

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

SANDRA LUDWIG

**OTIMIZANDO A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LARVAS,
SEMENTES E ADULTOS DE *Crassostrea* spp. (SACCO 1897)
ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES**

CURITIBA
2011

SANDRA LUDWIG

OTIMIZANDO A DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LARVAS,
SEMENTES E ADULTOS DE *Crassostrea* spp. (SACCO 1897)
ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES.

Dissertação apresentada Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Zoologia.

Orientador: Walter Antônio Pereira Boeger

CURITIBA
2011

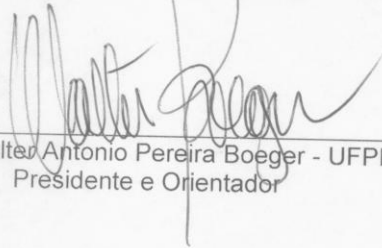
Termo de aprovação

OTIMIZANDO A DETECÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO DE LARVAS, SEMENTES E
ADULTOS DE *Crassostrea spp.* (SACCO 1897) ATRAVÉS DE MARCADORES
MOLECULARES

Por

SANDRA LUDWIG

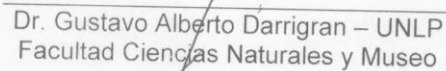
Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores



PhD. Walter Antonio Pereira Boeger - UFPR
Presidente e Orientador



Dr. Carlos Eduardo Belz - UFPR



Dr. Gustavo Alberto Darrigran – UNLP
Facultad Ciencias Naturales y Museo

Curitiba, 23 de fevereiro de 2011.

“O reverso da disposição de lutar contra a maré montante do amor-próprio na busca do conhecimento é a capitulação da mente que se entrega e se deixa levar pela doce vazante do auto-engano. Quando as águas profundas se agitam e desgovernam, a lógica naufraga e o intelecto, por mais formidável que seja, vira joguete na correnteza do acreditar.”

Eduardo Giannetti

AGRADECIMENTOS

Ao professor Walter A. Boeger, pela oportunidade de fazer parte do seu “ninho” de alunos, por todos os ensinamentos compartilhados, pelo exemplo de pesquisador e pelo convívio durante os últimos anos.

À minha estimada família, aos meus pais - Francisco e Luzia Ludwig – por terem me apoiado, por sempre estarem com as mãos estendidas a mim. Obrigada por todos os sacrifícios sofridos pela minha vida e minha formação. A minha irmã Luana, pelo exemplo de coragem, determinação, pelo incentivo, pelas sugestões e correções, e acima de tudo, pela amizade incondicional.

Agradeço ao meu namorado, André Tochetto, pelo companheirismo, carinho, pelos esforços em me incentivar desde o começo a nunca desistir de meus (nossos) sonhos. E por todos os “puxões de orelha”. Te amo!

Às minhas amigas, Nefertiris, Gilda e Marcella pela ajuda, pelas sugestões, por compartilhar comigo seus pensamentos e sentimentos, e acima de tudo pela grande amizade.

Ao curso de Pós-Graduação em Zoologia pela oportunidade de estar presente em uma pequena parte de sua história. E a todos que garantiram suporte financeiro para que o projeto pudesse ser desenvolvido: a CAPES e ao GIA (Grupo Integrado de Aquicultura).

Aos queridos Professores Dr. Gustavo Darrigran e Dr. Carlos Eduardo Belz, que tão solícitamente atenderam ao nosso pedido para compor a banca, oferecendo a oportunidade de compartilhar seus conhecimentos e experiências para avaliação deste trabalho. Aos dois, meus sinceros agradecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva - Raquel, Sérgio, Michele, Renata, Annelise, Mari, Carol, Rodrigo, Marlus, Luciana, Marcel, Flávio, Baggio e Rafa. O pouco que sei hoje foi graças a vocês!

MUITO OBRIGADA!!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	X
RESUMO	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO GERAL.....	14
REFERÊNCIAS.....	20

CAPÍTULO I. FERRAMENTA MOLECULAR DE PROSPECÇÃO RÁPIDA E SENSÍVEL PARA ESPÉCIES NATIVAS DE *Crassostrea spp.*

25

RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	42

CAPÍTULO II. TESTANDO MARCADORES MOLECULARES DE DUAS ESPÉCIES DE *Crassostrea spp.* EM CAMPO

46

RESUMO.....	47
ABSTRACT.....	48
INTRODUÇÃO.....	49
MATERIAL E MÉTODOS.....	50
RESULTADOS.....	53
DISCUSSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	59

CAPÍTULO III. DETECTADA ESPÉCIE INVASORA NA BAÍA DE GUARATUBA (PARANÁ, BRASIL) UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES.....

61

RESUMO.....	62
-------------	----

ABSTRACT.....	64
NOTA	65
REFERÊNCIAS.....	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
ANEXOS	78
Anexo I: Alinhamento das sequências obtidas do GenBank para desenhar os primers específicos (assinalados) de <i>Crassostrea rhizophorae</i> , <i>Crassostrea brasiliiana</i> e <i>Crassostrea gigas</i>	78

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Metodologia resumida dos procedimentos moleculares utilizados em laboratório para o desenvolvimento dos marcadores de detecção e identificação das espécies de *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae*.....33
- Figura 2.** Testes de sensibilidade aplicados aos marcadores moleculares específicos de (B) *C. brasiliiana* e (R) *C. rhizophorae* e, marcadores moleculares de (C) controle, em diferentes diluições de amostras de plâncton - da esquerda para a direita a concentração de DNA diminui, (1:1) 2 ng/μL, (1:10) 0.2 ng/μL, (1:100) 0.02 ng/μL, (1:1000) 0.002 ng/μL, (1:10000) 0.0002 ng/μL, (C-) Controle Negativo – e o resultado da análise do software Gel-Pro Analyzer, mostrando a sensibilidade e intensidade dos picos, de 0 a 300, produzidos por densidade óptica.....39
- Figura 3.** Teste de sensibilidade aplicado para detectar a concentração de DNA estimado de uma larva em plâncton – (L) Ladder lower, (2) Controle positivo composto por amostra de tecido adulto de cada uma das espécies de ostras, (3) Amostra de plâncton e de *C. brasiliiana*, (4) Amostra de plâncton e de *C. rhizophorae*, (5) Amostra de plâncton e ambas espécies de ostras, (6) Somente amostra de plâncton e, (C-) Controle Negativo.40

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Mapa da área de estudo focalizando os pontos de coleta na Baía de Guaratuba, no estado do Paraná. Os pontos foram titulados de acordo com o nome do cultivo no local: (1) Cabaraquara, (2) Vicente e (3) Parati.51
- Figura 2.** Resultado obtido após submeter uma (1) amostra de plâncton às diluições (2) 1:10 e (3) 1:100, ao PCR Multiplex. (L) Leader 1Kb, (18S)

Fragmento obtido pela amplificação dos primers universais, (R) Resultado positivo para presença de *C. rhizophorae*, (B) Resultado positivo para presença de *C. brasiliana* e, (C-) Controle Negativo.54

Figura 3. Histograma de porcentagem de *C. rhizophorae* e *C. brasiliana* e uma espécie não identificada de ostra detectada de Janeiro a Abril de 2010 de coletores instalados na região de Cabaraquara (Baía de Guaratuba, Brasil). A linha tracejada do gráfico indica a porcentagem de indivíduos que não puderam ser identificados devido à fixação inadequada e DNA degradado. O número total de espécimes coletados e processado a cada mês se encontra entre parênteses juntamente com o mês.56

CAPÍTULO III

Figura 1. Resultado da amplificação de PCR Multiplex utilizando iniciadores universais (18S) e iniciadores específicos para (R) *C. rhizophorae*, (B) *C. brasiliana* e (I) espécie invasora. (L) Leader 100pb, (1) Amostra de tecido adulto com 2 ng/ μ L e suas diluições (2) 0.2 ng/ μ L, (3) 0.02 ng/ μ L, (4) 0.002 ng/ μ L, (C-) Controle Negativo.....68

Figura 2. Resultado obtido após submeter três amostras de plâncton à reação de PCR Multiplex. (*) Fragmento de 18S, (L) Leader 1Kb, (G) Controle Positivo de *C. gigas*, (B) Controle Positivo de *C. brasiliana*, (R) Controle Positivo de *C. rhizophorae*, (1) Amostra de plâncton 1 com 50 ng/ μ L e suas diluições (2) 1:10 com 5 ng/ μ L e (3) 1:100 com 0.5 ng/ μ L, (4) Amostra de plâncton 2 com 50 ng/ μ L e suas diluições e suas diluições (5) 1:10 com 5 ng/ μ L e (6) 1:100 com 0.5 ng/ μ L, (7) Amostra de plâncton 3 com 50 ng/ μ L e suas diluições (8) 1:10 com 5 ng/ μ L e (9) 1:100 com 0.5 ng/ μ L, (C-) Controle Negativo: sem amostra.....72

Figura 3. Árvore filogenética consenso gerada pela análise Bayesiana para o gênero *Crassostrea* baseado no fragmento 16S rRNA. *Saccostrea mordax* e *Ostrea denselamellosa* foram usadas como grupo externo. Os ramos terminais

nomeados como ID, são sequencias produzidas a partir dos primers específicos desenvolvidos neste trabalho. Os números abaixo dos ramos indicam valores de Bootstrap que suportam cada ramo.....73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela I. Pontos de Coleta na Baía de Guaratuba – PR, Brasil.31

Tabela II. Lista de primers utilizados nos protocolos da PCR.38

CAPÍTULO II

Tabela I. Primers utilizados para o desenvolvimento dos protocolos de PCR Multiplex, suas sequências de nucleotídeos e genes, respectivos.54

Tabela II. Pontos coletados e os resultados para as análises mensais das amostras de zooplâncton com o protocolo proposto para detectar e identificar as espécies de *Crassostrea*. (B) Amostra positiva para *C. brasiliana*, (R) Amostra positiva para *C. rhizophorae*, (-) Resultado negativo para ambas as espécies.55

CAPÍTULO III

Tabela I. Pontos de Coleta na Baía de Guaratuba - PR, Brasil e o tipo de amostra coletada em cada ponto.....71

Tabela II. Sequencias obtidas do GenBank mostrando a localidade de origem, o número de sequencias utilizadas e seus respectivos números de acesso.....71

RESUMO

A ostreicultura no Brasil depende basicamente do cultivo de três espécies de *Crassostrea*, *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea brasiliiana*, espécies nativas, e *Crassostrea gigas*, uma espécie introduzida. A introdução de espécies não-nativas, tal como *C. gigas*, pode ter consequências ecológicas e/ou econômicas, por isso sua introdução é proibida por leis no país. Devido às dificuldades na produção de larvas e sementes de ostras nativas em laboratório, os cultivadores buscam técnicas que os permitam atender a demanda de sementes para produção. Assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma ferramenta molecular capaz de detectar larvas de *C. rhizophorae* e de *C. brasiliiana* em amostras de plâncton e identificar sementes das mesmas espécies, simultaneamente em uma única reação de PCR Multiplex. O protocolo de PCR Multiplex desenvolvido nesse estudo utiliza iniciadores universais para avaliar a integridade da amostra, juntamente com um par de iniciadores específicos para *C. rhizophorae*, outro para para *C. brasiliiana*. Os iniciadores específicos foram desenvolvidos com base nas diferenças nucleotídicas do DNA de cada espécie, resultando em uma amplificação de fragmentos específicos para cada uma das espécies de ostras. O protocolo foi avaliado quanto sua sensibilidade e especificidade, e testados na identificação de larvas e sementes de ostras na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. O protocolo de PCR Multiplex foi aplicado de Janeiro a Junho de 2010 em 34 amostras de plâncton, a fim de testar a aplicabilidade do método em detectar e identificar a presença de larvas das espécies-alvo, também foi aplicado em 246 sementes, no intuito de testar a capacidade de diferenciação entre as espécies. Os testes realizados, a partir do protocolo de PCR Multiplex, detectaram o DNA de *C. rhizophorae* em concentrações baixas de 0.002 ng/ μ L, e muito mais baixo de 0.0002 ng/ μ L para *C. brasiliiana*. A PCR Multiplex desenvolvida detectou e identificou com sucesso a presença de DNA de uma única larva de cada espécie nativa, separadas ou combinadas, quando misturados com o extrato total de DNA de uma amostra de plâncton, representando 1000 L de água filtrada. Das 34 amostras de plâncton coletadas, larvas de *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* foram detectadas no ponto Cabaraquara em todos os meses amostrados, e *C. gigas* foi detectada nos meses de Janeiro e Abril. Dos 246 indivíduos coletados, 16% foram identificados como *C. brasiliiana* e aproximadamente 24% foram identificados como *C. rhizophorae*, 32% foram identificados como *Crassostrea* sp., mas não foi identificada como sendo uma das espécies-alvo; e 28% das amostras não foram adequadamente preservadas. Ao testar a especificidade de primers desenvolvidos para a identificação e prospecção de *C. gigas*, as sequências obtidas da amplificação de fragmentos do DNA mitocondrial foram submetidas à ferramenta BLAST do GenBank. As sequências de maior similaridade foram aquelas identificadas como *Crassostrea* sp., de indivíduos registrados previamente como uma espécie de ostra invasora da região Norte do Brasil mas que ainda não foi formalmente identificada. Assim, amostras positivas para esse marcador podem representar tanto *C. gigas* ou *Crassostrea* sp. Para confirmar a espécie detectada, no momento, é necessário realizar o sequenciamento do fragmento amplificado. Baseando-se nesses resultados, os iniciadores específicos desenvolvidos para *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae* são capazes de ser aplicados continuamente para

o monitoramento dos períodos de liberação de larvas e do ciclo reprodutivo em si. Finalmente, esforços laboratoriais estão sendo direcionados para definir iniciadores específicos para diferenciar *C. gigas* de *Crassostrea* sp. na reação de PCR Multiplex.

Palavras-chave: primers específicos; PCR Multiplex; ostras; plâncton

ABSTRACT

The oysterculture in Brasil is dependent on the culture of three species of *Crassostrea*, *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea brasiliiana*, native species, and *Crassostrea gigas*, an introduced species. The use of *C. gigas* is limited since new introductions and translocations of non-native species can generate ecological and/or economics consequences and is prohibited by law in the country. Due to the difficulties in production of larvae and seeds of native oysters in laboratory, the growers seek techniques that will help them providing spats for the activity. Thus, this study developed a molecular tool capable of detecting larvae of *C. rhizophorae* and *C. brasiliiana* in plankton samples, and of identifying seeds of the target-species, simultaneously in a single reaction of Multiplex PCR. The Multiplex protocol developed uses universal primers to evaluate the integrity of the samples, together with a pair of specific primers to *C. rhizophorae* and another to *C. brasiliiana*. The specific primers were developed based on nucleotide differences of DNA sequence for each species, resulting in an amplification of unique fragments of each oysters species. The protocol was evaluated for its sensitivity and specificity, and was tested in the identification of larvae and seeds of oysters in Guaratuba Bay, Paraná, Brazil. The Multiplex-PCR protocol was implemented from January to June 2010 in 34 plankton samples, to test the applicability of the method to detect and identify the presence of larvae of the target-species in field samples. It was also tested in the identification of 246 seeds. Further testing indicates that the Multiplex-PCR protocol is capable of detecting the presence of the DNA of *C. rhizophorae* when in low concentrations as 0.002 ng/ μ L, and much lower as 0.0002 ng/ μ L, in the case of *C. brasiliiana*. The protocol also detected and identified successfully the presence of the DNA-equivalent of a single larva of each species, both separated or combined, when mixed with total DNA extract of a plankton sample representing 1000 L of filtered water. The 34 plankton samples collected, larvae of *C. rhizophorae* and *C. brasiliiana* were detected in Cabaraquara sampled each month. Of the 246 individuals collected, 16% was identified as *C. brasiliiana* and approximately 24% was identified as *C. rhizophorae*, 32% were identified as possible *Crassostrea* sp. - but neither of the two target - and 28% were not appropriately preserved. Finally, BLAST of a fragment amplified with a probable species-specific primer for *C. gigas* resulted in great similarity with sequences of *Crassostrea* sp., an putative invasive species detected previously in the Northern coast of Brazil. Thus, the primers that tentatively targeted *C. gigas* cross reacts with *Crassostrea* sp. Thus, positive samples for this marker may represent either *C. gigas* or *Crassostrea* sp. Confirmation of the species, at the moment, requires sequencing of the fragment amplified. Based on these results, the specific primers developed for *C. brasiliiana* and *C. rhizophorae* are capable of being applied continuously to monitor the period of larval release and other stages of its the reproductive cycle (e.g spats). Finally, laboratory efforts are being directed to define specific primers for differentiating *C. gigas* from *Crassostrea* sp. in the reaction of Multiplex PCR.

Key words: specific primers; PCR multiplex; oysters; plankton

INTRODUÇÃO GERAL

A maricultura têm se expandido rapidamente nas últimas décadas, suprimindo cada vez mais a carência por alimentos (Pereira *et al.* 2003). Uma das fontes de extração marinha mais antiga são as ostras, que data desde os primórdios da civilização (Alves 2004). A extração de ostras gera uma cadeia de atividades relacionadas que traz vantagens econômicas e sociais, pois além de ser uma fonte de renda das comunidades costeiras, também faz parte da dieta alimentar (Ignacio *et al.* 2000; Oliveira 2005).

Inicialmente, o cultivo de ostras gerava pequenos impactos ambientais, no entanto, com o aumento da demanda, passaram a ter caráter predatório à medida que o número destes organismos foi reduzido. Essa maior demanda levou ao desenvolvimento de técnicas para produzir maiores quantidades de ostras para atender o mercado crescente, sem ameaçar ou destruir os recursos naturais (Santos *et al.* 2009).

Dentre as ostras, o gênero *Crassostrea* (Sacco 1897) é o mais cultivado no mundo, pois sua técnica de cultivo já está amplamente estabelecida e é economicamente viável (Spencer 1990, Manzoni & Schmitt 2006). A espécie com maior destaque no cultivo é *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793), originária da Ásia, foi introduzida em diversas regiões do mundo objetivando fomentar o cultivo de ostras (Grizel and Hédal 1991, Diederich *et al.* 2005, Christo 2006).

A princípio, acreditava-se que a reprodução de *C. gigas*, também conhecida como ostra do Pacífico, não teria sucesso em ambientes naturais de outras regiões, pois seria incapaz de se fixar nos substratos naturais adversos (Dijkema 1997). Porém, essa teoria foi descartada quando a espécie foi detectada em bancos naturais em várias partes do mundo, como por exemplo, na costa da Nova Zelândia (Smith *et al.* 1986) e nas águas Sul-Americanas do Oceano Atlântico como, no litoral do Brasil (especificamente em Santa Catarina) (Melo *et al.* 2010a) e Argentina (Castaños *et al.* 2009).

Como uma espécie introduzida, a ostra do Pacífico pode influenciar e ocasionar mudanças ecológicas dos ambientes marinhos, como desestruturar as comunidades de organismos e a dinâmica das cadeias tróficas, possibilitar a entrada de outros organismos patogênicos ou invasores e, ainda, gerar competição interespecífica com as espécies nativas de ostras (Patil *et al.* 2005).

No Brasil, existem pelo menos três espécies do grupo *Crassostrea* que estão distribuídas pela costa. Duas espécies são nativas: *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck 1819). A terceira, *C. gigas*, foi introduzida na década de 1970 pelo IEAPM - Instituto de Pesquisas do Mar Almirante Paulo Moreira (Poli and Littlepage 1998). Recentemente, uma quarta espécie foi detectada na região de Bragança, no estado do Pará, denominada como *Crassostrea* sp. (Melo *et al.* 2010b).

Para evitar novas introduções, a translocação de juvenis e adultos de *C. gigas* atualmente é controlada por leis estaduais e federais no Brasil (IBAMA 1998), possibilitando o enfoque no cultivo de ostras nativas (Melo *et al.* 2010a).

No litoral dos Estados da Bahia, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina, se encontram bancos naturais formados por adultos e sementes de *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae*, fixados em substratos rochosos e/ou em raízes do mangue (Christo 2006, Erse e Bernardes 2008). Santa Catarina é o maior cultivador de ostras do Brasil, representado pela cidade de Florianópolis, região sul do país, na safra 2000/2001 alcançou a produção de 563.860 dúzias da espécie *C. gigas*. Nesse estado o cultivo da espécie invasora é permitida, ao contrário do estado vizinho ao norte, Paraná (Poli and Littlepage 1998).

