrados entre as duas populações estudadas, não identificamos a possibilidade de serem populações compostas por espécies diferentes.

A variabilidade genética mostrou ser maior dentro dos pontos de coleta analisados do que entre eles. Assim, ostras coletadas fixas nas pedras (submersas) ou em raízes de mangue na comunidade de Capanema apresentaram baixa variabilidade genética não oferecendo a possibilidade de serem utilizadas em programas de conservação e melhoramento genético.

Sugerimos a introdução de novos indivíduos no intuito de melhorar a variabilidade genética das populações de ostras estudadas e com isso proporcionar um aumento na produção, de forma sustentável, para a comunidade de Capanema – BA que utiliza esse recurso como principal fonte de subsistência.

Contudo, a realização de novos estudos genético moleculares, por meio de outros marcadores, (sequenciamento), com as espécies do gênero *Crassostrea* presentes no estuário da comunidade de Capanema-BA necessitam ser realizados para que se obtenham resultados mais acurados.

7. REFERENCIAS

ABRUNHOSA, J.. Novas Oportunidades na Aquicultura. Pará: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. 2011.

ABSHER, T.M.. Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. Tese de PhD. **Oceanography Institute**, São Paulo. 1989

ADANSON, M.. Histoire Naturelle du Sénégal. Coquillages. Avec la relation abrégée d'un voyage fait en ce pays pendant les années 1759, 50, 51, 52 et 53. **Bauche**, Paris. 1757.

AMARAL, V. S.- Estudo morfológico comparativo de espécie do gênero *Crassostrea* do Atlântico Oeste – Brasil, Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo – **Departamento de Zoologia**. Dissertação de Mestrado. 99 p. 2010.

An, H.S.; Kim, W.J.; Lim, H.J.; Byun, S.G.; Hur, Y.B.; Park, J.Y.; Myeong, J.I.; Na, C.M. Genetic structure and diversity of *Crassostrea gigas* in Korea revealed from microsatellite markers. **Biochem. Syst. Ecol.**, 55 pp. 283-291.2014.

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**, 37: 1598-1600. 2006.

ANTONINI, S.R.C.; MENEGHIN, S.P.; URASHIMA, A.S.. **Técnicas básicas de biologia molecular**. Universidade Federal de São Carlos. Apostila do curso de extensão universitária. 2004

BEZERRIL, G. Trabalho no mangue: os saberes e a busca por valorização das marisqueiras de Fortim-Ceará. **Cadernos do Leme**, 4(1): 5-33. 2012.

BISPO, E. da S.; SANTANA, L. R. de; CARVALHO, R. D. S.; LEITE, C. C.; LIMA, M. A. C. Processamento, estabilidade e aceitabilidade de marinado de vongole (*Anomalocardia brasiliiana*). **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 353-356, 2004.

BOSS, K.J. . Mollusca. In Parker, S.P., Synopsis and Classification of Living Organisms, vol. 1. McGraw-Hill, New York: 945-1166. 1982.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Pesca Artesanal. 2011.

BUROKER, N.E.; HERSHBERGER, W.K.; CHEW, K.K. 1979. Population genetics if

the family Ostreidae. I. Intraespecific Studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. **Marine Biology**, 54: 157-169.

CADERNAS, E. B. Status of molluscan aquaculture on the Pacific coast of Mexico. **Aquaculture**, v. 39, n. 1/4, p. 83-93, 1984.

CHRISTO, S.W.; ABSHER, T.M.. Crescimento da prodissoconcha de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia, Ostreidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, 34(1): 71-77. 2008.

CHRISTO, W.S. Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero *Crassostrea* sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná: Brasil): um subsídio ao cultivo. (Tese doutorado). Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 146 f. 2006.

CHRISTO, SW.; ABSHER, TM. and BOEHS, G.. Morfologia de conchas larvais de três espécies de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia: Ostreidae). **Braz. J. Biol.** vol.70, n.3, pp.645-650, 2010.

COUTO C. S.; MENDES J.; ALMEIDA J. S. C.; LOPES K. S. A área de proteção ambiental do lago da Barragem Pedra do Cavalo: aspectos legais e espaciais. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**. Vitória, 22 a 25 de julho de 2012.

COSTA, P.F.. Biologia e tecnologia para o cultivo. In: Brasil – Ministério da Marinha (org.). **Instituto Nacional de Estudos do Mar. Manual de Maricultura. Cap.VIII, parte B**. Ministério da Marinha, Rio de Janeiro, Brasil,165-192. 1985.