Na costa do Paraná o cultivo de ostras na Baía de Paranaguá e de Guaratuba tem aumentado o interesse dos aquicultores e das autoridades locais, pois além de complementar a fonte de renda familiar também atrai investimentos para aumentar a produção e comercialização de ostras na região (Christo 2006).

A Baía de Guaratuba (25°52'S, 48°39'W) é caracterizada por um sistema estuarino com influência fluvial sazonal bem pronunciada, as temperaturas variam de 20°C no inverno a 26°C no verão, a salinidade tende a variar de 26 no

inverno a 1.3 no verão e o pH entre 8.04 no inverno a 6.5 no verão (Mizerkowski 2007). A Baía é composta por 16 rios dos quais 14 nascem na Serra do Mar. É a segunda maior Baía do estado do Paraná com 48,72 km² de extensão e, sua vegetação é predominada por manguezais ao longo de suas margens. Essa Baía faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guaratuba que tem como objetivo garantir a proteção da rede hídrica e dos complexos estuarinolagunares remanescentes e garantir o uso racional dos recursos naturais, viabilizando a coexistência das diversas atividades exercidas nessa região. A APA de Guaratuba abrange os municípios de Guaratuba, Matinhos, Paranaguá, Tijucas do Sul e São José dos Pinhais (Mizerkowski 2007). Nessa região são encontrados bancos naturais de ostras em locais de fácil acesso propiciando a retirada dos organismos pelos aquicultores; isso tem levado a intensa exploração desses bancos e, assim, surge a dificuldade de encontrar ostras com tamanhos satisfatórios para a comercialização. Além disso, a população local dessa baía tem promovido o desenvolvimento local da ostreicultura fazendo uso do sistema espinhel. Essa atividade tem relevante importância socioeconômica, pois complementa a dieta alimentar e é a principal fonte de renda da população da região (Christo e Absher 2008).

O aprimoramento do cultivo das espécies nativas no Brasil esbarra no obstáculo da criação de larvas e sementes em laboratórios, pois a tecnologia não está bem estabelecida e laboratórios especializados são escassos (Poli and Littlepage 1998). A alternativa restante para os produtores é realizar a coleta de larvas e sementes em ambientes naturais, mas nesse caso existem dificuldades em identificar a espécie dos indivíduos coletados (Maccacchero *et al.* 2007). Devido à falta de estudos sobre os períodos do ciclo reprodutivo e colonização das espécies nativas, os cultivadores coletam manualmente todas as sementes e organismos adultos disponíveis nos coletores, ao longo de todo o período do cultivo (Poli and Littlepage 1998).

A presença das duas espécies nativas de ostras na Baía de Guaratuba foi confirmada por vários autores baseando-se na morfologia das conchas (Absher 1989) e por dados moleculares (Ignácio *et al.* 2000, Pie *et al.* 2006a). As duas

espécies detectadas são conhecidas como ostras de mangue, se encontram sob os mesmos habitat e fixam-se nos mesmos substratos (Siqueira 2008). Apesar de *C. brasiliiana* crescer mais rapidamente que *C. rhizophorae* (apresentando maior potencial para comercialização e se tornando o foco do aumento dos cultivos no Brasil), ainda existem controvérsias sobre a identificação e o número das espécies devido às características morfológicas ambíguas (tais como, coloração, forma, estrutura, cicatriz do músculo adutor; Ignacio *et al.* 2000, Varela *et al.* 2007).

A morfologia das larvas e das sementes é altamente conservada, dificultando a identificação das espécies em estudos ecológicos e aumentando os esforços para determinar o tempo adequado de coleta das larvas para o cultivo (Melo 2008). No caso das conchas, a morfologia pode ser fortemente influenciada pelas condições ambientais, o que também dificulta a identificação (Varela *et al.* 2007, Christo *et al.* 2010).

Estudos sobre o ciclo de vida e dinâmicas de colonização das espécies nativas poderiam fornecer dados, que proporcionariam o desenvolvimento de estratégias mais adequadas de coleta e o manejo das ostras (Erse e Bernardes 2008, Melo *et al.* 2010a). No entanto, esses estudos envolvem o monitoramento, prospecção e identificação das espécies, que são processos demorados e de difícil aplicação (Christo 2006).

O monitoramento das fases larvais permite a detecção das espécies antes de seu assentamento em substrato, exigindo menor esforço de coleta e possibilitando prever a época de fixação. Todavia, também apresenta problemas, pois exige o processamento detalhado da amostra e o conhecimento taxonômico das larvas das espécies (Toro 1998). Observações realizadas somente com auxílio de microscopia óptica não são suficientes, assim, Christo *et al.* (2010) usaram microscopia eletrônica de varredura para diferenciar morfológicamente as larvas das ostras nativas. A aplicação dessa técnica para o monitoramento contínuo de inúmeras amostras de zooplâncton é inviável, além de ser economicamente desvantajosa. Se o ciclo de vida e de assentamento das duas espécies nativas não

é sincronizado, o monitoramento de larvas no plâncton poderia prever o tempo de assentamento de cada espécie, maximizando o sucesso na obtenção de larvas das ostras.

Já o monitoramento por observação das fases adultas detecta a presença das ostras quando estas já estão fixadas em substrato, o que não permite estudos dos processos de recrutamento e colonização do ambiente.

Métodos mais eficientes e rápidos para realizar o monitoramento são aqueles que utilizam marcadores moleculares na identificação das espécies (Morgan and Rogers 2001, Lapégué *et al.* 2002, Varela *et al.* 2007). No Brasil, essas metodologias ajudaram a esclarecer a sistemática das ostras (Maccacchero *et al.* 2007) e possibilitaram revalidar *C. brasiliiana*, que já foi considerada uma espécie sinónima de *C. rhizophorae* (ver Siqueira 2008).

Estudos para entender o processo do recrutamento, da reprodução e da dinâmica populacional, são geralmente realizados através de análises de dispersão larval no plâncton (Anil *et al.* 2002, Kotta *et al.* 2006). Felizmente, com o avanço da tecnologia genética é possível delinear um método de monitoramento e identificação de estágios larvais e adultos, utilizando marcadores moleculares específicos e, ao mesmo tempo, altamente sensíveis, confiáveis e eficientes (Morgan and Rogers 2001).

Metodologias semelhantes foram desenvolvidas anteriormente utilizando marcadores moleculares para detectar e diferenciar espécies de ostras da costa do Pacífico (Wang and Guo 2007). Patil *et al.* (2005) desenvolveram uma metodologia capaz de diagnosticar a presença das larvas de *C. gigas* em amostras de plâncton utilizando Nested-PCR, mas nesse método são necessárias várias reações separadas, tornando o método caro, demorado e exigindo trabalho esforçado. Para testar uma metodologia mais acessível, Pie *et al.* (2006a) diferenciaram três espécies de ostras, utilizando PCR-RFLP com enzimas de restrição, que ocorrem na costa do Atlântico sul.

É interessante o estudo dessas técnicas, pois promovem informações adicionais que podem ser utilizadas para realizar estudos de genética

populacional, comparar as informações de DNA de outras regiões e, ainda, estudar os relacionamentos filogenéticos (Yu and Li 2007).

Neste trabalho, é descrito o desenvolvimento de uma reação de PCR Multiplex (Henegariu *et al.* 1997) que apresenta alta sensibilidade e precisão na identificação das espécies de *Crassostrea* spp., também é descrito a aplicação desta ferramenta molecular para detecção de larvas em amostras de zooplâncton e na identificação de sementes e adultos de *Crassostrea* spp.

Diante do exposto, esta metodologia trará informações para: 1) auxiliar na identificação e diferenciação de *Crassostrea* spp; 2) entender a distribuição padrão das larvas, sementes e adultos em ambientes naturais; 3) monitorar a presença das larvas e sementes para prever os períodos de liberação e assentamento das ostras; 4) selecionar os pontos mais adequados para a coleta das larvas e sementes e; 5) subsidiar atividades de cultivo adequadas a cada espécie de uma região.

REFERÊNCIAS

- Absher, TM (1989) Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. Ph.D. Thesis, Instituto de Oceanografia, USP, São Paulo.
- Alves, R (2004) Estudo taxonômico de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897, da região da Grande Florianópolis. MSc. Tese, Departamento de Aquicultura, UFSC, Santa Catarina.
- Anil, AC; Venka TK; Sawant SS; Dileepkumar M; Dhargalkar VK; Ramaiah N; Harkantra SN; Ansari ZA (2002) *Marine Bioinvasion: Concern for ecology and shipping. Current Science*, 83,214-218.
- Castaños, C; Pascual M; Camacho AP (2009) Reproductive biology of the nonnative oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793), as a key factor for its successful spread along the rocky shores of northern patagonia, Argentina. *Journal of Shellfish Research* 28: 837-847
- Christo, WS (2006) Biologia Reprodutiva e Ecologia de Ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná-Brasil): Um Subsídio ao Cultivo. Dr. Tese, Departamento de Zoologia, UFPR, Paraná. (<http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/1884/5198/1/Tese.pdf>).
- Christo, SW; Absher, TM (2008) Crescimento da Prodissoconcha de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia, Ostreidae). *B. Inst. Pesca*, 34(1): 71-77.
- Christo, SW; Absher, TM; Boehs, G (2010) Morphology of the larval shell of three oyster species of the genus *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia: Ostreidae). *Braz. J. Biol.* 70 (3): 645-650. doi: 10.1590/S1519-69842010000300023.
- Diederich, S; Nehls, G; van Beusekom, JEEE; Reise, K (2005) Introduced Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) in the northern Wadden Sea: invasion accelerated by warm summers? *Helgol. Mar. Res.* 59: 97-106.
- Dijkema, R. (1997). Molluscan fisheries and culture in the Netherlands, in: MacKenzie Jr., C.L. *et al.* (Ed.) (1997). The history, present condition and

- future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe
Volume 3, Europe. *NOAA Technical Report NMFS*, 129: 115-135.
- Erse EB; Bernardes MA (2008) Levantamento de estoques da ostra *Crassostrea*
sp. em bancos naturais no litoral paranaense. *Biotemas*, 21, 57-63.
- Grizel, H and Héral, M (1991) Introduction into France of the Japanese oyster
(*Crassostrea gigas*). *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 47: 399-403.
- Henegariu O; Heerema NA; Dlouhy SR; Vance GH; Vogt PH (1997) Multiplex
PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Biotechniques*,
23,504-511.
- IBAMA (1998) Portaria 145 de 29 de outubro de 1998. Available at
www.cprh.pe.gov.br/downloads/Portaria-145-29-10-1988.doc (acessado em
Nov 29, 2010).
- Ignacio BL; Absher TM; Lazoski C; Solé-Cava AM (2000) Genetic evidence of
the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the
coast of Brazil. *Marine Biology*, 136, 987-991. doi:
10.1007/s002270000252
- Kotta J; Kotta I; Simm M; Lankov A; Lauringson V; Pollumae A; Ojaveer H
(2006) Ecological Consequences of biological invasions: three invertebrate
case studies in the north-eastern Baltic Sea. *Helgol.Mar.Res.*, 60, 106-112.
doi: 10.1007/s10152-006-0027-6
- Lapégue S; Boutet I; Leitão A; Heurtebise S; Garcia P; Thiriou-Quévieux C;
Boudry P (2002) Trans-Atlantic Distribution of a Mangrove Oyster Species
Revealed by 16S mtDNA and Karyological Analyses. *Bio. Bull.*, 202, 232-
242.
- Maccacchero, GB; Ferreira, JF; Guzenski, J (2007) Influence of stocking density
and culture management on growth and mortality of the mangrove native
oyster *Crassostrea* sp. in southern Brazil. *Biotemas*, 20 (3): 47-53.
- Manzoni, GC & Schmitt, JF (2006) Cultivo de ostras japonesas *Crassostrea*
gigas (Mollusca: Bivalvia), na Armação do Itapocoroy, Penha, SC., 245-
252p. ([http://www.avesmarinhas.com.br/bases%20ecologicas-
cap%C3%ADtulo%2017.pdf](http://www.avesmarinhas.com.br/bases%20ecologicas-cap%C3%ADtulo%2017.pdf))

- Mizerkowski, BD (2007) Modelo Comparativo do Estado Trófico Estuarino: Babitonga, Guratuba, Laranjeiras e Cananéia. Msc. Tese, Departamento de Ciências da Terra, UFPR, Paraná.
- Melo, AGC (2008) Estudos genético-populacionais em *Crassostrea gasar* de cinco estados da costa brasileira baseados em sequencias do gene mtDNA COI. MSc. Tese, Departamento de Biologia Ambiental, UFPA, Bragança. (http://www.iieb.org.br/enviados/publicador_pdf/trab_Dissert_Aline_Grasie_lle.pdf)
- Melo CMR; Silva FC; Gomes C; Solé-Cava AM; Lazoski C (2010a) *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in Southern Brazil. *Biol. Invasions*, 12,441-449. doi: 10.1007/s10530-009-9475-7
- Melo, AGC; Varela, ES; Beasley, CR; Schneider, H *et al.* (2010b) Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). *Genetics and Molecular Biology*, 33 (3), 564-572.
- Morgan TS and Rogers AD (2001) Specificity and sensitivity of microsatellite markers for identification of larvae. *Marine Biology*, 139, 967-973. doi:10.1007/s002270100589
- Oliveira, BL (2005) Impacto da Mitilicultura no desenvolvimento das comunidades tradicionais ao entorno das Praias da Cerca e Guaibura, Guarapari, ES. Monografia, Departamento de Oceanografia, UFES, Vitória. (http://www.fucape.br/admin/upload/prod_cientifica/prod_mono06.pdf)
- Patil JG; Gunasekera RM; Deagle BE; Bax NJ (2005) Specific Detection of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae in Plankton Samples Using Nested Polymerase Chain Reaction. *Mar. Biotechnol.* 7, 11-20.
- Pereira, OM; Henriques, MB; Machado, IC (2003) 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. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 29 (1): 19-28.
- Pie MR; Ribeiro RO; Boeger WA; Ostrensky A; Falleiros RM; Angelo L (2006a) 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. *Aquacult. Res.*, 37,1598–1600. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01591.x
- Poli, CR and Littlepage, J (1998) Desenvolvimento do Cultivo de Moluscos no Estado de Santa Catarina. In: AQUICULTURA BRASIL 1998, 1 Recife, 1998. Anais, 163-182. (http://www.lmm.ufsc.br/data/files/cultivo_em_sc.pdf)
- Santos, RR; Machado, I e Nordi, N (2009) Etnoconhecimento dos extrativistas da ostra de mangue (*Crassostrea sp.*) em Cananéia (São Paulo, Brasil). In: CONGRESSO DE MEIO AMBIENTE DA AUGM, 6, 2009, São Carlos. Anais...São Carlos: UFSCar, 2009.(<http://www.ambiente-augm.ufscar.br/uploads/A3-096.pdf>).
- Siqueira, KLF (2008) Avaliação do sistema de cultivo de ostra do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) no estuário do rio Vaza-Barris (Sergipe). MSc.Tese, Departamento de Saúde e Ambiente, UNIT, Aracajú. (http://www.unit.br/mestrado/saudeambiente/D_defendidas/KarynneLemos.pdf)
- Smith PJ; Ozaki H; Fujio Y (1986) No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.*, 20, 569- 574. doi: 10.1080/00288330.1986.9516177
- Spencer BE (1990) Cultivation of Pacific Oysters. MAFF Direct. *Fish.Res.*, *Lowestoft*, 63, 47 pp.
- Toro JE (1998) Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic samples. *J.Shellfish Res.*, 17, 1203-1205.
- Varela ES; Beasley CR; Scheneider H; Sampaio I; Marques-Silva NS; Tagliario CH (2007) Molecular Phylogeny of Mangrove Oysters (*Crassostrea*) From Brazil. *J.Molluscan Stud.*, 73, 229-234. doi: 10.1093/mollus/eym018.
- Wang , Y and Guo, X (2007) Depelopment and Characterization of EST-SSR Markers in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology* 9, (4): 500-511. doi: 10.1007/s10126-007-9011-7.

Yu H and Li Q (2007) EST-SSR markers from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*, 7, 860-862. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01729.x

CAPÍTULO I

FERRAMENTA MOLECULAR DE PROSPECÇÃO RÁPIDA E
SENSÍVEL PARA ESPÉCIES NATIVAS DE *Crassostrea* spp.

RESUMO

Quando se trata de consumo de ostras, o gênero mais economicamente interessante é *Crassostrea*, sendo *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea brasiliana* as espécies nativas mais representativas no Brasil, e devido às consequências causadas pela introdução de espécies não-nativas, a exemplo de *C. gigas*, foi proibida sua introdução. Como há dificuldades de produção das larvas e sementes de ostras nativas em laboratório, os cultivadores precisam de técnicas que os auxiliem na produção para alcançarem maior sucesso nesse cultivo. Assim, este trabalho desenvolveu um programa de PCR Multiplex específico que utiliza primers universais que avaliam a integridade da amostra, juntamente com um par de primers específicos para cada espécie-alvo de ostra. Os primers específicos foram desenvolvidos com base nas diferenças nucleotídicas do DNA de cada espécie, resultando em uma amplificação de fragmentos exclusivos para cada uma delas. O protocolo foi avaliado quanto sua sensibilidade e especificidade, e foi detectado o DNA de *C. rhizophorae* mesmo quando em concentrações baixas como 0.002 ng/ μ L, e muito baixas como 0.0002 ng/ μ L para *C. brasiliana*. Além disso, a PCR Multiplex desenvolvida foi eficiente em detectar e identificar a presença de DNA equivalente a uma única larva de cada espécie, separadas ou combinadas, quando misturados com o extrato total de DNA de uma amostra de plâncton, representando 1000 L de água filtrada. Quando este resultado foi analisado pelo software Gel-Pro, a intensidade das bandas amplificadas comprovou a sensibilidade da PCR Multiplex para detectar e identificar a presença de ambas às espécies-alvo de *Crassostrea*. Baseando-se nesses resultados, os marcadores moleculares específicos para as duas espécies-alvo deste trabalho, são específicos e altamente sensíveis, sendo possível aplicá-los para identificação das espécies, simultaneamente.

Palavras-chave: primers específicos, PCR Multiplex, ostras, plâncton.

ABSTRACT

When it comes to consumption of oysters, the most economic interesting genus is *Crassostrea*, being *Crassostrea rhizophorae* and *Crassostrea brasiliiana* the most representative native species of Brazil. Due to the consequences caused by the introduction of non-native species such as *C. gigas*, the introduction was prohibited in Brazil. Thus, due to difficulties of production of larvae and seeds of oysters in the laboratories, cultivators need technical that help them to achieve greater productions in the cultivation of oysters. This study developed a specific Multiplex PCR protocol, using one pair of universal primers that assess the integrity of the sample and, together with a pair of specific primers for each target-species of oysters. The specific primers were developed based on nucleotide differences in sequences of the DNA of each species, resulting in an amplification of specific fragments in plankton samples of oysters. The protocol was evaluated for its sensitivity and specificity, and detected the presence of the DNA of *C. rhizophorae* when in concentrations as low as 0.002 ng/ μ L, and as low as 0.0002 ng/ μ L, in the case of *C. brasiliiana*. Further, the Multiplex PCR is efficient to successfully detect the presence of the DNA-equivalent of a single larva of each species, either separated or combined, when mixed with total DNA extract of a plankton sample representing 1000 L of filtered water. When these results were analyzed by Gel-Pro software, the intensity of amplified bands proved the sensitivity of Multiplex PCR to detect and identify the presence of both target species of *Crassostrea*. Based on these results, the specific molecular markers developed for the two target species of this study, are specific and highly sensible, being possible applied them to species identification, simultaneously.

Keywords: specific primers, Multiplex PCR, oysters, plankton.

INTRODUÇÃO

O cultivo de ostras representa uma das formas mais antigas de extração marinha, datando desde o início da civilização humana (Alves 2004). Para tanto, o desenvolvimento de técnicas modernas de cultivo de ostras tem aumentado a produção, que supre as demandas de um mercado crescente (Spencer 1990). Junto com as vantagens econômicas óbvias, o cultivo de ostras tem uma importante influência socioeconômica nas regiões pobres do litoral, representando uma fonte adicional de renda para as comunidades tradicionais que estão enfrentando a perda de sua habitual fonte de renda, devido ao colapso de muitas pescarias, em todo o mundo (Erse and Bernardes 2008).

Entre as espécies de ostras, *Crassostrea* spp. é o grupo mais atraente para a aquicultura, uma vez que possui muitos parâmetros zootécnicos desejáveis como uma relação carne/concha elevada e taxa de crescimento rápido (Alves 2004). Entre essas espécies, a mais cultivada no mundo é *Crassostrea gigas* (Thunberg 1793), a ostra do Pacífico. Esta espécie foi intencionalmente introduzida em vários continentes com a finalidade de ser utilizada para cultivo (Yu and Li 2007). De acordo com Dijkema (1997), *C. gigas* não seria capaz de se reproduzir em regiões onde fosse introduzida, mas foi detectada em vários países e também em bancos naturais no litoral do estado de Santa Catarina, Brasil (Melo *et al.* 2010). Como uma espécie invasora, *C. gigas* é frequentemente reconhecida por causar sérios problemas ambientais, como o deslocamento de espécies nativas (Patil *et al.* 2005; Krassoi *et al.* 2008), desestruturamento das comunidades e introdução de parasitas e epibiontes (Gallo-Garcia *et al.* 2004; FAO 2006). Para evitar novas introduções, a translocação de juvenis e adultos de *C. gigas* é atualmente controlada por leis estaduais e federais no Brasil (IBAMA 1998) e outros países, o que propiciou o enfoque nos cultivos das espécies de ostras nativas.

Na costa Atlântica Ocidental, duas espécies nativas de *Crassostrea* são conhecidas, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck 1819) (Pie *et al.* 2006a, Ignacio *et al.* 2000). Pelo menos no sul do

Brasil, o cultivo de *C. rhizophorae* é economicamente prejudicado por sua baixa taxa de crescimento e pequeno tamanho das conchas (Absher 1989). Por outro lado, dados empíricos têm provado que *C. brasiliiana* tem melhor desempenho para o cultivo. Haja vista, onde as leis controlam a introdução de *C. gigas*, *C. brasiliiana* é aparentemente a melhor alternativa para aquicultura.

A produção de larvas e sementes de *C. brasiliiana* em laboratório parece ser um dos gargalos para o cultivo da espécie no Brasil. A tecnologia de maturação e criação não é bem desenvolvida e laboratórios especializados são escassos (Poli and Littlepage 1998). Contudo, as alternativas usadas pelos aquicultores para obter as sementes são coletar juvenis na natureza ou usar os coletores de sementes. A primeira alternativa normalmente resulta em impacto ambiental significativo para o leito natural e a segunda é dificilmente usada no Brasil, pela falta de estudos sobre o ciclo reprodutivo biológico e assentamento das espécies nativas. Quando os cultivadores usam os coletores de sementes, eles são obrigados a selecionar periodicamente as ostras que apresentam taxas de crescimento lento, quase sempre esses exemplares pertencem à espécie *C. rhizophorae*.

A morfologia das larvas e sementes é altamente conservada o que dificulta a identificação das espécies em estudos ecológicos e exige muitas tentativas de determinar o período adequado de fixação dos coletores no ambiente para aquicultura. A diferenciação morfológica das formas larvais das espécies de *Crassostrea*, requer o uso de microscopia eletrônica de varredura (Christo *et al.* 2010), a qual obviamente não é útil para fornecer uma prospecção e identificação rápida e precisa nos estudos acima. Com isso, estudos prévios sobre o ciclo de vida das espécies de *Crassostrea* agrupam dados de diferentes espécies locais (talvez mesmo espécies de outros gêneros de bivalves) em uma única análise e, portanto, são pouco interessantes para efeito prático.

Devido às dificuldades inerentes a estes estudos, protocolos moleculares estão sendo desenvolvidos para permitir a detecção e identificação simultânea de uma ou mais espécies de interesse em diferentes tipos de amostras, incluindo

amostras de plâncton (Morgan and Rogers 2001; Anil *et al.* 2002; Kotta *et al.* 2006, Pie *et al.* 2006b). Felizmente, protocolos moleculares estão sendo desenvolvidos permitindo a detecção e identificação simultânea de uma ou mais espécies de interesse em diferentes tipos de amostras, incluindo amostras de plâncton (Morgan & Rogers 2001, Anil *et al.* 2002, Kotta *et al.* 2006, Pie *et al.* 2006a). Além disso, a identificação de espécies de *Crassostrea* adultas através de marcadores moleculares tem se tornado um procedimento comum (Wang and Guo 2007, Pie *et al.* 2006b, Patil *et al.* 2005). Entretanto, atualmente existe a limitação básica em implementar esses métodos, pois além da grande quantidade de trabalho envolvido, ainda requer pessoal especializado combinando com altos custos para aplicação em estudos de monitoramento. Uma metodologia semelhante foi desenvolvida por Pie *et al.*(2006b), para triagem de larvas do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857) em amostras de zooplâncton, este método tem se mostrado de grande eficiência em várias ocasiões, como para o monitoramento contínuo em rios e lagos no estado do Paraná, Brasil (Boeger *et al.* 2007, Darrigran *et al.* 2009, Tschá *et al.* 2009).

Igualmente, nesse trabalho é descrito um protocolo de PCR Multiplex composto por um conjunto de primers que pode ser utilizado para detectar e identificar *C. brasiliensis* e *C. rhizophorae*, simultaneamente. Este protocolo aplica-se com sucesso em amostras de plâncton na costa sudeste do Brasil, com a finalidade de testar a aplicabilidade do método e utilizá-lo para monitoramento das espécies-alvo de ostras em campo, assim como, para coletar larvas do ambiente natural para o cultivo (ver Capítulo II).

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Coleta e Amostragem

Foram coletados 20 espécimes de ostras adultas providas de manguezais, *Rhizophora mangle* (L.), da Baía de Guaratuba. Uma amostra de tecido foi preservada em solução tampão de DMSO-EDTA. Amostras de

plâncton foram coletadas em três pontos localizados às margens da Baía de Guaratuba, nomeados de acordo com os cultivos destes pontos: Parati, Vicente e Cabaraquara (Tabela I). Filtrou-se 1000L de água marinha de cada ponto utilizando uma rede de captura de zooplâncton com malha de 65µm. Ainda em campo, o produto filtrado foi submergido em álcool 92% em frascos separados e devidamente etiquetados. Finalmente, as amostras foram transportadas ao Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE), para os procedimentos moleculares.

Tabela I. Pontos de Coleta na Baía de Guaratuba – PR, Brasil e o tipo de amostra coletada em cada ponto.

Pontos de Coleta	Tipo de Amostra Coletada	Coordenadas
Cabaraquara	Plâncton e Tecido	S25° 49' 59.8" W048° 34' 41.6"
Vicente	Plâncton e Tecido	S25° 51.1' 54" W048° 36.4' 81"
Parati	Plâncton e Tecido	S25° 48' 02.5" W048° 36' 25.0"

Procedimentos Moleculares

Extração de DNA

Em laboratório, o DNA foi extraído a partir de 1mm³ do músculo adutor de cada exemplar adulto de ostra utilizando o kit de extração EZ-DNA (Biossystems, Brasil) e um Eppendorf Thermomixer®, seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. O extrato total das amostras de plâncton foi obtido após uma nova filtragem com o auxílio de uma bomba a vácuo manual, este procedimento resulta em um acúmulo de organismos em um papel filtro Millipore®. Em seguida as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo de extração mencionado acima.

Desenhando Primers de Alta Especificidade

Para amplificação do fragmento de DNA desejado, foi realizada uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Eppendorf Thermocycler® utilizando, primeiramente, os primers universais 16SAr e 16SBr (Tabela II) e continuando o seguinte programa: 94°C durante 4 min de desnaturação inicial/ 32 ciclos de 94°C durante 20 s de desnaturação posterior, 56°C durante 40 s de anelamento, 72°C durante 1 min de extensão inicial/ 72°C durante 1 min de extensão final. Cada tubo eppendorf® continha 13.6 µL de água ultra-pura, 3 mM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTP, 1 X de Buffer, 2.5 U de AmpliTaq DNA Polimerase (Invitrogen®), 0.4 mM de cada primer e, 2 ng/µL do extrato da amostra, totalizando reações de 25 µL. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1.5%, posteriormente, o gel foi corado em brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta e foto-documentado no equipamento Vilber Lourmat® (Figura 1).

Depois de confirmado a amplificação do fragmento desejado, o produto da PCR foi purificado através do kit Minelute® (Qiagen, Alemanha) conforme orientação do fabricante e, posteriormente, foi submetido à reação de sequenciamento usando as seguintes concentrações finais: 0.16 µM de cada primer, 0.25 X de Buffer, 0.5µL de Big Dye v3 (Applied Biosystems®) e 0.2-0.3 ng/µL de amostra de DNA. O programa do termociclador para sequenciamento incluiu uma desnaturação inicial de 96°C por 1 min, seguido por 35 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5 s e, 60°C por 4 min. Os produtos foram purificados com o kit SephadexTM G-50 médio (GE Healthcare Bio-Sciences AB) e ambas as fitas foram sequenciadas no Sequenciador Automático ABI-3130.

Após sequenciamento, as sequências obtidas foram submetidas à ferramenta BLAST do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), através de um alinhamento de nucleotídeos depositados no banco de dados, para conferir se as sequências obtidas eram provenientes dos animais em questão. As sequências foram editadas através do programa Pregap4 v1.5 pertencente ao Staden Package (Staden 1998)

e alinhadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999) e ClustalX v1.4 (Thompson *et al.* 1997), e ajustadas visualmente.

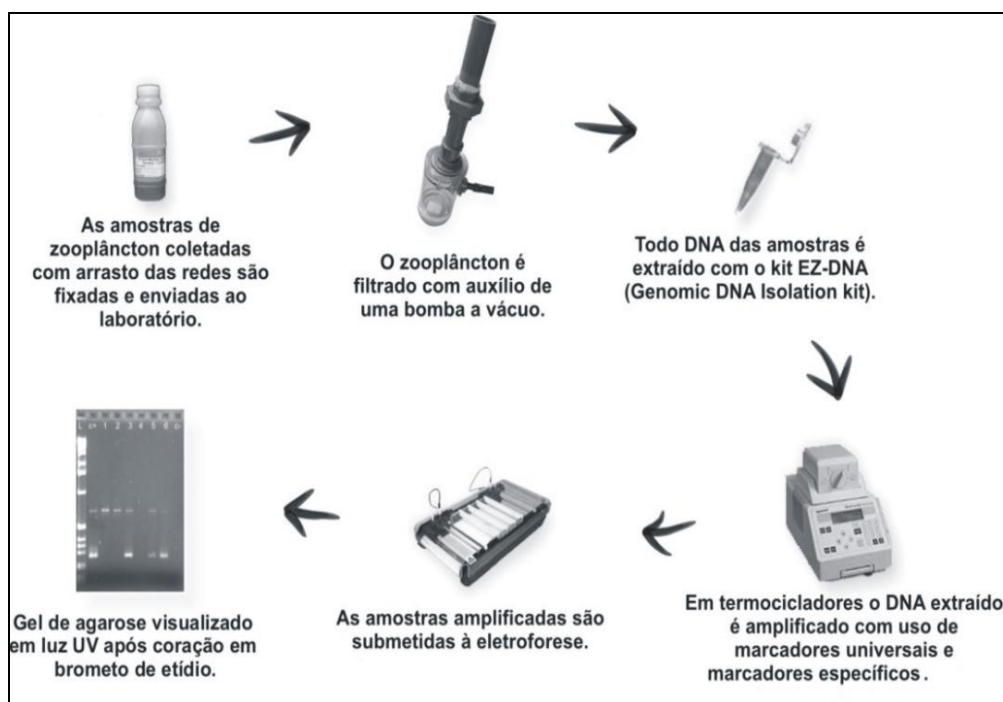


Figura 1. Metodologia resumida dos procedimentos moleculares utilizados em laboratório para o desenvolvimento dos marcadores de detecção e identificação das espécies de *C. brasiliana* e *C. rhizophorae*. Figura modificada de Tschá *et al.* (2009).

Para identificar regiões únicas, propensas para o desenvolvimento dos primers específicos, as sequências de *C. brasiliana* e *C. rhizophorae* foram comparadas com espécies de moluscos relacionados. As seguintes sequências foram obtidas do GenBank: *Crassostrea gigas* (FJ478036.1), *Crassostrea nippona* (Seki 1934, AY510450.1), *Crassostrea rivularis* (Gould 1861, EF122383), *Crassostrea belcheri* (Sowerby II 1871, EU815968.1), *Saccostrea cucullata* (Born 1778, DQ280032.1), *Ostrea edulis* (Linnaeus 1758, AF458911.1) e *Saccostrea glomerata* (Gould 1850, AY160756.1). Todavia, fundamentando-se em regiões não pareadas entre as sequências das espécies-alvo e as sequências dos demais moluscos, foram identificados fragmentos de nucleotídeos capazes de distinguir *C. brasiliana* da *C. rhizophorae* e, também, ambas das demais espécies do alinhamento. Esta etapa foi cautelosamente

realizada para garantir que tais fragmentos não pudessem coincidir no alinhamento de nucleotídeos de nenhuma das demais espécies (ver Anexo I).

Após escolhidos os fragmentos de nucleotídeos de cada espécie-alvo, estes foram submetidos à análise do programa Primer Premier® (Singh *et al.* 1998) para ajustar possíveis comportamentos indesejáveis (por exemplo, hairpin, false-prime e dimer) que podem vir a reduzir a eficiência dos primers. Logo, foi desenhado um par de primers (senso 5' e antissenso 3') específicos para *C. brasiliiana* e outro para *C. rhizophorae*, que amplificam somente o fragmento 16S do DNA mitocondrial de cada espécie (Tabela II). As sequências representativas de cada espécie-alvo foram depositadas no banco de dados do GenBank com os seguintes números HQ652329-HQ652331.

Programa de PCR Específico

Com os primers específicos desenhados, criou-se um programa de PCR que pudesse fundi-los com o ótimo volume e concentração dos reagentes que compõem a reação. Foi testado em extrato de tecido de cada espécie de ostra o seguinte programa: 94°C durante 4 min de desnaturação inicial/ 32 ciclos de 94.5°C durante 20 s de desnaturação posterior, 57°C durante 44 s de anelamento, 72.5°C durante 15 s de extensão inicial/ 72°C durante 1 min de extensão final. Cada tubo eppendorf® continha 17.1 µL de água ultra-pura, 1.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.4 µL de dNTP (25 mM), 2.5 µL de Buffer (10 X), 0.5 µL de AmpliTaq DNA Platinum (Invitrogen®), 0.5 µL de cada primer específico (50 mM) e, 1 µL do extrato da amostra com concentração de DNA a 50 ng/µL, totalizando reações de 25 µL.

Para controlar possível contaminação durante o preparo da PCR, adicionou-se um controle negativo contendo todos os reagentes da reação, com exceção do material biológico, assim, se surgir algum resultado no controle negativo significa que a reação foi comprometida.

Então, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1.5%, corado em brometo de etídio, foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado (Figura 2).

Programa de PCR Multiplex

A Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex é uma variante da PCR padrão, na qual são amplificados dois ou mais loci simultaneamente na mesma reação (Henegariu *et al.* 1997). A presença das espécies-alvo se identificará através da comparação dos tamanhos dos fragmentos resultantes da PCR Multiplex (peso molecular e número) com o padrão pré-definido experimentalmente com organismos adultos – controle positivo.

A PCR Multiplex se desenvolveu utilizando um par de primers universais do DNAr 18S (7F e 1100R; Tabela II) como controle positivo de qualidade e presença de DNA na amostra, ou seja, avaliando o grau de integridade da mesma. Junto aos primers universais, foram adicionados os pares de primers específicos de cada ostra. Desse modo, a eletroforese de uma amostra que não contém DNA de qualquer uma das *Crassostrea* spp, apresenta como resultado apenas o fragmento de 18S amplificado. Na ausência de todos os fragmentos, tanto das espécies das ostras como do 18S, é interpretado como falso negativo e que naquela amostra o DNA está degradado.

Testou-se o protocolo utilizando um extrato de tecido adulto de cada espécie-alvo, com seguinte programa de PCR Multiplex: 94°C durante 4 min de desnaturação inicial/ 32 ciclos de 94°C durante 20 s de desnaturação posterior, 55°C durante 44 s de anelamento, 72°C durante 30 s de extensão inicial/ 72°C durante 1 min de extensão final. Cada tubo eppendorf® continha 15.9 µL de água ultra-pura, 1.5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0.4 µL de dNTP (25 mM), 2.5 µL de Buffer (10 X), 0.5 µL de AmpliTaq DNA Platinum (Invitrogen®), 0.5 µL de cada primer específico (50 mM), 0.1 µL de cada primer universal (50 mM) e, 2 µL do extrato da amostra com concentração de DNA a 50 ng/µL, totalizando reações de 25 µL. Então, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel

de agarose a 1.5%, corado em brometo de etídio, visualizado em luz ultravioleta e foto-documentado.

A fim de otimizar a reação e diminuir custos, os volumes e as concentrações dos reagentes foram ajustadas. Com o auxílio de um gradiente Eppendorf Mastercycler® foi possível maximizar a sensibilidade e especificidade ao tentar alcançar densidade semelhante das bandas de eletroforese para a mesma concentração e amostra.

Testes de Especificidade e Sensibilidade

Para revalidar a especificidade os produtos da PCR utilizando os primers específicos desenvolvidos, de *C. brasiliensis* e *C. rhizophorae*, que identificam-se neste estudo, foram purificados através do kit Montage® PCR Cleanup (Millipore) conforme orientação do fabricante. Posteriormente, foi submetido à reação de sequenciamento utilizando os mesmos primers juntamente com Big Dye v3 (Applied Biosystems®) para que identifique através da fluorescência os nucleotídeos a serem “lidos”. Seus produtos foram purificados com Sephadex™ G-50 medium (GE Healthcare Bio-Sciences AB) e sequenciados em um Sequenciador Automático ABI-3130.

As sequências obtidas foram submetidas à ferramenta BLAST do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) através de um alinhamento de nucleotídeos depositados no banco de dados, para conferir que as sequências resultantes da amplificação com os primers específicos eram provenientes das espécies em questão.

Para testar a sensibilidade do método desenvolvido, amostras de DNA extraídas de tecido adulto das ostras, com concentração final de 2 ng/μL, foram submetidas a diluições de 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 (Figura 2). Pois o excesso de DNA pode vir a inibir sua própria amplificação, por conseguinte, a amostra diluída pode tornar-se mais evidente em comparação com as amostras originais. Além disso, este teste possibilita descobrirmos se o método

desenvolvido é capaz de detectar até mesmo, a menor concentração de DNA de uma larva em porções muito diluídas de amostras de plâncton.

A fim de obter melhor visualização dos resultados, a imagem alcançada do gel foi submetida à análise do software Gel-Pro Analyzer v4.0 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD) para melhorar a resolução e a precisão dos fragmentos amplificados (Figura 2).

Utilizou-se um teste combinado para avaliar a especificidade e a sensibilidade dos marcadores. Uma quantidade equivalente a concentração de DNA de uma larva de bivalve (28,5 ng de acordo com Pie *et al.* 2006b), foi adicionado ao extrato completo de uma amostra de plâncton - considerado negativo para presença das larvas de ambas espécies de *Crassostrea*. Os tratamentos foram projetados para simular a ausência e a presença de uma única larva, bem como a presença simultânea de uma larva de cada espécie-alvo. Os tratamentos foram: 1°) adicionou-se a uma fração da amostra de plâncton o DNA correspondente a *C. brasiliiana*; 2°) adicionou-se a uma fração da amostra de plâncton o DNA correspondente a *C. rhizophorae*; 3°) adicionou-se uma fração da amostra de plâncton o DNA correspondente de cada uma das espécies-alvo e; 5°) continha apenas uma fração da amostra de plâncton (Figura 3).

Para todos os testes, adicionou-se um controle. Em seguida, foram submetidos à reação da PCR Multiplex, eletroforese em gel de agarose a 1.5%, corado em brometo de etídio, visualizados em luz ultravioleta e foto-documentados.