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

ERSE, E.B.; BERNARDES, M.A. . Levantamento de estoques da ostra *Crassostrea* sp. em bancos naturais no litoral paranaense. **Biotemas**, 21: 57-63. 2008.

FALEIRO, F. **Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 102 p. 2007.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture** 2010. Rome,. 218p. 2010.

FREITAS. F.; NEIVA L. G. S.; DA CRUZ. E. S.; SANTANA J. M.; SILVA . I. M. M.; MENDONÇA. F. S. Qualidade microbiológica e fatores ambientais de áreas estuarinas da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape (Bahia) destinadas ao cultivo de ostras nativas. **Eng. Sanit. Ambient.** vol.22 no.4 Rio de Janeiro July/Aug. 2017 Epub Jan 19, 2017

- GAFFNEY, P.M.; ALLEN JR, S.K.. Hybridization among *Crassostrea* species: a review. **Aquaculture**, 166: 1-13. 1993.
- GALVAO, M. S. N.; Hilsdorf, A. W.S. Assessing the genetic diversity of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Bivalvia, Ostreidae) by microsatellite markers in southeastern Brazil. **Marine Biology Research**; v. 11, n. 9, p. 944-954, 2015.
- GENZ, F. **Avaliação dos efeitos da barragem Pedra do Cavalo sobre a circulação estuarina do rio Paraguçu e Baía de Iguape**. Tese de doutorado Universidade Federal da Bahia Instituto de Geociências, Abril, 2006.
- GUILDING, L.. Observations on the zoology of the Caribbean Islands. *Zool. J.*, 3. p. 542.1828.
- GUO, X.; LI, Q. WANG, Q.Z.; KONG, L.F.. Genetic Mapping and QTL Analysis of Growth-Related Traits in the Pacific Oyster. **Marine Biotechnology**, 14: 218-226. 2012.
- GUZENSKI, J. Cultivo de Ostra do Mangue – Perspectivas para o Brasil Anais de Congresso. In: **SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA**, 12., 2000 Florianópolis. Anais... Florianópolis: UFSC, 1 CD-ROM.
- 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**, Berlin, v. 136, n. 6, p. 987-991, July 2000.
- HATJE, V., and ANDRADE, JB., orgs. **Baía de todos os santos: aspectos oceanográficos**. Salvador: EDUFBA, 2009.
- KONG, L.; BAI, J., LI, L.. Comparative assessment of genomic SSR, EST–SSR and EST–SNP markers for evaluation of the genetic diversity of wild and cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. **Aquaculture**, 2013.
- LAM,K.; Morton, B.. Mitochondrial and morphological identification of a new species of *Crassostrea* (Bivalvia:Ostreidae) cultured for centuries in the Pearl River Delta,Hong Kong,China. **Aquaculture**. 228: 1–13, 2003.
- LAMARCK, J. B. Histoire Naturelle des Animaux sans Vertebres. Conchifera. Paris, 6(1):1-343. 1819.
- LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P.; THIRIOTQUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 202, p. 232-242, June 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**. 426: 197-

212. 2011.

LEGAT, J. F. A.; PEREIRA, A. M. L.; LEGAT, A. P.; FOGAÇA, F. H. S. Programa de Cultivo de Moluscos Bivalves da Embrapa Meio-Norte. Documentos 183. Teresina: **EMBRAPA Meio Norte**, 8 p. 2008.

Li, S.; Hubert, K.; Bucklin, V.; Ribes, D. Hedgecock Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mol. Ecol. Notes*, 3 pp. 228-232. (2003).

LOPES, G. R.; GOMES, C. H. A. de M.; TURECK, C. R. e MELO, C. Manuel R. de. Crescimento de *Crassostrea gasar* cultivada em ambientes marinho e estuarino em águas brasileiras. **Pesq. agropec. bras.** [online]. vol.48, n.8, pp.975-982. 2013.

LUDWIG, S.; PATELLA, R.; STOIEV, S.; CASTILHO-WESTPHAL, G.; GIROTTO, M.V.F.; OSTRENSKY, A. A molecular method to detect and identify the native species of southwestern Atlantic *Crassostrea* (Mollusca: Ostreidae). **Zoologia**, 28(4): 420-426. 2011.

OLIVEIRA, N. L. Avaliação do crescimento da ostra nativa *Crassostrea* (sacco, 1897) cultivada em estruturas de sistemas fixos nas localidades de Ponta Grossa (município de Vera Cruz) e Iguape (município de Cachoeira), região do Recôncavo, na Baía de Todos os Santos, Bahia. **Universidade Federal da Bahia**, 2008.