RESULTADOS

Um par de primers específicos foi desenhado para amplificar somente o fragmento de 16S do DNA mitocondrial de *C. brasiliiana* e outro par para *C. rhizophorae* (Tabela II). A reação de PCR Multiplex foi otimizada com o seguinte protocolo: 94°C por 4min de desnaturação inicial seguido por 32 ciclos de 94°C por 20 s de desnaturação posterior, 59°C por 44 s de anelamento, 72°C

por 15 s de extensão inicial e, 72°C por 1 min de extensão final em 10 µL de reação com 1 U de TaqPlatinum (Invitrogen®), 1 X de Buffer, 3 mM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTPs, 2 µM de cada primer específico de *C. rhizophorae* e 1.2 µM de cada primer específico de *C. brasiliiana*, 0.1 µM de cada primer universal 7F e 1100R, 2 ng/µL de extrato de amostra de DNA e, água ultra-pura para completar o volume total.

Tabela II. Lista de primers utilizados nos protocolos da PCR.

Primers	Seqüências (5' - 3')	Genes	Tipos de Primer	Tamanho do fragmento
Ar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	16S DNAm ¹	Universal	± 650pb
Br	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT			
Crhiz_F	GCCCAGTGCGATATTAAGTC	16S DNAm	Específico	±450pb
Crhiz_R	CGAACAGACCTACTCACT			
Cbras_F	CACTGTCTCTTAGTTCTATG	16S DNAm	Específico	±370pb
Cbras_R	AAGCCCTTTAGTTAATACGAG			
7F	GCCCTATCAACTTACGATGGTA	18S DNAr ²	Universal	± 800pb
1100R	GATCGTCTTCGAACCTCTG			

¹ DNA mitocondrial; ² DNA ribossômico; Crhiz_F: primer forward de *Crassostrea rhizophorae*; Crhiz_R: primer reverse de *Crassostrea rhizophorae*; Cbras_F: primer forward de *Crassostrea brasiliiana*; Cbras_R: primer reverse de *Crassostrea brasiliiana*.

O resultado obtido das diluições de amostras de plâncton confirmou a sensibilidade do método que detecta e identifica ambas espécies-alvo de ostras, simultaneamente, mesmo em amostras muito diluídas. Fazendo uso do protocolo da PCR Multiplex, detectou-se a presença de *C. rhizophorae* em concentrações baixas de 0.002 ng/µL, e para *C. brasiliiana* foi detectada sua presença em concentrações ainda mais baixas, de 0.0002 ng/µL. Quando este resultado foi analisado pelo software Gel-Pro, a intensidade das bandas amplificadas

comprovou a sensibilidade da PCR Multiplex para detectar e identificar a presença de ambas espécies-alvo de *Crassostrea* (Figura 2).

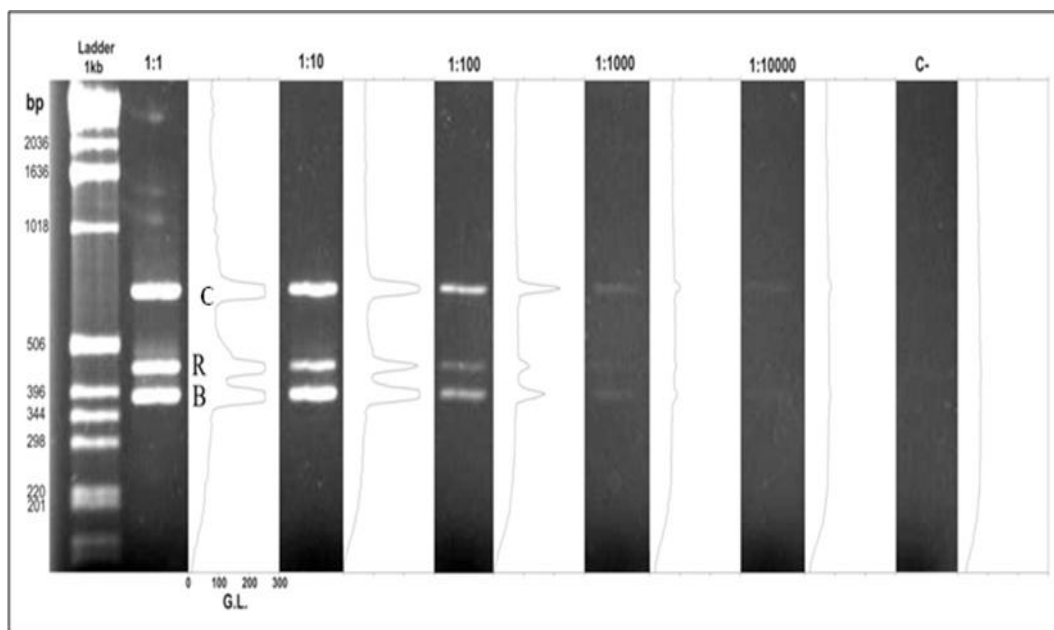


Figura 2. Testes de sensibilidade aplicados aos marcadores moleculares específicos de (B) *C. brasiliiana* e (R) *C. rhizophorae* e, marcadores moleculares de (C) controle, em diferentes diluições de amostras de plâncton - da esquerda para a direita a concentração de DNA diminui, (1:1) 2 ng/ μ L, (1:10) 0.2 ng/ μ L, (1:100) 0.02 ng/ μ L, (1:1000) 0.002 ng/ μ L, (1:10000) 0.0002 ng/ μ L, (C-) Controle Negativo – e o resultado da análise do software Gel-Pro Analyzer, mostrando a sensibilidade e intensidade dos picos, de 0 a 300, produzidos por densidade óptica.

A sensibilidade e especificidade dos primers propostos para as espécies-alvo também foram demonstrados através do teste usando amostras de extrato de plâncton misturado com o volume de DNA equivalente a uma única larva (Figura 3). Independentemente da combinação de cada tratamento, o método pode detectar com sucesso o DNA alvo de uma única larva, apesar da eventual concorrência pelo DNA não específico de outros organismos, pela filtragem de 1000L de água. O resultado indica que os marcadores moleculares são capazes de detectar e identificar até mesmo, a menor quantidade de DNA de uma pequena larva em porções muito diluídas de água do mar.

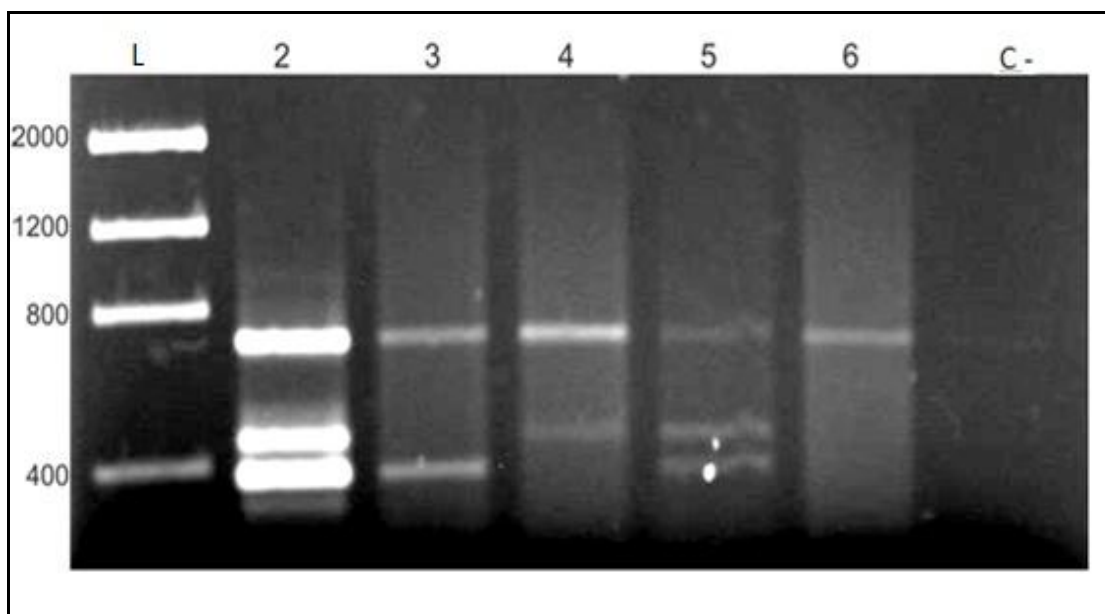


Figura 3. Teste de sensibilidade aplicado para detectar a concentração de DNA estimado de uma larva em plâncton – (L) Ladder lower, (2) Controle positivo composto por amostra de tecido adulto de cada uma das espécies de ostras, (3) Amostra de plâncton e de *C. brasiliana*, (4) Amostra de plâncton e de *C. rhizophorae*, (5) Amostra de plâncton e ambas as espécies de ostras, (6) Somente amostra de plâncton e, (C-) Controle Negativo.

DISCUSSÃO

Os marcadores moleculares desenvolvidos neste estudo mostram que é possível detectar e identificar a presença de *C. brasiliana* e *C. rhizophorae* simultaneamente, comparando o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados.

Outras técnicas moleculares como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) desenvolvidas anteriormente para detecção de *Crassostrea* e de larvas de outros bivalves, são limitadas quando aplicadas em campo. Por exemplo, Klinbunga *et al.* (2000) desenvolveram marcadores de RAPD específicos para *Crassostrea belcheri* (Sowerby 1871) tendo como objetivo auxiliar na identificação e seleção de sementes e adultos, afim de aprimorar o cultivo dessa espécie de ostra na Tailândia. Todavia, para a aplicação dessa técnica é exigido que a qualidade da

integridade do DNA da amostra seja alta para que os resultados sejam consistentes e confiáveis quando aplicado em campo, uma vez que, é possível que ocorra muitos resultados falso-negativos. Já, Wang *et al.* (2006) desenvolveram uma técnica molecular de identificação de larvas de bivalves a partir de marcadores de RFLP em amostras de plâncton. Essa técnica requer combinações de mais de uma enzima por reação, dificultando a detecção simultânea de várias espécies, além disso, quando os fragmentos amplificados possuem pouca diferença de tamanho a identificação precisa da espécie fica comprometida.

Os testes aplicados aos marcadores moleculares suportam a eficiência do protocolo de PCR Multiplex para detectar baixas concentrações de DNA das espécies-alvo. Aliás, em amostras de plâncton total, é possível detectar pelo menos uma larva em 1000L de água filtrada. Para prover uma confirmação contínua do protocolo é possível sequenciar as bandas específicas da reação de Multiplex em frequências regulares para que assim seja possível aplicá-lo para estudos em curso e avaliações.

O protocolo desenvolvido neste trabalho pode ter diversas outras aplicações como: 1) monitorar o ciclo reprodutivo de *C. rhizophorae* e *C. brasiliana*; 2) contribuir para o desenvolvimento de estratégias de coleta de larvas e sementes para cultivo em ambiente natural; 3) prever o tempo de assentamento de cada espécie individualmente, assegurando aos cultivadores a especificidade das sementes coletadas e; 4) complementar a identificação morfológica das espécies facilitando a seleção do ponto de cultivo e maximizando o sucesso em obter larvas de *C. brasiliana* pelos cultivadores.

Infelizmente, o método apresentado não é capaz de quantificar a densidade de larvas em amostras de plâncton. Entretanto, o protocolo pode ser facilmente adaptado para permitir a inferência do número de espécies de cada espécie-alvo a partir da calibração com o equipamento Real Time PCR, como foi desenvolvido por Vadopalas *et al.* (2006) para larvas de abalone *Haliotis* spp. (Linnaeus 1758) e por Endo *et al.* (2009) para *L. fortunei*.

REFERÊNCIAS

- Absher, TM (1989) Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. Ph.D. Thesis, Instituto de Oceanografia, USP, São Paulo.
- Alves, R (2004) Estudo taxonômico de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897, da região da Grande Florianópolis. MSc. Tese, Departamento de Aquicultura, UFSC, Santa Catarina.
- Anil, AC; Venka TK; Sawant SS; Dileepkumar M; Dhargalkar VK; Ramaiah N; Harkantra SN; Ansari ZA (2002) *Marine Bioinvasion: Concern for ecology and shipping. Current Science*, 83,214-218.
- Boeger, WA; Pie MR; Falleiros RM; Darrigran G; Mansur MCD; Belz CE (2007) Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. *J.Plankton Res.*, 29, 1015-1019.
- Christo, SW; Absher TM; Boehs G (2010) Morphology of the larval shell of three oyster species of the genus *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia: Ostreidae). *Braz. J. Biol.* 70 (3): 645-650. doi: 10.1590/S1519-69842010000300023.
- Darrigran, G; Boeger W; Bamborenea C and Maroñas M (2009) Evaluation of sampling and analysis techniques for early detection of *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) in limit areas of its distribution. *Braz. J. Biol.*, 69 (3): 979-980. doi: 10.1590/S1519-69842009000400029.
- Dijkema, R. (1997). Molluscan fisheries and culture in the Netherlands, in: MacKenzie Jr., C.L. *et al.* (Ed.) (1997). *The history, present condition and future of the molluscan fisheries of North and Central America and Europe Volume 3, Europe. NOAA Technical Report NMFS*, 129: 115-135.
- Endo, N; Sato K & Nogata Y (2009) Molecular based method for the detection and quantification of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* using real-time PCR. *Plankton Benthos Res.* 4(3): 125–128.

- Erse, EB and Bernardes MA (2008) Levantamento de estoques da ostra *Crassostrea sp.* em bancos naturais no litoral paranaense. *Biotemas*, 21, 57-63.
- FAO (2006) FAO Fisheries and Aquaculture Department [online] Rome. (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Crassostrea_gigas/en)
- Gallo-Garcia, MC; Ulloa-Gómez MG; Godínez-Siordia DE (2004) Evaluation of two treatments in polychaete worm intensity associated with *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1873) oyster valves. *Ciencias Marinas*, 30, 455-464.**
- Hall, TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Henegariu, O; Heerema NA; Dlouhy SR; Vance GH; Vogt PH (1997) Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *Biotechniques*, 23,504-511.
- Ignacio, BL; Absher TM; Lazoski C; Solé-Cava AM (2000) Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology*, 136, 987-991. doi: 10.1007/s002270000252.
- Klinbunga, S; Ampayup P; Tassanakajon A; Jarayabhand P and Yoosukh W (2000) Development of Species-Specific Markers of the Tropical Oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.*, 2: 476-484.
- Kotta, J; Kotta I; Simm M; Lankov A; Lauringson V; Pollumae A; Ojaveer H (2006) Ecological Consequences of biological invasions: three invertebrate case studies in the north-eastern Baltic Sea. *Helgol.Mar.Res.*, 60, 106-112. doi: 10.1007/s10152-006-0027-6
- Krassoi, FR; Brown KR; Bishop MJ; Kelaher BP and Summerhayes, S (2008) Condition-specific competition allows coexistence of competitively superior exotic oysters with native oysters. *J. Anim. Ecol.*, 77: 5–15. doi: 10.1111/j.1365-2656.2007.01316.x

- Melo, CMR; Silva FC; Gomes C; Solé-Cava AM; Lazoski, C (2010) *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in Southern Brazil. *Biol. Invasions*, 12,441-449. doi: 10.1007/s10530-009-9475-7
- Morgan, TS and Rogers AD (2001) Specificity and sensitivity of microsatellite markers for identification of larvae. *Marine Biology*, 139, 967-973. doi:10.1007/s002270100589
- Patil, JG; Gunasekera RM; Deagle BE; Bax NJ (2005) Specific Detection of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae in Plankton Samples Using Nested Polymerase Chain Reaction. *Mar. Biotechnol.* 7, 11-20.
- Pie, MR; Ribeiro RO; Boeger WA; Ostrensky A; Falleiros RM; Angelo L (2006a) 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. *Aquacult. Res.*, 37,1598–1600. doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01591.x
- Pie, MR; Boeger WA; Patella L; Falleiros R (2006b) A Fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *J.Molluscan Stud.*, 72, 218-219. doi:10.1093/mollus/eyi070.
- Poli, CR and Littlepage, J (1998) Desenvolvimento do Cultivo de Moluscos no Estado de Santa Catarina. In: AQUICULTURA BRASIL 1998, 1 Recife, 1998. Anais, 163-182.
- Singh, VK; Mangalam AK; Dwivedi S; Naik S (1998) Primer Premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence. *BioTechniques*, 24, 318-319.
- Spencer, BE (1990) Cultivation of Pacific Oysters. MAFF Direct. *Fish.Res.*, *Lowestoft*, 63, 47 pp.
- Staden, R; Beal KF; Bonfield JK (1998) The Staden Package. *Computer Methods in Molecular Biology*, 132, 115-130.
- Thompson, JD; Gibson TJ; Plewniak F; Jeanmougin F; Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882.

Tschá, MK; Boeger WA; Patella L; Ostrensky A & Pie MR (2009) Aumentando a sensibilidade e a agilidade do monitoramento de *Limnoperna fortunei* utilizando o método molecular, p. 223-228. In: Darrigran G. & C. Damborenea (Ed.). Introdução a Biologia das Invasões. O Mexilhão Dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controle. Cubo Editora, São Carlos.

Vadopalas B; Bouna JV; Jackels CR; Friedman CS (2006) Application of real-time PCR for simultaneous identification and quantification of larval abalone. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 334: 219-228. Dói: 10.1016/j.jembe.2006.02.005.

Wang, S; Bao Z; Zhang L; Li N; Zhan A; Guo,W; Wang X and Hu J (2006) A new strategy for species identification of planktonic larvae: PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA detected by agarose gel electrophoresis or DHPLC. *J. Plankton Res.*,28(4): 375-384. Doi: 10.1093/plankt/fbi122.

Wang, Y and Guo, X (2007) Development and Characterization of EST-SSR Markers in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology* 9, (4): 500-511. doi: 10.1007/s10126-007-9011-7.

Yu, H and Li Q (2007) EST-SSR markers from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*, 7, 860-862. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01729.x

CAPÍTULO II

TESTANDO MARCADORES MOLECULARES DE DUAS ESPÉCIES DE *Crassostrea* spp. EM CAMPO

Resumo

O grupo *Crassostrea* é o mais cultivado no Brasil. Estão presentes duas espécies nativas *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea brasiliiana*, distribuídas ao longo da costa. No litoral do Paraná, as ostras nativas são cultivadas, comercializadas e consumidas, um exemplo é na Baía de Guaratuba, onde se formam bancos naturais de ostras, propiciando o cultivo na região. Por apresentarem muitas semelhanças morfológicas muitas vezes são mal identificadas. Marcadores moleculares específicos foram desenvolvidos com base nas diferenças nucleotídicas do DNA de cada espécie, resultando em uma amplificação de fragmentos exclusivos para cada uma das espécies de ostras. Neste trabalho, é descrito a aplicação dos marcadores moleculares específicos na identificação de larvas, sementes e adultos de *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* na Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil. O programa de PCR Multiplex foi aplicado de Janeiro a Junho de 2010, em 34 amostras de plâncton, para testar a aplicabilidade do método em detectar e identificar a presença de larvas das duas espécies-alvo de ostras. Também aplicou-se em 246 indivíduos (sementes e adultos) no intuito de testar a capacidade de diferenciação das espécies, utilizando somente a ferramenta molecular desenvolvida neste trabalho, em seguida, os produtos se submeteram à eletroforese e fotos-documentados. Das 34 amostras de plâncton coletadas, larvas de ambas espécies foram detectadas em Cabaraquara nos meses em que aplicou-se o programa. Dos 246 indivíduos coletados, aproximadamente 16% foram identificados como *C. brasiliiana*, aproximadamente 24% foram identificados como *C. rhizophorae* e, 32% foram identificados como uma possível *Crassostrea* sp., mas não foi identificada como sendo uma das espécies-alvo; e 28% não foram adequadamente preservados e não puderam prover um resultado preciso. Esses resultados corroboram a eficiência dos marcadores desenvolvidos neste estudo e mostram que é possível aplicar este método para detectar e identificar a presença de larvas de *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana*, simultaneamente, em amostras de plâncton mais rapidamente e, além disso, os marcadores moleculares podem ser utilizados para complementar a identificação das espécies-alvo de ostras.

Palavras-chave: *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea brasiliiana*, marcadores moleculares, monitoramento, Baía de Guaratuba.

Abstract

Crassostrea is the group most cultivated in Brazil, there are present two native species, *Crassostrea brasiliiana* and *Crassostrea rhizophorae* distributed along the coast. On the coast of Paraná, native oysters are cultivated, marketed and consumed, an example is the Bay of Guaratuba, where natural banks of oysters are formed providing the cultivation in the region. By presenting many morphological similarities often are poorly identified. Specific primers were developed based on differences in nucleic acids sequences of each species, resulting in an amplification of specific fragments of each species of oysters. In this paper, we describe the application of specific molecular markers in the identification of larvae, seeds and adult of *C. rhizophorae* and *C. brasiliiana* in Guaratuba Bay, Brazil. Multiplex PCR program was implemented from January to Junho 2010, in 34 plankton samples to test the applicability of markers to detect and identify the presence of larvae of the two target species. Was also applied to 246 individuals (seeds and adults) in order to test the ability of differentiation of species using only molecular tool developed in this study, then the products were submitted to electrophoresis and photo-documented. Of 34 plankton samples collected, larvae of both species were detected in Cabaraquara every month, and of 246 individuals collected, approximately 16% were identified as *C. brasiliiana* and approximately 24% were identified as *C. rhizophorae*, 32% were identified as possible *Crassostrea* sp., but were not identified being either one of the target-species; and 28% were not appropriate preserved. These results confirm the efficiency of the markers developed in this study and show that it is possible to apply this method to detect and identify the presence of larvae of *C. rhizophorae* and *C. brasiliiana* simultaneously in plankton samples, quickly, and furthermore, the molecular markers can be used to complement the identification of target-species of oysters.

Keywords: *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea brasiliiana*, molecular markers, monitoring, Bay of Guaratuba.

INTRODUÇÃO

Duas espécies são consideradas nativas no litoral brasileiro, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck 1819) (Melo *et al.* 2010a). A grande semelhança morfológica entre essas espécies prejudica sua identificação, o que gerou controvérsias sobre sua identidade evolutiva durante um longo período de tempo (Absher 1989, Siqueira 2008).

No litoral do Paraná, essas ostras são cultivadas, comercializadas e consumidas (Christo and Absher 2008). Na Baía de Guaratuba formam-se bancos naturais de ostras em locais de fácil acesso pelos cultivadores, propiciando a coleta desses organismos. Contudo, com a intensa exploração desses bancos os cultivadores têm tido dificuldades de coletar organismos com tamanhos satisfatórios para comercialização (Poli and Littlepage 1998). Frente a esta realidade, as comunidades estão preocupadas com a extração desordenada, pois a sustentabilidade da atividade poderá ser prejudicada (ver Pereira *et al.* 2003).

Segundo Siqueira (2008), estudos com ostras que abordam sua biologia e ecologia tem sido intensificados com a finalidade de desenvolver técnicas mais aprimoradas de cultivo que se adequam a cada região. De acordo com Oliveira (2005), os estudos de cunho científico com ostras são muito importantes, pois as informações geradas podem ajudar o cultivador por meio de “pontes” entre o meio científico e o social.

Para que essa, “ponte”, possa levar informações relevantes sobre o cultivo das ostras nativas, faz-se necessário conhecer sobre sua biologia e ecologia. Estudos sobre o ciclo de vida e dinâmicas de colonização das espécies poderiam fornecer dados, que proporcionariam o desenvolvimento de estratégias mais adequadas de coleta e o manejo das ostras (Erse and Bernardes 2008, Melo *et al.* 2010a). Além disso, os estudos que envolvem o monitoramento, a prospecção e a identificação das espécies podem contribuir para o preenchimento de lacunas existentes entre as informações vividas pelos cultivadores e as informações estudadas pela comunidade científica (Ignacio *et al.* 2000; Oliveira 2005; Christo 2006; Siqueira 2008; Santos *et al.* 2009).

Neste capítulo, é realizado um teste simulando estudos em campo do protocolo de prospecção e identificação das espécies nativas de *Crassostrea* proposto no Capítulo I, na Baía de Guaratuba, litoral do Estado do Paraná, Brasil. Os testes realizados em laboratório simularam a eficiência e possíveis aplicações do protocolo em campo, assim sendo, para ampliar as aplicações e melhorar a eficiência dos marcadores moleculares, é necessário testar em situações reais e como os dados gerados podem ser utilizados para estudos de monitoramento e colonização das espécies nativas de *Crassostrea*.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Coleta e Amostragem

Amostras de ostras adultas, sementes e plâncton foram obtidos da Baía de Guaratuba, Paraná, Brasil (25°51.80'S 48°38. 20'W), de Janeiro a Abril de 2010. As amostras de plâncton (n=34) foram obtidas, quinzenalmente, de três regiões dentro da Baía de Guaratuba (Cabaraquara, Parati e Vicente; Figura 1), filtrando 1000L de água com o auxílio de redes de plâncton (malha de 65 µm). Ainda em campo, o produto filtrado foi submerso em álcool 92% em frascos separados e devidamente etiquetados.

Sementes (n=246) foram obtidas de coletores na região de Cabaraquara da Baía de Guaratuba (Figura 1). Os coletores eram compostos por dois conjuntos de três placas de PVC posicionados em duas profundidades, 30 cm e 1m, respectivamente, e expostos mensalmente. Ainda em campo, foi retirada parte do tecido e preservado em solução tampão de DMSO-EDTA. As sementes foram coletadas para identificar as espécies e detectar se há assentamento diferenciado entre as espécies-alvo (Tabela II).

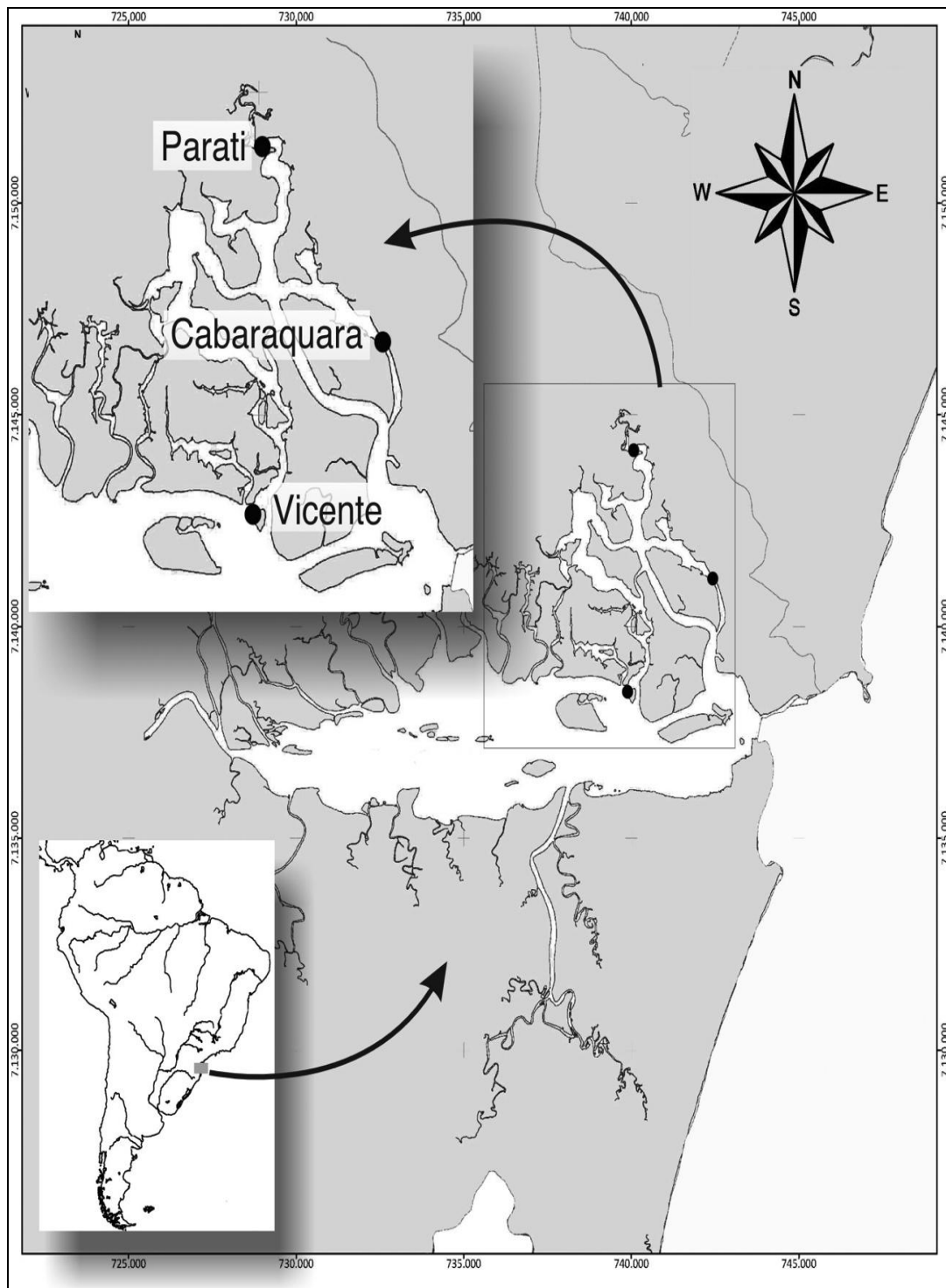


Figura 1. Localização da Baía de Guaratuba (Brasil) e a identificação dos pontos de coleta para as amostras de plâncton e sementes das espécies nativas de *Crassostrea*. Coordenadas geográficas estão em UTM.

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE) para procedimentos moleculares posteriores.

Procedimentos Moleculares

Extração de DNA

Em laboratório, se extraiu o DNA dos indivíduos a partir de 1mm³ de cada exemplar utilizando o kit de extração EZ-DNA (Biossystems, Brasil) e um Eppendorf Thermomixer®, seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. O DNA total das amostras de zooplâncton foi obtido após uma nova filtragem com o auxílio de uma bomba a vácuo manual, este procedimento resulta em um acúmulo de organismos em um papel filtro Millipore®, em seguida as amostras foram submetidas ao mesmo protocolo de extração do kit EZ-DNA, mencionado à cima.

Programa de PCR Multiplex Específico

O protocolo de identificação baseado em PCR Multiplex foi aquele descrito no Capítulo I. As condições da reação foram: 94°C por 4min de desnaturação inicial seguido por 32 ciclos de 94°C por 20 s de desnaturação posterior, 59°C por 44 s de anelamento, 72°C por 15 s de extensão inicial e, 72°C por 1 min de extensão final em 10 µL de reação com 1 U de Taq Platinum (Invitrogen®), 1 X de Buffer, 3 mM de MgCl₂, 0.4 mM de dNTPs, 2 µM de cada primer específico de *C. rhizophorae* e 1.2 µM de cada primer específico de *C. brasiliiana*, 0.1 µM de cada primer universal 7F e 1100R, 2 ng/µL de extrato de amostra de DNA e, água ultra-pura para completar o volume total.

Desse modo, uma amostra que não contém DNA de qualquer uma das espécies-alvo, apresenta como resultado apenas o fragmento de 18S amplificado. Na ausência de todos os fragmentos, é interpretado como falso- negativo e que naquela amostra o DNA está degradado.

Teste em Campo

O protocolo molecular de prospecção das espécies nativas de *Crassostrea* foi testado em 34 amostras de plâncton (Tabela II) obtidas de Janeiro a Junho de 2010. Todas as amostras foram submetidas a diluições de 1:10 e 1:100, para

prevenir que a inibição da reação por excesso de DNA resultasse em falsos resultados negativos (Figura 2). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1.5%, corado em brometo de etídio, foi visualizado em luz ultravioleta e foto-documentado. O método também foi utilizado, sem diluições, para identificação de 246 indivíduos obtidos dos coletores, entre Janeiro a Abril de 2010 (Figura 3).

RESULTADOS

Das 34 amostras de plâncton coletadas, larvas de *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* foram detectadas em Cabaraquara todos os meses, utilizando a metodologia proposta. No ponto Parati, foi detectada a presença das larvas das duas espécies em Janeiro, enquanto que somente as larvas de *C. brasiliiana* foram detectadas de Abril a Junho, nenhuma larva foi detectada nas amostras de Fevereiro e Março de 2010. No ponto Vicente (amostragens realizadas após Fevereiro), larvas de ambas as espécies-alvo foram detectadas somente em Abril (Tabela II), nenhuma larva dessas espécies foram detectadas em Fevereiro, Março e Junho de 2010.

Finalmente, dos 246 indivíduos coletados, 38 (aproximadamente 16%) foram identificados como *C. brasiliiana*, 58 (aproximadamente 24%) foram identificadas como *C. rhizophorae*, 82 (aproximadamente 32%) foram identificadas como uma (ou mais) espécie não identificada de *Crassostrea*. Sessenta e oito amostras (aproximadamente 28%) não foram adequadamente conservadas como indica a não-amplificação da banda controle (ver Discussão para mais detalhes).

Tabela I. Primers utilizados para o desenvolvimento dos protocolos de PCR Multiplex, suas seqüências de nucleotídeos e genes, respectivos.

Primers	Seqüências (5' - 3')	Genes	Tipos de Primer
Crhiz_F	GCCCAGTGCATATTAAGTC	16S DNAm ¹	Específico
Crhiz_R	CGAACAGACCTACTCACT		
Cbras_F	CACTGTCTCTTAGTTCTATG	16S DNAm	Específico
Cbras_R	AAGCCCTTTAGTTAATACGAG		
7F	GCCCTATCAACTTACGATGGTA	18S DNAr ²	Universal
1100R	GATCGTCTTCGAACCTCTG		

¹ DNA mitocondrial; ² DNA ribossômico; Crhiz_F: primer forward de *Crassostrea rhizophorae*; Crhiz_R: primer reverse de *Crassostrea rhizophorae*; Cbras_F: primer forward de *Crassostrea brasiliiana*; Cbras_R: primer reverse de *Crassostrea brasiliiana*.

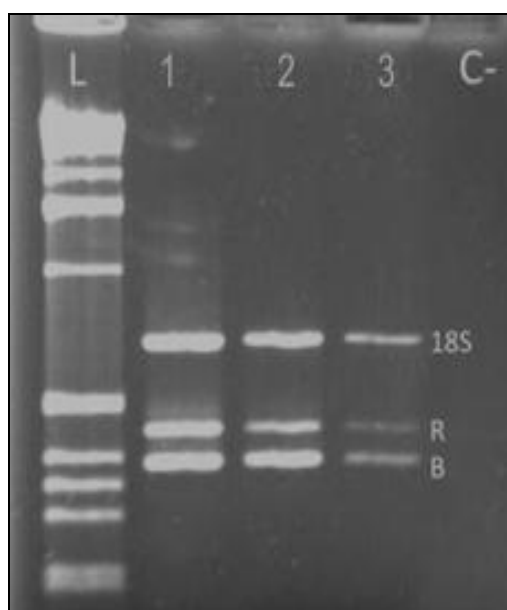


Figura 2. Resultado obtido após submeter uma (1) amostra de plâncton às diluições (2) 1:10 e (3) 1:100, ao PCR Multiplex. (L) Leader 1Kb, (18S) Fragmento obtido pela amplificação dos primers universais, (R) Resultado positivo para presença de *C. rhizophorae*, (B) Resultado positivo para presença de *C. brasiliiana* e, (C-) Controle Negativo.

Tabela II. Pontos coletados e os resultados para as análises mensais das amostras de zooplâncton com o protocolo proposto para detectar e identificar as espécies de *Crassostrea*. (B) Amostra positiva para *C. brasiliana*, (R) Amostra positiva para *C. rhizophorae*, (-) Resultado negativo para ambas as espécies.

Pontos Coletados / Meses	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun
Cabaraquara	B/R	B/R	B/R	B/R	B/R	B/R
Parati	B/R	-	-	B	B	B
Vicente	*	-	-	B/R	-	-

(*) Nenhuma amostra foi obtida no mês de Janeiro.

Ambas as espécies foram detectadas nos coletores removidos mensalmente. Sementes não identificadas também estiveram presentes em todos os meses (Figura 3). *Crassostrea rhizophorae* foi relativamente mais frequente nos meses de Janeiro e Fevereiro, enquanto que *Crassostrea brasiliana* foi mais frequente em Fevereiro e Março e menos frequente em Abril. Os indivíduos de uma ou mais espécies não identificadas de ostra (detectadas pela amplificação da banda controle, mas não amplificação de bandas específicas) foram detectados com maior frequência em Abril. Já as amostras com DNA degradado (identificadas pela ausência de amplificação da banda controle/18S rDNA) foram maiores em Janeiro e Fevereiro, mas estes valores foram reduzidos significativamente nos últimos dois meses seguintes do período de amostragem.

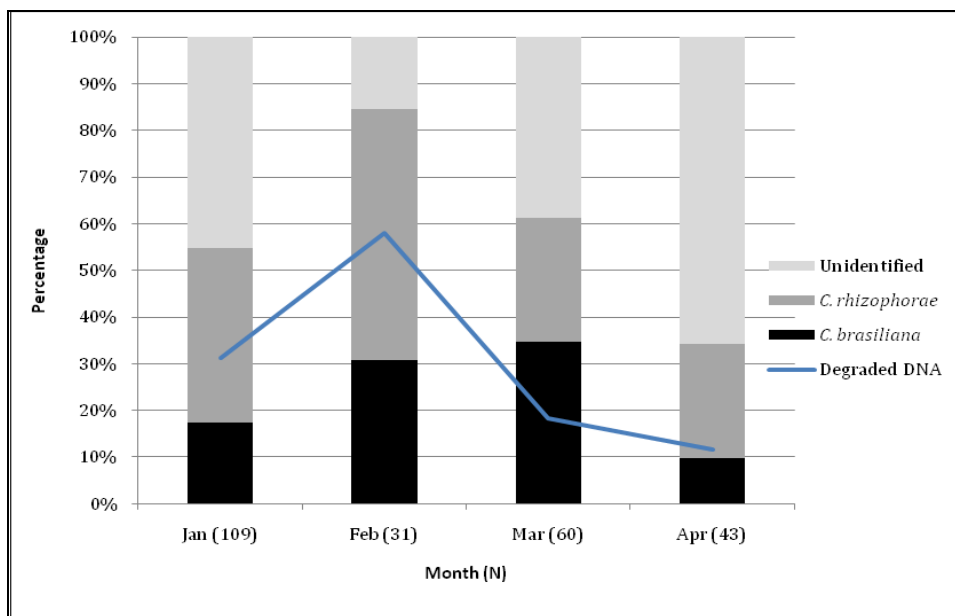


Figura 3. Histograma de porcentagem de *C. rhizophorae* e *C. brasiliana* e uma espécie não identificada de ostra detectada de Janeiro a Abril de 2010 de coletores instalados na região de Cabaraquara (Baía de Guaratuba, Brasil). A linha tracejada do gráfico indica a porcentagem de indivíduos que não puderam ser identificados devido à fixação inadequada e DNA degradado. O número total de espécimes coletados e processado a cada mês se encontra entre parênteses juntamente com o mês.

DISCUSSÃO

Os testes realizados em laboratório e em campo atestam a eficiência do protocolo de PCR Multiplex como uma ferramenta de detecção e identificação de *Crassostrea brasiliana* e *Crassostrea rhizophorae* a partir de amostras obtidas do meio ambiente.

Os testes com amostras de campo demonstraram que o método desenvolvido permite a detecção de larvas em plâncton e rápida identificação dos indivíduos dos coletores.

Os resultados indicaram, também, que a maior dificuldade para identificação das sementes é o processo de fixação dos espécimes com subsequente perda da

integridade do DNA. A equipe de coleta falhou em usar uma proporção pequena de etanol: tecido na fixação das amostras nos meses de Janeiro e Fevereiro, resultando em perda significativa de amostras individuais (Figura 3). O protocolo de fixação foi corrigido, assim nos meses de Março e Abril houve redução correspondente a porcentagem de DNA degradado. A fixação das amostras de plâncton não apresentou problemas no processamento, pois nenhum falso-positivo foi detectado.