MACCACCHERO, G. B., GUZENSKI, J; FERREIRA, J. F. Allometric growth on mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), cultured in Southern Brazil. *Revista Ciência Agronômica*, v. 36, p. 400-403. 2007.

MANCERA, J.; MENDO, J. Population dynamics of the oyster *Crassostrea rhizophorae* from the Ciénaga Grande de Santa Marta, Colombia. **Fish. Res.**, v. 26, p. 139-148, 1996.

MELO C.M.R.; SILVA F.C.; GOMES C.H.A.M.; Solé-Cava AM and Lazoski C *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. *Biol Invasions* 12:441-449, 2010a.

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*) **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo , v. 33, n. 3, p. 564-572, 2010b.

Meyer, J.P, Allen, N.J. & Smith, C.A. Commitment to organizations and occupations: extension and test of a threecomponent conceptualization. **Journal of Applied Psychology**, 78 (4), 538-551. 1993.

MOREIRA, R. F. C.; FONTELES, S. B. A.; BARRETO N. S. E. VARIABILIDADE GENÉTICA DE OSTRAS COLETADAS NO ESTUÁRIO DO RIO SUBAÉ, SÃO

FRANCISCO DO CONDE - BA **Agrotrópica** Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil 28(1): 71 - 78. 2016.

NASCIMENTO, I. A. *Crassostrea rhizophorae* (Guilding) and *C. brasiliiana* (Lamarck) in South and Central America. Chapter 10. In Estuarine and marine bivalve mollusk culture. Winston Menzel, Florida, USA, CRC Press Inc. pp. 125- 134, 1991.

NASCIMENTO, I.A. Cultivo de ostras no Brasil: problemas e perspectivas. **Ciência e Cultura**, 35: 871-876. 1983.

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

NGUYEN, T.T.T.; HURWOOD, D.; MATHER, P.; NA-NAKORN, U.; KAMONRAT, W.; BARTLEY, D. Manual on applications of molecular tools in aquaculture and inland fisheries management: part 1 - conceptual basis of population genetic approaches. Bangkok, Tailândia. 2006.

OLIVEIRA, D.R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

PARK, L.K. e MORAN, P. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. In: CARVALHO, G.R.; PITCHER, T.J. (Eds.). **Molecular genetics in fisheries. Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 4: 272- 299. 1994.

PEREIRA, O.M.; HENRIQUES, M.B.; MACHADO, I.C. Estimativa da curva de crescimento da ostra *Crassostrea brasiliiana* em bosques de mangue e proposta para sua extração ordenada no estuário de Cananéia, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, 29(1): 19-28. 2003.

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**, 37: 1598- 1600. 2006.

POLI, C. R., LITTLEPAGE. Desenvolvimento do cultivo de mexilhões no Estado de Santa Catarina. **AQUICULTURA BRASIL**, Recife, 1998. Anais... Recife, 1998. V. 1. p. 163-181.

PRITCHARD, D.W. What is an Estuary: Physical View Point. In: Lauff, G.H. (eds). Estuaries. **Washington, American Association for Advance of Science**, p.3-5. 1967.

PROST, C. Resex marinha versus polo naval na baía do Iguape. **Cathérine Novos Cadernos NAEA** v. 13, n. 1, p. 47-70, jul. 2010.

RABELO, M. F.; PFEIFFER, W.CC.; DA SILVA, H.; MORAES, M. O. Cloning and detection of metallotheionein mRNA by RT-PCR in mangrove oysters (*C. rhizophorea*). **Aquatic toxicology**, 64: 359-362, 2003

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. Genética na agropecuária. 5. Ed. Lavras: UFLA, 566p. 2012.

RIOS, E. 1973. Seashells of Brazil. 2 ed. Ed. da Furg, Rio Grande. 432p. 2003.

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

ROUX, O.; GEVREY, M.; ARVANITAKIS, L.; GERS, C.; BORDAT, D.; LEGAL, L. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 240-250, 2007.

SACCO, F. I. Molluschi dei terreni terziarii del Piemont e della Ligúria. **Musei Zoologia Anatomia Comp. R. Univ. Torino, Boll.**, v.12, n. 298. 1897a.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STROFFEL, S., SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzyme amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-491. 1988.

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.

SANTOS, S. A. A.; Pesquisa de protozoários Apicomplexa em ostra *Crassostrea rhizophora*, Guilding, 1828 (bivalva: Ostreidae) da Baía de Todos os Santos, bahia.2014. 67f. Trabalho de conclusão de curso (dissertação) – Universidade Estadual de Feira de Santana, 2014.