Embora o período de amostragem em campo fosse limitado, foram detectadas diferenças espaciais e temporais na ocorrência de larvas das duas espécies-alvo de *Crassostrea*. As flutuações, entre os pontos e entre os meses amostrados, na ocorrência de larvas, sugerem que os fatores ambientais (como, as marés da plataforma continental, os rios que desembocam na Baía de Guaratuba, a temperatura da água, a disponibilidade de alimento, as características físicas e químicas do ambiente estuarino, a disponibilidade de substratos apropriados para fixação e/ou, a combinação de todos esses fatores) podem estar determinando o transporte horizontal das larvas. Segundo Christo (2006), a maior abundância de larvas foi entre os meses de Novembro de 2003 e Março de 2004, sendo que o ponto I (ponto Vicente neste trabalho) que apresentou a maior densidade de larvas no mês de Fevereiro de 2004.

Além disso, a identificação e quantificação dos indivíduos indicam padrões de assentamento flutuantes, distinguindo *C. rhizophorae* de *C. brasiliana* no mesmo ponto (Cabaraquara, ver Figura 1), fornecendo informações importantes sobre as diferenças nos ciclos de vida de ambas as espécies. Uma rápida análise da Figura 3 sugere fortemente que, o pico de assentamento de *C. rhizophorae* ocorre entre Janeiro e Fevereiro e o pico de *C. brasiliana* ocorre durante Fevereiro e Março. Provavelmente o fator de maior influência sobre a densidade de indivíduos coletados foi a temperatura, pois coincide com os períodos de maior temperatura da água e os meses de verão. Christo (2006) detectou que o maior número de indivíduos coletados foi entre os meses de Outubro de 2003 e Março de 2004 com picos sucessivos durante este período, e a variação da

temperatura detectada foi de 25°C em Janeiro, 26°C em Fevereiro, 27°C em Março e uma redução em Abril para 20°C.

Este estudo preliminar detectou também uma flutuação na disponibilidade de sementes de outras espécies de ostras na região (não identificada), isto poderia indicar que essa(s) espécie(s) representa(m) outras espécies nativas de ostras, *Crassostrea* ou não, ou espécies invasoras, como as reportadas de outras regiões do Atlântico sudoeste (ver Melo *et al.* 2010^a, Varela *et al.* 2007). Do mesmo modo, esta informação corrobora a especificidade dos primers desenvolvidos neste trabalho, pois não ocorreu a amplificação do DNA de sementes morfológicamente semelhantes (reação cruzada) de outras espécies.

Se o ciclo de vida das duas espécies nativas não é sincronizado como sugerido pelo teste de campo, o monitoramento das larvas no plâncton pode prever o período de assentamento de cada espécie. Baseando-se nestes dados, os cultivadores poderiam certificar a especificidade na maioria dos indivíduos coletados determinando o período mais adequado para expor os coletores no ambiente. A definição do ponto para instalação dos coletores parece ser outro parâmetro a ser considerado, pois pode propiciar uma coleta seletiva da espécie de ostras de interesse. Somente larvas de *C. brasiliana*, a espécie mais adequada para o cultivo (pelo menos em certas regiões da costa) foi detectada de Abril a Junho em amostras de plâncton. Este método também pode ser usado para complementar a identificação morfológica das sementes e adultos das ostras, facilitando a seleção da espécie cultivada e maximizando o sucesso em selecionar as sementes da espécie desejada pelos cultivadores.

Assim, o protocolo proposto é uma importante ferramenta para o monitoramento contínuo do ciclo de vida de *C. rhizophorae* e *C. brasiliana*, na detecção dos períodos específicos para a liberação de larvas e assentamento para cada espécie.

REFERÊNCIAS

- Absher, TM (1989) Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. Ph.D. Thesis, Instituto de Oceanografia, USP, São Paulo.
- Cristo, SW (2006) Biologia Reprodutiva e Ecologia de Ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná-Brasil): Um Subsídio ao Cultivo. Dr. Tese, Departamento de Zoologia, UFPR, Paraná.
- Cristo, SW and Absher, TM (2008) Crescimento da Prodissoconcha de ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia, Ostreidae). *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 34 (1): 71-77.
- Erse EB and Bernardes MA (2008) Levantamento de estoques da ostra *Crassostrea* sp. em bancos naturais no litoral paranaense. *Biotemas*, 21, 57-63.
- Ignacio BL; Absher TM; Lazoski C; Solé-Cava AM (2000) Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology*, 136, 987-991. Doi: 10.1007/s002270000252
- Melo CMR; Silva FC; Gomes C; Solé-Cava AM; Lazoski C (2010a) *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in Southern Brazil. *Biol. Invasions*, 12,441-449. an: 10.1007/s10530-009-9475-7
- Oliveira, BL (2005) Impacto da Mtilicultura no desenvolvimento das comunidades tradicionais ao entorno das Praias da Cerca e Guaibura, Guarapari, ES. Monografia, Departamento de Oceanografia, UFES, Vitória.
- Pereira, OM; Henriques MB; Machado IC (2003) 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. *B. Inst. Pesca*, São Paulo, 29 (1): 19-28.
- Poli, CR and Littlepage J (1998) Desenvolvimento do Cultivo de Moluscos no Estado de Santa Catarina. In: AQUICULTURA BRASIL 1998, 1 Recife, 1998. Anais, 163-182.

- Santos, RR; Machado I e Nordi N (2009) Etnoconhecimento dos extrativistas da ostra de mangue (*Crassostrea sp.*) em Cananéia (São Paulo, Brasil). In: CONGRESSO DE MEIO AMBIENTE DA AUGM, 6, 2009, São Carlos. Anais...São Carlos: UFSCar, 2009.
- Siqueira, KLF (2008) Avaliação do sistema de cultivo de ostra do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897) no estuário do rio Vaza-Barris (Sergipe). MSc.Tese, Departamento de Saúde e Ambiente, UNIT, Aracajú.
- Varela ES; Beasley CR; Scheneider H; Sampaio I; Marques-Silva NS; Tagliario CH (2007) Molecular Phylogeny of Mangrove Oysters (*Crassostrea*) From Brazil. *J.Molluscan Stud.*, 73, 229-234. an: 10.1093/mollus/eym018.

CAPÍTULO III

DETECTADA ESPÉCIE INVASORA NA BAÍA DE GUARATUBA (PARANÁ, BRASIL) UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES.

Capítulo formatado como Nota para Biological Invasions.

Resumo

Ostras do grupo *Crassostrea* estão distribuídas ao longo da costa do Brasil. Vários estudos têm sido realizados para tentar esclarecer o número de espécies de *Crassostrea* presentes no Brasil, devido à alta variabilidade morfológica das conchas, a identificação das espécies não é uma tarefa fácil. As espécies inicialmente descritas para o Brasil são *Crassostrea rhizophorae* e *Crassostrea brasiliiana*, consideradas espécies nativas; e *Crassostrea gigas* foi introduzida na década de 70. Recentemente, uma quarta espécie foi detectada na região de Bragança no estado do Pará, denominada como *Crassostrea* sp., mas sua introdução continua incerta. A introdução de espécies exóticas é um evento preocupante, pois pode causar grandes impactos econômicos e/ou ecológicos. Este estudo propõe desenvolver e testar uma metodologia de monitoramento da espécie invasora *C. gigas*, baseando-se em marcadores moleculares específicos. Os marcadores específicos foram desenvolvidos com base nas diferenças nucleotídicas do DNA da espécie, resultando em uma amplificação de fragmentos específicos. O protocolo foi avaliado quanto sua sensibilidade e especificidade. Além disso, os marcadores moleculares específicos foram testados na identificação de larvas e sementes de ostras na Baía de Guaratuba, Brasil. O programa de PCR Multiplex foi aplicado de Janeiro a Junho de 2010, em 34 amostras de plâncton, para testar a aplicabilidade em detectar e identificar a presença de larvas. Também foi aplicado em 246 indivíduos (sementes) no intuito de testar a capacidade de diferenciação entre as espécies de ostras. Para revalidar a especificidade dos primers específicos desenvolvidos, os produtos da PCR utilizando os iniciadores específicos de *C. gigas*, foram sequenciados. As sequências obtidas foram submetidas à ferramenta BLAST do GenBank para averiguar a espécie em questão. As sequências depositadas no GenBank que foram semelhantes com a espécie testada, foram utilizadas para inferir sobre os relacionamentos filogenéticos baseando-se em análise Bayesiana. Das amostras de plâncton coletadas mensalmente, foi detectada a presença de *C. gigas* no ponto Cabaraquara nos meses de Janeiro e Abril e no ponto Vicente, somente no mês de Junho. Já dos 246 indivíduos coletados entre os meses de Janeiro a Abril de 2010, 82 foram identificados como sendo *C. gigas*. Ao testar a especificidade dos primers de *C. gigas* submetendo à ferramenta BLAST do GenBank, as sequências assemelharam-se com as sequências da espécie *Crassostrea* sp.. Esse procedimento ratificou os resultados obtidos para as espécies nativas e resultou na detecção de outra espécie de ostra potencialmente invasora no litoral do Paraná, *Crassostrea* sp. Dessa forma, os iniciadores desenvolvidos primeiramente para *C. gigas*, também são capazes de identificar *Crassostrea* sp., assim as amostras positivas para esse marcador podem ser identificadas como *C. gigas* ou como *Crassostrea* sp.. A confirmação da espécie detectada exige o sequenciamento do fragmento amplificado. *Crassostrea* sp. pode ter sido introduzida através da água de lastro e/ou incrustadas em navios trans-oceânicos, mas ainda não se sabe ao certo, mas é possível que seja uma espécie nativa, ainda não descrita. Esforços laboratoriais estão sendo direcionados para definir marcadores específicos para diferenciar *C. gigas* de *Crassostrea* sp. na mesma reação de PCR Multiplex que foi desenvolvida neste trabalho e na resolução taxonômica da identidade da segunda espécie.

Palavras-chave: primers específicos, *Crassostrea* sp., Baía de Guaratuba-PR.

Abstract

Oysters of *Crassostrea* are distributed along the coast of Brazil. Several studies have been conducted to try to clarify the number of species of *Crassostrea* present in Brazil, due to the high morphological variability of the shells, thus identification of species is not an easy work. The species initially described to Brazil are *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea brasiliiana*, considered native species, and *Crassostrea gigas* was introduced in the 70s. Recently, a fourth species was detected in the region of Bragança in Pará state, named as *Crassostea* sp., but your introduction remains uncertain. The introduction of exotic species is a serious event, because it can cause major economic impact and/or ecological. This study proposes to develop and test a methodology for monitoring of invasive species *C. gigas*, based on specific molecular markers. Specific primers were developed based on differences in nucleic acids of the species, resulting in an amplification of specific fragments. The protocol was evaluated for its sensibility and specificity. In addition, we tested the specific molecular markers in the identification of larvae and seeds of oysters, in Guaratuba Bay, Brazil. The Multiplex PCR protocol was implemented in January to June of 2010, in 34 plankton samples to test the applicability of the method to detect and identify the presence of larvae. Thus, was also applied in 246 individuals (seeds) in order to test the ability of differentiation between species of oysters. To validate the specificity of specific primers developed, the PCR products using only the specific primers to the invasive species, were sequenced. The sequences obtained were submitted to BLAST tool of GenBank to ascertain the species in question. The sequences deposited in GenBank, which were similar to the species tested, were used to infer the phylogenetic relationships based on Bayesian analysis. From the plankton samples collected monthly, we detected the presence of *C. gigas* in Cabaraquara site in January and April, and in Vicent site, only in June. Besides of 246 individuals collected between the months of January to April of 2010, 82 were identified as *C. gigas*. When testing the specificity of the primers of *C. gigas* submitting to the BLAST tool of GenBank, the sequences resembled with the sequences of *Crassostrea* sp. Thus, the primers developed primarily to *C. gigas*, are also able to identify *Crassostea* sp., so the samples were positive for this markers can be identified as *C. gigas* or as *Crassostea* sp.. The confirmation of the detected species requires amplicon sequencing. *Crassostea* sp. may have been introduced through ballast water and/or embedded in trans-oceanic ships, but it is not known for sure, thus it may be a native species, not yet described. Laboratory efforts are being directed to define specific markers for differentiating *C. gigas* to *Crassostea* sp. in the same Multiplex PCR in which developed in this work and taxonomic resolution of the identity of the second species.

Keywords: specific primers, *Crassostea* sp., Guaratuba Bay-PR.

NOTA

Ostras do grupo *Crassostrea* (Sacco 1897) estão distribuídas ao longo da costa do Brasil. Segundo Melo (2008), vários estudos têm sido realizados para tentar esclarecer o número de espécies de *Crassostrea* presentes no Brasil, porém há discordâncias entre os mesmos, tornando este assunto confuso até hoje. Segundo Lapégue *et al.* (2002), diversas espécies de *Crassostrea* apresentam alta variabilidade morfológica das conchas e dos tecidos moles, e, portanto, a sua determinação específica é muito difícil.

As espécies inicialmente descritas para o Brasil são *Crassostrea rhizophorae* (Guilding 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck 1819); consideradas espécies nativas (Absher 1989). Essa classificação vem sendo apoiada por vários autores como Ignacio *et al.* (2000) – que diferenciaram *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* através de aloenzimas. Mais tarde, Pie *et al.* (2006^a) identificaram *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana* através de marcadores de PCR-RFLP diferenciando-a de uma terceira espécie, *Crassostrea gigas* (Thunberg 1975). *Crassostrea gigas*, conhecida como ostra do Pacífico, foi introduzida na década de 70 para fomentar a ostreicultura no país (Poli and Littlepage 1998), mas bancos naturais da espécie já são registrados para o litoral sul do país (Melo *et al.* 2010^a).

Recentemente, uma quarta espécie foi detectada na região de Bragança, no estado do Pará, denominada como *Crassostrea* sp. (Melo *et al.* 2010b). Através de análises filogenéticas, esta espécie agrupou-se com outras espécies de ostras do Indo-Pacífico, no entanto, essa espécie continua sem identificação adequada.

Nos dias atuais, a introdução de espécies exóticas é um evento preocupante e tem chamado à atenção da comunidade científica em todo o mundo (D'Antonio & Vitousek 1992, Pimentel *et al.* 2000, França *et al.* 2007, Rodrigues *et al.* 2007). A bioinvasão é conhecida por causar grandes impactos, sejam econômicos e/ou ecológicos, ao hábitat em que a espécie for introduzida (Darrigran 1995, Karatayev *et al.* 2006).

França *et al.* (2007) destacam alguns moluscos que têm invadido com sucesso os ecossistemas aquáticos, tais como *Dreissena polymorpha* (Pallas

1771), *Corbicula fluminea* (Muller 1774) e *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857). Outro exemplo é *C. gigas*, sua introdução na Austrália na década de 80 gerou benefícios econômicos para os cultivadores, no entanto, seu efeito foi devastador para o cultivo e a coleta artesanal da ostra nativa (*Saccostrea glomerata*; Gould 1850), pois ao ocupar grande parte do habitat disponível provocou o deslocamento da ostra nativa (Patil *et al.* 2005, Krasso *et al.* 2007).

Com o crescente número de introduções de espécies exóticas, é necessário desenvolver técnicas de detecção prévia ou ainda de monitoramento desses organismos, pois assim, é possível prever os locais de ocorrência e elaborar estratégias futuras de controle (Melo *et al.* 2010b). No entanto, o monitoramento apenas das fases adultas é impreciso e complicado pelo fato desses organismos já se encontrarem fixados em substrato em franco processo de colonização, muito tarde para permitir a aplicação de procedimentos eficientes de controle. Além disto, existe a dificuldade técnica de inspeção dos substratos submersos devido à profundidade e/ou a turbidez da água que está sendo analisada. Já o monitoramento através da amostragem de plâncton, permite a detecção das fases larvais antes de sua fixação, com menor esforço de coleta e com a possibilidade de detectar a invasão precocemente e de prever a época e o local (is) de sua fixação. Todavia, larvas de moluscos bivalves são bastante conservadas morfológicamente e sua identificação exige frequentemente o uso de técnicas de microscopia eletrônica (ver Cristo *et al.* 2010) que tornam seu uso em estudos ecológicos inviáveis.

Métodos de detecção molecular de larvas de moluscos têm sido desenvolvidos para contornar essas limitações metodológicas e conferir ao processamento de amostras maior especificidade e sensibilidade (Claxton *et al.* 1997, Toro 1998, Pie *et al.* 2006b, Boeger *et al.* 2007). Avanços tecnológicos permitem, ainda, que essas prospecções moleculares sejam tanto qualitativas quanto quantitativas (Endo *et al.* 2009).

Assim, este estudo teve como objetivo inicial desenvolver e testar uma metodologia de monitoramento de uma espécie invasora registrada no litoral

brasileiro, *C. gigas*, baseando-se em marcadores moleculares. Tal metodologia possibilita agilizar o processamento das amostras de plâncton e otimizar os níveis de confiabilidade e de eficiência na detecção e identificação da espécie invasora em ambiente natural.

Em laboratório, o DNA foi extraído a partir de 1mm³ do músculo adutor de cada exemplar adulto de *C. gigas* utilizando o kit de extração EZ-DNA (Biosystems, Brazil) e um Eppendorf Thermomixer®, seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. O fragmento de 16S mtDNAa foi amplificado e sequenciado como descrito no Capítulo I e incorporado ao alinhamento utilizado para o desenvolvimento dos primers específicos das duas espécies nativas (Anexo I). Um par de iniciadores específicos foi desenhado para amplificar uma porção do fragmento 16S Mdna de *C. gigas* (Cgig_F2 5'–TACCTGCCCAGTGCGAAATATTACTGTAAA–3' e Cgig_R 5'–ACATCGAGGTGCCAATCC–3') resultando na amplificação de aproximadamente 398 pb. Esse marcador foi integrado na reação Multiplex de detecção das espécies de ostras nativas (Capítulo I) otimizada com o seguinte protocolo: 94°C/ 4min de desnaturação inicial seguido por 32 ciclos de 94°C/20s de desnaturação posterior, 59°C/44s de anelamento, 72°C/15s de extensão inicial e, 72°C/1min de extensão final em 10µL de reação com 1U de TaqPlatinum (Invitrogen®), 1X de Buffer, 3Mm de MgCl₂, 0.4Mm de dNTPs, 2µM de cada iniciador específico de *C. rhizophorae* e 1.2µM de cada iniciador específico de *C. brasiliana*, 0.075µM de cada iniciador específico de *C. gigas*, 0.1µM de cada iniciador universal 7F e 1100R, 2 ng/µL de extrato de amostra de DNA e, água ultra-pura para completar o volume total. Para testar a sensibilidade do protocolo resultante, amostras de tecido de concentração conhecida (2 ng/µL) para cada uma das 3 espécies de ostras, foram diluídas (1:10, 1:100, 1:1000; Figura 1).

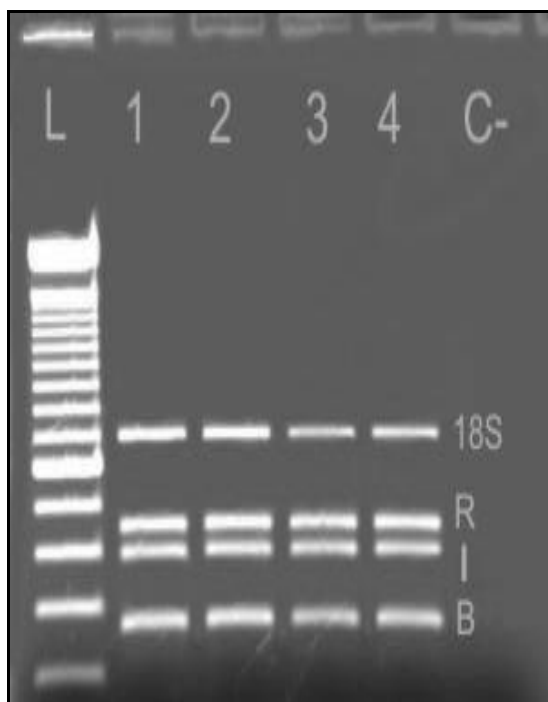


Figura 1. Resultado da amplificação de PCR Multiplex utilizando iniciadores universais (18S) e iniciadores específicos para *CRISTO C. rhizophorae*, (B) *C. brasiliiana* e (I) Espécie invasora. (L) Leader 100pb, (1) Amostra de tecido adulto com 2 ng/μL e suas diluições (2) 0.2 ng/μL, (3) 0.02 ng/μL, (4) 0.002 ng/μL, (C-) Controle Negativo.

Amostras de plâncton (n=34) foram coletadas em três pontos localizados às margens da Baía de Guaratuba (Tabela I) no estado do Paraná. Filtrou-se 1000L de água marinha de cada ponto utilizando uma rede de captura de plâncton (malha de 65μm). Ainda em campo, o produto filtrado foi submergido em álcool 92% em frascos separados e devidamente etiquetados. Foram coletados 246 indivíduos (sementes) provindos de coletores instalados às margens da Baía de Guaratuba (Cabaraquara, Tabela I) e preservados em solução tampão de DMSO-EDTA. Em laboratório, o extrato de DNA total das amostras de plâncton foi obtido após uma nova filtragem com o auxílio de uma bomba a vácuo manual, este procedimento resulta em um acúmulo de organismos em um papel filtro Millipore®. Em seguida as amostras de plâncton e de sementes foram submetidas ao mesmo protocolo de extração e ao protocolo de prospecção e identificação de espécies de *Crassostrea* encontradas no litoral sul do Brasil descrito acima.

A aplicação preliminar do protocolo resultou na detecção de larvas em zooplâncton (Figura 2) e de sementes, inicialmente, identificadas como *C. gigas*. (os resultados para as espécies nativas são apresentados no Capítulo II). Das 34 amostras de plâncton coletadas, larvas *C. gigas* foram detectadas nos meses de Janeiro e Abril. No ponto Parati, nenhuma larva de *C. gigas* foi detectada. Já no ponto Vicente, larvas de *C. gigas* foram detectadas somente no mês de Junho. Dos 246 indivíduos coletados entre os meses de Janeiro a Abril de 2010, 82 foram identificadas como *C. gigas*.

Como procedimento padronizado, no processo de avaliação dos marcadores desenvolvidos, foi realizado um teste de confirmação do resultado indicado pelo marcador específico através do sequenciamento da banda específica. O protocolo de confirmação consiste no sequenciamento das bandas específicas para cada uma das três espécies de ostras de amostras de tecidos para confirmação da identidade das sementes determinadas pelo protocolo Multiplex.

As sequências obtidas por esse procedimento foram submetidas à ferramenta BLAST do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). As espécies de *Crassostrea* identificadas pelo BLAST (Tabela II) e as sequências obtidas como descrito acima foram alinhadas e utilizadas em uma reconstrução filogenética para inferir sobre a identidade específica de uma subamostra das sementes identificadas como *C. gigas* (n=8; ID_125-3, ID_177, ID_11, ID_10-2, ID_17-3, ID_163, ID_135-1, ID_205), *C. rhizophorae* (ID_191 e ID_196) e *C. brasiliiana* (ID_108-2 e ID_100-3). Como grupos externos, foi utilizada uma sequência de *Ostrea denselamellosa* e outra de *Saccostrea mordax*, totalizando 32 sequências do fragmento 16S de aproximadamente 410pb.

O relacionamento filogenético dos indivíduos e espécies selecionadas (Tabela II), foi obtida através de análise bayesiana conduzida no MrBayes implementado no CIPRES (www.phylo.org/sub_sections/portal; Miller *et al.* 2009; Figura 3). O modelo inicial (TVM+G) e os priors dessa análise foram definidos pelo programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). Foram utilizadas 5.000.000 de gerações e quatro Cadeias de Markov Monte Carlo (MMCC).

Esse procedimento (Figura 3) ratificou os resultados obtidos para as espécies nativas e resultou na detecção de outra espécie de ostra potencialmente invasora no litoral do Paraná, *Crassostrea* sp.. Nenhum espécime de *C. gigas* foi identificado nesse procedimento, pois os espécimes previamente detectados pelo marcador desenvolvido para essa espécie agruparam com sequências de *Crassostrea* sp.. Portanto, é evidente que o marcador desenvolvido para *C. gigas* apresenta uma reação cruzada com *Crassostrea* sp. (ver Melo *et al.* 2010b). Dessa forma, os iniciadores desenvolvidos primeiramente para *C. gigas*, também são capazes de identificar *Crassostrea* sp. e as amostras com resultados positivo para esse marcador podem ser identificadas ou como *C. gigas* ou como *Crassostrea* sp. A confirmação da espécie detectada exige, nesse momento, o sequenciamento do fragmento amplificado.

A detecção de sementes de *Crassostrea* sp. representa a primeira constatação de que a espécie encontra-se estabelecida na região da Baía de Guaratuba, litoral do estado do Paraná. Segundo Melo *et al.* (2010b), esta espécie pode ter se dispersado ou ter sido introduzida acidentalmente através da água de lastro e/ou incrustadas em navios trans-oceânicos, mas ainda não se sabe como essa espécie invasora foi introduzida no Brasil. Sua distribuição conhecida no litoral brasileiro era restrita a costa norte e a detecção no litoral sul parece sugerir que, ao contrário de *C. gigas*, a espécie apresenta maior tolerância a condições ambientais (e.g. variação de temperatura). Isso indica que *Crassostrea* sp. pode representar uma espécie invasora potencialmente mais agressiva, do que *C. gigas*, sob o ponto de vista de sua capacidade de invasão.

Evidentemente, apesar de não considerado nos estudos anteriores, é possível que *Crassostrea* sp. represente uma espécie nativa, ainda não descrita e reconhecida como tal. Esforços laboratoriais estão sendo direcionados no sentido de definir marcadores específicos que permitam a diferenciação de *C. gigas* e *Crassostrea* sp. na reação de Multiplex que desenvolvemos, sem que seja necessário realizar o sequenciamento do fragmento amplificado; e na resolução taxonômica da identidade da segunda espécie.

Tabela I. Pontos de Coleta na Baía de Guaratuba – PR, Brasil e o tipo de amostra coletada em cada ponto.

Pontos de Coleta	Tipo de Amostra Coletada	Coordenadas
Cabaraquara	Plâncton e Tecido	S25° 49' 59.8'' W048° 34' 41.6''
Vicente	Plâncton e Tecido	S25° 51.1' 54'' W048° 36.4' 81''
Parati	Plâncton e Tecido	S25° 48' 02.5'' W048° 36' 25.0''

Por fim, é importante ressaltar que a amostragem que resultou na detecção de *Crassostrea* sp. não pode ser considerada negativa para *C. gigas*. O número de sequências obtido foi reduzido e é muito provável que *C. gigas* esteja representada de fato nas amostras restantes. Essa conclusão é especialmente significativa considerando que já foi detectada a presença dessa espécie na Baía de Guaratuba por Cristo (2006) e, ainda, no litoral de Santa Catarina, vizinho ao estado do Paraná, por Melo *et al.* (2010^a). O desenvolvimento de novos marcadores para resolução do problema da reação cruzada detectada nesse primeiro momento representa o passo inicial para definir o status dessas duas espécies no litoral brasileiro.

Tabela II. Sequências obtidas do GenBank mostrando a localidade de origem, o número de sequências utilizadas e seus respectivos números de acesso.

Espécies	Localidade	Número de Sequências	Números de Acesso
<i>Crassostrea rhizophorae</i>	Brasil	4	GU574706.1, FJ478032.1, HQ652329*, HQ652330*.
<i>Crassostrea brasiliiana</i>	Brasil	3	FJ478029.1, HQ652328*, HQ652331*.
<i>Crassostrea</i> sp	Brasil	3	EF473281.1, EF473278.1, EF473280.1

<i>Crassostrea gasar</i>	Brasil	1	EF473274.1,
<i>Crassostrea gigas</i>	Brasil	2	FJ478036.1, FJ478035.1
<i>Crassostrea iredalei</i>	China	1	EU815953.1
<i>Crassostrea hongkongensis</i>	China	1	EU672834.1
<i>Crassostrea rivularis</i>	China	1	AY510450.1
<i>Crassostrea virginica</i>	USA	1	AF092285.1
<i>Crassostrea belcheri</i>	Dinamarca	1	EF122383.1
<i>Crassostrea corteziensis</i>	México	1	EU733651.1
<i>Crassostrea sikamea</i>	China	1	AY632551.1
<i>Crassostrea angulata</i>	China	1	EU815952.1
<i>Crassostrea ariakensis</i>	China	1	AY632546.1
<i>Saccostrea mordax</i>	China	1	AF353099.1
<i>Ostrea denselamellosa</i>	China	1	EU815983.1

* Sequencias obtidas a partir dos primers específicos desenvolvidos neste trabalho.

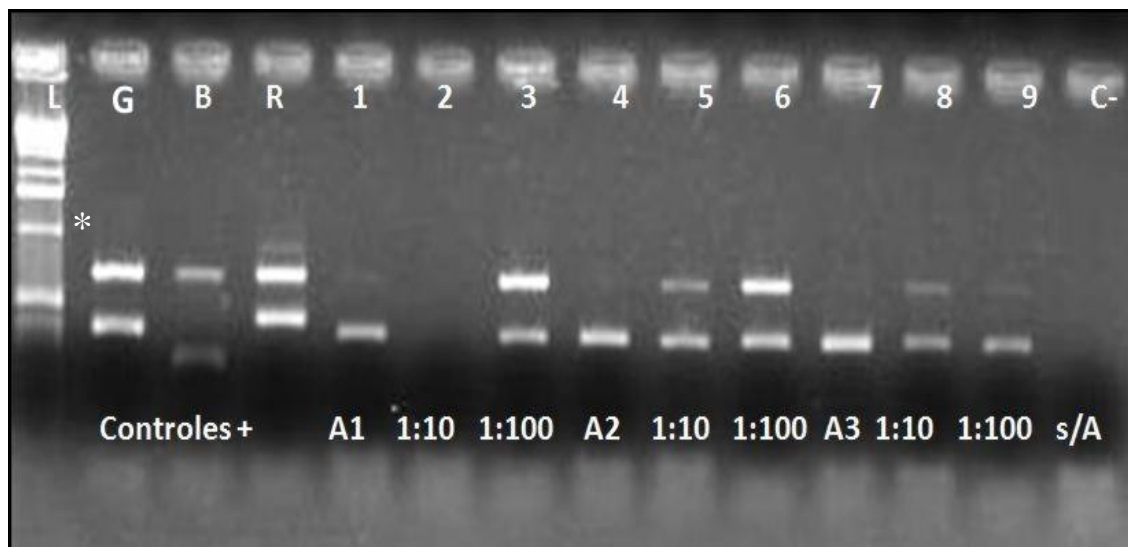


Figura 2. Resultado obtido após submeter três amostras de plâncton à reação de PCR Multiplex. (*) Fragmento de 18S, (L) Leader 1Kb, (G) Controle Positivo de *C. gigas*, (B) Controle Positivo de *C. brasiliana*, CRISTO Controle Positivo de *C. rhizophorae*, (1) Amostra de plâncton 1 com 50 ng/μL e suas diluições (2) 1:10 com 5 ng/μL e (3) 1:100 com 0.5 ng/μL, (4) Amostra de plâncton 2 com 50 ng/μL e suas diluições e suas diluições (5) 1:10 com 5 ng/μL e (6) 1:100 com 0.5 ng/μL, (7) Amostra de plâncton 3 com 50 ng/μL e suas diluições (8) 1:10 com 5 ng/μL e (9) 1:100 com 0.5 ng/μL, (C-) Controle Negativo: sem amostra.

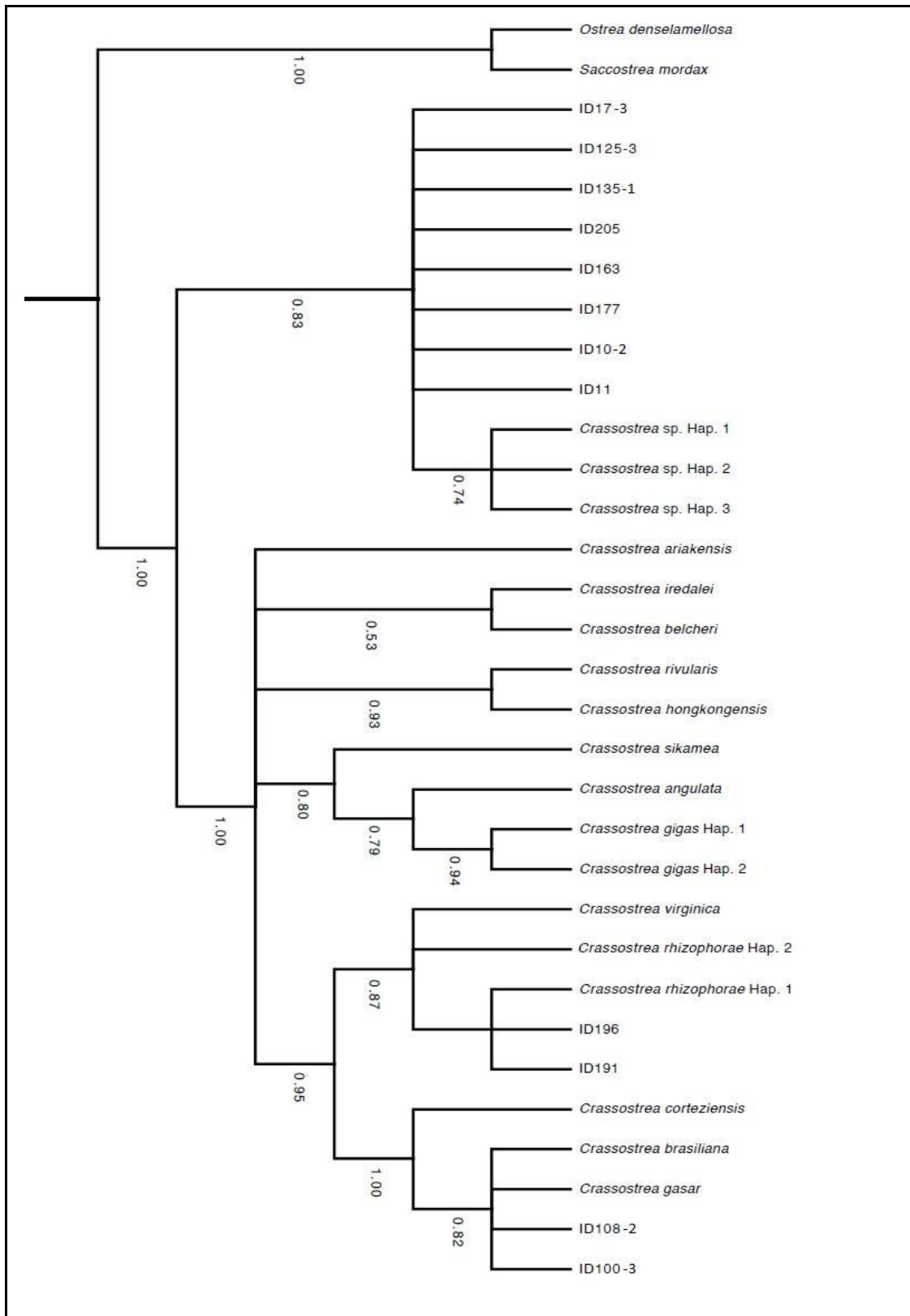


Figura 3. Árvore filogenética consenso gerada pela análise Bayesiana para o gênero *Crassostrea* baseado no fragmento 16S Rna. *Saccostrea mordax* e *Ostrea denselamellosa* foram usadas como grupo externo. Os ramos terminais nomeados como ID, são sequencias produzidas a partir dos primers específicos desenvolvidos neste trabalho. Os números abaixo dos ramos indicam valores de Bootstrap que suportam cada ramo.

REFERÊNCIAS

- Absher, TM (1989) Populações naturais de ostras do gênero *Crassostrea* do litoral do Paraná – Desenvolvimento larval, recrutamento e crescimento. Ph.D. Thesis, Instituto de Oceanografia, USP, São Paulo.
- Boeger, WA; Pie MR; Falleiros RM; Darrigran G; Mansur MCD; Belz CE (2007) Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. *J.Plankton Res.*, 29, 1015-1019.
- Claxton, WT; Martel A; Dermott R *et al.* (1997) Discrimination of field-collected juveniles of two introduced dreissenids (*Dreissena polymorpha* and *Dreissena bugensis*) using mitochondrial DNA and shell morphology. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54, 1280-1288.
- Cristo, SW (2006) Biologia Reprodutiva e Ecologia de Ostras do gênero *Crassostrea* Sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná-Brasil): Um Subsídio ao Cultivo. Dr. Tese, Departamento de Zoologia, UFPR, Paraná.
- Christo, SW; Absher TM and Boehs G (2010) Morphology of the larval shell of three oyster species of the genus *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia: Ostreidae). *Braz. J. Biol.* 70 (3): 645-650. Doi: 10.1590/S1519-69842010000300023.
- D'antonio, CM & Vitousek PM (1992) Biological Invasions by Exotic Grasses, the Grass/Fire Cycle, and Global Change. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23, 63-87.
- Darrigran, G & Pastorino G (1995) The recent introduction of the freshwater anks c bivalve *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. *The Veliger*, 32(2), 171-175.
- Endo, N; Sato K and Nogata Y (2009) Molecular based method for the detection and quantification of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* using real-time PCR. *Plankton and Benthos Research*, 4(3): 125-128.
- França, RS; Suriani AL; Rocha O (2007) Composição das espécies de moluscos bentônicos nos reservatórios do baixo rio Tietê (São Paulo, Brasil) com uma

avaliação de impacto causado pelas espécies exóticas invasoras. *Revista Brasileira de Zoologia*, 24(1), 41-51.

Ignacio BL; Absher TM; Lazoski C; Solé-Cava AM (2000) Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Marine Biology*, 136, 987-991. Doi: 10.1007/s002270000252

Karatayev, AY; Padilla DK; Minchin D. *et al.* (2006) Changes in Global Economies and Trade: the Potential Spread of Exotic Freshwater Bivalves. *Biological Invasions*, 9(2), 161-180.

Krassoi, FR; Brown KR; Bishop MJ; Kelaher BP and Summerhayes, S (2008) Condition-specific competition allows coexistence of competitively superior exotic oysters with native oysters. *J. Anim. Ecol.*, 77: 5–15. Doi: 10.1111/j.1365-2656.2007.01316.x

Lapégue, S; Boutet I; Leitão A; Heurtebise S; Garcia P; Thiriot-Quiévreux C; Boudry P (2002) Trans-Atlantic Distribution of a Mangrove Oyster Species Revealed by 16S mtDNA and Karyological Analyses. *Bio. Bull.*, 202, 232-242.

Melo, AGC (2008) Estudos genético-populacionais em *Crassostrea gasar* de cinco estados da costa brasileira baseados em sequencias do gene mtDNA COI. MSc. Tese, Departamento de Biologia Ambiental, UFPA, Bragança. (http://www.iieb.org.br/enviados/publicador_pdf/trab_Dissert_Aline_Grasielle.pdf)

Melo, CMR; Silva FC; Gomes C; Solé-Cava AM; Lazoski C (2010^a) *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in Southern Brazil. *Biol. Invasions*, 12,441-449. Doi: 10.1007/s10530-009-9475-7

Melo, AGC; Varela ES; Beasley CR; Schneider H *et al.* (2010b) Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). *Genetics and Molecular Biology*, 33 (3), 564-572.

Miller, MA; Holder MT; Vos R; Midford PE; Liebowitz T. *et al.* (2009) The CIPRES Portals. CIPRES 2009-08-04. Accessed: 18 de Janeiro de 2011.