SANTOS, S. S.; EVANGELHISTA-BARRETO, N. S.; BARRETO, L. B. Cadeia produtiva de ostra no Baixo sul da Bahia: um olhar socioeconômico, de saúde pública, ambiental e produtivo. **Acta Fish. Aquat. Res.** V.5, p. 10-21, 2017.

SANTOS, S.S., FALETA1, L.G., Cova, A.W., BARRETO, L.M. & EVANGELISTA-BARRETO, N.S. Perfil socioeconômico dos extrativistas e produtores da ostra de mangue, *Crassostrea spp.* no entorno de Valença, Bahia, Brasil. In: **XVII Congresso Brasileiro de Engenharia de Pesca**, 2011, Belém. Anais... Belém: Associação Brasileira dos Engenheiros de Pesca. 2011.

SELKOE, K. ; Toonen, R.J. Marine connectivity: a new look at pelagic larval duration and genetic metrics of dispersal. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* , 436 , pp. 291 – 305. 2011.

SHAKLEE J.B.; BENTZEN P. Genetic identification of stocks of marine fish and shellfish. *Bulletin of Marine Science*, 62, 589– 621. 1998.

SILVA P. M; SCARDUA, M.P; VIEIRA, C.B; ALVES, A. C.; DUNGAN, C. F. Survey of Pathologies in *Crassostrea gasar* (Adanson, 1757) Oysters from Cultures and Wild Populations in the São Francisco Estuary, Sergipe, Northeast Brasil. **Journal of Shellfish Research**, v.34, p.289-296. 2015.

SILVA, J.R.; BOEHS, G. Ocorrência e distribuição de larvas de ostras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) na Baía de Camamu, Bahia. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu – MG**. 1-2. 2007.

SINGARAJAH, K.V. On the taxonomy, ecology and physiology of a giant oyster, *Crassostrea paraibanensis*, a new species. **Bull. Mar. Sci.**, v.30, p.833–847. 1980.

SIQUEIRA, K. L. F. **Avaliação do sistema de cultivo de ostra do gênero *Crassostrea* (SACCO, 1897) no estuário do Rio vaza-barris (Sergipe)**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes 77p. UNIT, Aracaju, 2008.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787-792, 1987.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573p.

SOUTO, F. J. B.; MARTINS, V. S. Conhecimentos etnoecológicos na mariscagem de moluscos bivalves no Manguezal do Distrito de Acupe, Santo Amaro - BA. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 4, p. 207-218, dez. 2009.

SOUZA, D.C.L. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**, v.17, n.3, p.495-503, 2015.

STATSOFT Inc. Statistica for Windows (data analysis software system), version 7.1. **Statsoft, Tulsa, Oklahoma (USA)**. (2005).

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.

THORPE, J. P.; SOLÉ-CAVA, A. M.; WATTS, P. C. Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. **Hydrobiologia, The Hague**, v. 420, n. 1, p. 165-184, Feb. 2000.

THORPE, J.P.; SOLÉ-CAVA, A.M. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. **Zoologica Scripta**, 23: 3-18. 1994.

VARELA, E. S. et al. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **Journal of Molluscan Studies**, v. 73, n. 3, p. 229–234, 11 jul. 2007.

VIEIRA R. B.; ALMEIDA D. O. C.; MOREIRA R. F. C.; FONTELES S. B. A.; BARRETO N. S. E.; FONSECA K. Z. Caracterização genética de ostras *Crassostrea spp.* Da região de Graciosa e Santiago do Iguape - Ba, por meio de marcadores ISSR **Rev. Bras. Eng. Pesca** 9(2): 120-134, 2017.

VILLARROEL, E.; BUITRAGO, E.; LODEIROS, C. Identification of Environmental Factors Affecting Growth and Survival of the Tropical Oyster *Crassostrea rhizophorae* in Suspended Culture in the Golfo de Cariaco, Venezuela. **Revista Científica**, 14(1): 28-35. 2003.

WAKAMATSU, T. **A ostra de Cananéia e o seu cultivo**. SUDELPA, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. San Pablo, Brasil. 1973

Wu, K.R., Jones, L. Dannaeburger P.A. Scolnik, *Detection of microsatellite polymorphisms without cloning*. **Nucleic Acids Research**, 22: 3257–3258. 1994.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T.B.J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biologists and biotechnology centre**. University of Alberta, 1997.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics, San Diego**, v. 20, p. 176-183. 1994.