- Patil, JG; Gunasekera RM; Deagle BE; Bax NJ (2005) Specific Detection of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) Larvae in Plankton Samples Using Nested Polymerase Chain Reaction. *Mar. Biotechnol.* 7, 11-20.
- Pie, MR; Ribeiro RO; Boeger WA; Ostrensky A; Falleiros RM; Angelo L (2006a) 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. *Aquacult. Res.*, 37,1598–1600. Doi:10.1111/j.1365-2109.2006.01591.x
- Pie, MR; Boeger WA; Patella L; Falleiros R (2006b) A Fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *J.Molluscan Stud.*, 72, 218-219. Doi:10.1093/mollus/eyi070.
- Pimentel, D; Lach L; Zuniga R; Morrison D (2000) Environmental and Economic Costs of Nonindigenous Species in the United States. *BioScience*, 50, 53-65.
- Poli, CR and Littlepage, J (1998) Desenvolvimento do Cultivo de Moluscos no Estado de Santa Catarina. In: AQUICULTURA BRASIL 1998, 1 Recife, 1998. Anais, 163-182.
- Posada, D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256. (<http://darwin.uvigo.es/software/jmodeltest.html>)
- Rodrigues, JCA; Pires-Junior OR; Coutinho MF *et al.* (2007) First occurrence of the Asian Clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Paraná Lake, Brasília, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 67(4), 789-790.
- Toro, JE (1998) Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic samples. *Journal of Shellfish Research*, 17, 1203-1205.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Este é o primeiro trabalho de monitoramento do ciclo reprodutivo de *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae*, utilizando ferramenta molecular para detecção e identificação das espécies, simultaneamente, até mesmo, de uma única larva em porções muito diluídas de água do mar.
2. Os testes com amostras de campo demonstraram que o método desenvolvido permite a detecção de larvas em plâncton e rápida identificação dos indivíduos dos coletores.
3. As flutuações, entre os pontos e entre os meses amostrados, na ocorrência de larvas, sugerem que os fatores ambientais podem estar determinando o transporte horizontal das larvas.
4. O pico de assentamento de *C. rhizophorae* e de *C. brasiliiana*, provavelmente, é influenciado pela temperatura.
5. O protocolo desenvolvido neste trabalho pode ter outras várias aplicações como: monitorar o ciclo reprodutivo de *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana*; prever o tempo de assentamento de cada espécie individualmente assegurando aos cultivadores a especificidade das sementes coletadas e; complementar a identificação morfológica das espécies facilitando a seleção do ponto de cultivo e maximizando o sucesso em obter larvas de *C. brasiliiana* pelos cultivadores.
6. O marcador desenvolvido para *C. gigas* apresenta uma reação cruzada com *Crassostrea* sp., com isso, os marcadores desenvolvidos primeiramente para *C. gigas* também são capazes de identificar *Crassostrea* sp..
7. A detecção de sementes de *Crassostrea* sp. representa a primeira constatação de que a espécie encontra-se estabelecida na região da Baía de Guaratuba, litoral do estado do Paraná.

ANEXOS

Anexo I: Alinhamento das sequências obtidas do GenBank para desenhar os primers específicos (assinalados) de *Crassostrea rhizophorae*, *Crassostrea brasiliiana* e *Crassostrea gigas*.

	5	15	25	35	45	55
cgigas	TACCTGCCCA	GTGCGAAATA	TTACTGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
cgigas4	-----	-----	-----	-----	----GAGGG	TGCTAAGGTA
cgigas5	-----	-----	-----	-----	----GAGGG	TGCTAAGGTA
cgigas3	TACCTGCCCA	GTGCGAAATA	TTACTGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
cbrasilian	TACCTGCCCA	GTGCG-TATT	ATCTTGTTAA	CGGCCGCCTT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
cbrasilian	TACCTGCCCA	GTGCG-TATT	ATCTTGTTAA	CGGCCGCCTT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
cbrasilian	TACCTGCCCA	GTGCG-TATT	ATCTTGTTAA	CGGCCGCCTT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
cbrasilian	TACCTGCCCA	GTGCG-TATT	ATCTTGTTAA	CGGCCGCCTT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
crhizophor	TACCTGCCCA	GTGCGATATT	AAGTCGTAAA	CGGCCGCCTT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
crhizophor	TACCTGCCCA	GTGCGATATT	AAGTCGTAAA	CGGCCGCCTT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
chongkong	TACCTGCCCA	GTGCGAAATA	TTACTGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
csimakea	TACCTGCCCA	GTGCGAAATA	TTACTGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
ccortezien	----TGCCCA	GTGCA-TATT	AT-TTGTC	CGGCCGCCTT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
cangulata	-----	-----	-----	-----	----GAGGG	TGCTAAGGTA
crivularis	TACCTGCCCA	GTGCGAAATA	TTACTGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
cnippona	-----	-----	-----	-----	-----	TGCCAAGGTA
cbelcheri	-----	-----	-----	-----	-----T	AGCGTGAGGG
cariakensis	TACCTGCCCA	GTGCGAAATA	TTACTGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
cvirginica	-----	-----	-----	CGGCCGCCTT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
saccostrea	TACCTGCCCA	GTGC-----A	AAATTGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCCAAGGTA
ostrea_edu	TGCCTGCCCA	GTGCGATCAA	AAGTCGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
ostrea_con	TGCCTGCCCA	GTGCGATTAA	AAGTCGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
teskeyostr	TGCCTGCCCA	GTGCGATTAA	AAGTCGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
ostrea_lur	TGCCTGCCCA	GTGCGATTAA	AAGTCGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCTAAGGTA
saccostrea	TACCTGCCCA	GTGC-----A	AAGTTGTAAA	CGGCCGCCCT	AGCGTGAGGG	TGCCAAGGTA

	65	75	85	95	105	115
cgigas	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTGGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTGACTG
cgigas4	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTGGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTGACTG
cgigas5	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTGGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTGACTG
cgigas3	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTGGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTGACTG
cbrasilian	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	AGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCCTCACTG
cbrasilian	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	AGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCCTCACTG
cbrasilian	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	AGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCCTCACTG
cbrasilian	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	AGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCCTCACTG
crhizophor	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTGGGCC	AGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCTTTGCTG
crhizophor	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTGGGCC	AGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCTTTGCTG
chongkong	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTAACTG
csimakea	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTAACTG
ccortezien	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	AGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCCTCACTG
cangulata	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTAGCTG
crivularis	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTAACTG
cnippona	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTGGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTGACTG
cbelcheri	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTAACTG
cariakensis	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GTTTAACGAG	GGTTTAACTG
cvirginica	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTG	ATTGTGGGCC	TGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCTTTGCTG
saccostrea	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GATTGACGAG	GGTCAAGCTG
ostrea_edu	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GTTTGACGAG	GGCTTAACTG
ostrea_con	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GCTTGACGAG	GGTTTAACTG
teskeyostr	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GCTTGACGAG	GGCTTAACTG
ostrea_lur	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GCTTGACGAG	GGTTTAACTG
saccostrea	GCGAAATTCC	TTGCCTTTTA	ATTGTAGGCC	TGCATGAATG	GATTGACGAG	GGTCAAACTG

	125	135	145	155	165	175
cgigas	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
cgigas4	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
cgigas5	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
cgigas3	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
cbrasilian	TCTCTTAGTT	CTAT-GTTGA	AATTGTAGTG	TAGGTGAAGA	TACCTTCATA	AAAAAGTAAG
cbrasilian	TCTCTTAGTT	CTAT-GTTGA	AATTGTAGTG	TAGGTGAAGA	TACCTTCATA	AAAAAGTAAG
cbrasilian	TCTCTTAGTT	CTAT-GTTGA	AATTGTAGTG	TAGGTGAAGA	TACCTTCATA	AAAAAGTAAG
cbrasilian	TCTCTTAGTT	CTAT-GTTGA	AATTGTAGTG	TAGGTGAAGA	TACCTTCATA	AAAAAGTAAG
crhizophor	TCTCTCGATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAGTG	TAGGTGAAAA	TACCTTCATA	AGAAAAGTTAG
crhizophor	TCTCTCGATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAGTG	TAGGTGAAAA	TACCTTCATA	AGAAAAGTTAG
chongkong	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
csimakea	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
ccortezien	TCTCTCAGCT	CTAT-ATTGA	AATTGCAGTG	GAGGTGAAGA	TACCTCCATA	AGAAAAGTAAG
cangulata	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAGTG	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
crivularis	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
cnippona	TCTCTAAGTT	TTTT-ATTGA	AATTGTAGTG	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
cbelcheri	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
cariakensis	TCTCTAAATT	TTTT-ATTGA	AATTGTAAGT	AAGGTGAAGA	TACCTTCATT	TAAAAGTTAG
cvirginica	TCTCTTGGTT	TTTT-ATTGA	AATTGTAGTG	TAGGTGAAAA	TACCTTCTAT	AAAAAGTTAG
saccostrea	TCTCTTGCTT	TGA--GC-GA	AATTGGACTG	AAGGTGAAGA	TACCTTCATA	TAAAAGTTAG
ostrea_edu	TCTCTAGTTT	GTAAGATCTA	AATTGGATTA	AAGGTGAAGA	TACCTTTATA	TAAAAGTCAG
ostrea_con	TCTCTGGTTT	GTAAGATCTA	AATTGGATTA	AAGGTGAAGA	TACCTTTATA	TAAAAGTCAG
teskeyostr	TCTCTGGTTT	ATGAAGTTTA	AATTGGGTTA	AAGGTGAAGA	TACCTTTATA	TAAAAGTAAG
ostrea_lur	TCTCTGGTTT	GTAAGGTCTA	AATTGGATTA	AAGGTGAAGA	TACCTTTATA	TAAAAGTCAG
saccostrea	TCTCTTGCTT	TGT--ATTGA	AATTGGACTG	AAGGTGAAGA	TACCTTCATG	TAAAAGTTAG

	185	195	205	215	225	235
cgigas	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAACTTTATT	CAGGAGTAA-	AAGATTTTTA
cgigas4	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAACTTTATT	CAGGAGTAA-	AAGATTTTTA
cgigas5	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAACTTTATT	CAGGAGTAA-	AAGATTTTTA
cgigas3	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAACTTTATT	CAGGAGTAA-	AAGATTTTTA
cbrasilian	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAAGCTAGAT	TAAATGGCAA	AAGATTTTTA
cbrasilian	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAAGCTAGAT	TAAATGGCAA	AAGATTTTTA
cbrasilian	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAAGCTAGAT	TAAATGGCAA	AAGATTTTTA
cbrasilian	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAAGCTAGAT	TAAATGGCAA	AAGATTTTTA
crhizophor	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAAAC	TAAACTGAAT	TAATAAGTAA	AAGATTTTTG
crhizophor	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAAAC	TAAACTGAAT	TAATAAGTAA	AAGATTTTTG
chongkong	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAACTTTATT	CAGAAGTAA-	AAGATTTTTA
csimakea	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TGACTTTTATT	CAGGAGTAA-	AAGATTTTTA
ccortezien	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAAGTCAGGT	TAAATGGCAA	AAGATTTTTA
cangulata	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAACTTTATT	CAGGGGTAA-	AAGATTTTTA
crivularis	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TAACTTTATT	CAGAAGTAA-	AAGATTTTTA
cnippona	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TGGCTTTTATT	CAGAGGTAA-	AAGATTTTTA
cbelcheri	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TGACTATATT	CAGAAGTAA-	AAGATTTTTA
cariakensis	ACAAAAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAA-T	TGACTTTTATT	CAGGAGTAA-	AAGATTTTTA
cvirginica	ACAATAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTGAAAAAGC	TAAGCTGAAT	TAATAATTAA	AAGATTTTTG
saccostrea	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTTAAAA-A	TTTATTTTATT	AAGGATTGT-	AAGATTTTTA
ostrea_edu	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTTAAAG--	TCAACTTGTT	TAGGAGTTT-	CAGATTTTTA
ostrea_con	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTTAAAG--	TCGGTTTATT	AAGAAATCCA	AAGATTTTTA
teskeyostr	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTTAAAG--	TCAATTTTATT	AAGAAATTT-	AAGATTTTTA
ostrea_lur	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTTAAAG--	TCGGTTTATT	GAGGAAACCC	AAGATTTTTA
saccostrea	ACAAGAAGAC	CCCGTGCAAC	TTTTAAAA-A	TTTACTTATT	AAGGGTTGT-	AAGATTTTTA

	245	255	265	275	285	295
cgigas	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGCA	AGT-CTAACC	TTT-CTGAAT	AACTAACT--	-CTTTCCGGA
cgigas4	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGCA	AGT-CTAACC	TTT-CTGAAT	AACTAACT--	-CTTTCCGGA
cgigas5	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGCA	AGT-CTAACC	TTT-CTGAAT	AACTAACT--	-CTTTCCGGA
cgigas3	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGCA	AGT-CTAACC	TTT-CTGAAT	AACTAACT--	-CTTTCCGGA
cbrasilian	GGTGGGGCGC	CAAAAGAGGA	AACTATAACC	TCTGCTGTTT	AAGCTAATT-	-CTTACTGGA
cbrasilian	GGTGGGGCGC	CAAAAGAGGA	AACTATAACC	TCTGCTGTTT	AAGCTAATT-	-CTTACTGGA
cbrasilian	GGTGGGGCGC	CAAAAGAGGA	AACTATAACC	TCTGCTGTTT	AAGCTAATT-	-CTTACTGGA
cbrasilian	GGTGGGGCGC	CAAAAGAGGA	AACTATAACC	TCTGCTGTTT	AAGCTAATT-	-CTTACTGGA
cbrasilian	GGTGGGGCGC	CAAAAGAGGA	AACTATAACC	TCTGCTGTTT	AAGCTAATT-	-CTTACTGGA
crhizophor	GGTGGGGCGC	CTAAAGAGAA	AAATTTAACC	TCTGTTGTGT	TACAAAAATT	-CTGACTAGA
crhizophor	GGTGGGGCGC	CTAAAGAGAA	AAATTTAACC	TCTGTTGTGT	TACAAAAATT	-CTGACTAGA
chongkong	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGTA	AGT-CTAACC	TTT-CTGAAT	AATTAGTT--	-CTTTCCGGA
csimakea	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGTA	AGC-CTAACC	TTT-CTGAGT	GACTAACT--	-CTTTCCGGA
ccortezien	GGTGGGGCGC	CGAAAGAGGA	AAATATAACC	TCT-TTGTTT	AAGCTAATT-	-CTTACTGGA
cangulata	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGTA	AGC-CTAACC	TTT-CTGAGT	AGGAGTTT--	-CTTTCAGGA
crivularis	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGTA	AGT-CTAACC	TTT-CTGAAT	AATTAGTT--	-CTTTCCGGA
cnippona	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGTA	AGT-CTAACC	TTT-CTGAAT	AATTAGTT--	-CTTTCCGGA
cbelcheri	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGTA	AGT-CTAACC	TTT-CTGAAT	AGTAAATT--	-CTCTCTGGA
cariakensis	GGTGGGGCGC	CTAGAAAGTA	AGC-CTAACC	TTT-CTGAGT	AACTAACT--	-CTTTCCGGA
cvirginica	GGTGGGGCGC	CTAA-GAGTA	AAATTTAACC	TCTGTTGAAT	TACAAAA-TT	-CT-ACTA-A
saccostrea	GGTGGGGCGC	CTAGGAAGTA	AAACTTAACC	TTC-TTATTT	GTAAAAAGCA	ACTGTCTGGT
ostrea_edu	GGTGGGGCGC	CTATTAAGTA	ATA-TTAACC	TTA-GTGTAC	GATAAAA---	-CTTTCAAGT
ostrea_con	GGTGGGGCGC	CTACTGAGTA	ATA-ATAACC	TCT-GTGTAT	AAAAAAA---	-CTTTCAAGT
teskeyostr	GGTGGGGCGC	CTACTGAGTA	ATA-ACAACC	TCT-GTGTAT	GATGAAA---	-CTTTGAGT
ostrea_lur	GGTGGGGCGC	CTACTGAGTA	ATA-CTAACC	TCT-GTGTAT	AAAAAAA---	-CTTTGAGT
saccostrea	GGTGGGGCGC	CTAGGAAGTA	AAACTTAACC	TTC-TTATTT	GTAAAAAAA	ACTGTCTGGT

	305	315	325	335	345	355
cgigas	TTTGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
cgigas4	TTTGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
cgigas5	TTTGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
cgigas3	TTTGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
cbrasilian	GTTGACCTGA	CTTAAGTCGA	TCAAAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCT
cbrasilian	GTTGACCTGA	CTTAAGTCGA	TCAAAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCT
cbrasilian	GTTGACCTGA	CTTAAGTCGA	TCAAAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCT
cbrasilian	GTTGACCTGA	CTTAAGTCGA	TCAAAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCT
cbrasilian	GTTGACCTGA	CTTAAGTCGA	TCAAAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCT
crhizophor	TTTGACCTGA	CTTTGGTCGA	TCAAAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCT
crhizophor	TTTGACCTGA	CTTTGGTCGA	TCAAAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCT
chongkong	TTCGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
csimakea	TTTGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
ccortezien	GTTGACCCGA	CCTAAGTCGA	TCAAAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCT
cangulata	GTTGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
crivularis	TTCGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
cnippona	TTTGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGCTA-----	-----	-----
cbelcheri	TTTGACCCGA	TCATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACA-	-----
cariakensis	TTTGACCCGA	TTATATTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCTT
cvirginica	TTTGACCTGA	CTTCATTCCA	TCATATGAAA	AGTTACTCCG	GGGATAACAG	GCCAAATCCTC
saccostrea	GTAGACCCGG	-CAAGTCCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTTATCTAT
ostrea_edu	ATAGACCCGA	-CAATGTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCAC
ostrea_con	GTAGACCCGA	-CATTGTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCAC
teskeyostr	GTAGACCCGA	-CAATGTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCAC
ostrea_lur	GTAGACCCGA	-CATTGTCGA	TCATAGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTAATCCAC
saccostrea	GTAGACCCGG	-CAAGTCCGA	TCATGGGAGA	AGTTACGCCG	GGGATAACAG	GCTTATCCAT

	365	375	385	395	405	415
cgigas	TAGTAGAGTT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATAATAG
cgigas4	TAGTAGAGTT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATAATAG
cgigas5	TAGTAGAGTT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATAATAG
cgigas3	TAGTAGAGTT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATAATAG
cbrasilian	TAGTAAAGCT	CGTATTAAC	AAAGGGCTTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATTATAG
cbrasilian	TAGTAAAGCT	CGTATTAAC	AAAGGGCTTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATTATAG
cbrasilian	TAGTAAAGCT	CGTATTAAC	AAAGGGCTTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATTATAG
cbrasilian	TAGTAAAGCT	CGTATTAAC	AAAGGGCTTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATTATAG
cbrasilian	TAGTAAAGCT	CGTATTAAC	AAAGGGCTTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATTATAG
crhizophor	TAGTAAAGTT	CGTATTAAC	AAAGGGCTTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATTATAG
crhizophor	TAGTAAAGTT	CGTATTAAC	AAAGGGCTTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATTATAG
chongkong	TAGTAGAGCT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAG
csimakea	TAGTAGAGTT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAG
ccortezien	TAGTAAAGCT	CGTATTAAC	AAAGGGCTTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATTATAG
cangulata	TAGTAGAGCT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAG
crivularis	TAGTAGAGCT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAG
cnippona	-----	-----	-----	-----	-----	-----
cbelcheri	-----	-----	-----	-----	-----	-----
cariakensis	TAGTAGAGTT	CGTATTGGCT	AAAGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAG
cvirginica	TATTAAGTT	CGT-TTAACT	ACAGG-CTTG	GCACCTCCTA	TGTTAAATCG	GATAATACC-
saccostrea	TAGTAGAGCT	CGTATTGGCT	AATAGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	AGGATGATAA
ostrea_edu	TAGTAGAGAA	CGTATTGGCT	AGTGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAC
ostrea_con	TAGTAGAGAA	CGTATTGGCT	AGTGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAC
teskeyostr	TAGTAGAGAA	CGTATTGGCT	AGTGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAT
ostrea_lur	TAGTAGAGAA	CGTATTGGCT	AGTGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	GGGATGATAC
saccostrea	TAGTAGAGCT	CGTATTGGCT	AATGGGATTG	GCACCTCG-A	TGTTGAATCA	AGGATGATAG

	425	435	445	455	465	.
cgigas	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GAA-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
cgigas4	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GAA-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
cgigas5	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GAA-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
cgigas3	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GAA-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
cbrasilian	CTTCAAGGCG	TAGATGCTTT	GATTAGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTGAAACC	-
cbrasilian	CTTCAAGGCG	TAGATGCTTT	GATTAGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTGAAACC	-
cbrasilian	CTTCAAGGCG	TAGATGCTTT	GATTAGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTGAAACC	-
cbrasilian	CTTCAAGGCG	TAGATGCTTT	GATTAGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTGAAACC	-
cbrasilian	CTTCAAGGCG	TAGATGCTTT	GATTAGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTGAAACC	-
crhizophor	CTTTAAGGCG	TAGAAGCTTT	AGTGAGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
crhizophor	CTTTAAGGCG	TAGAAGCTTT	AGTGAGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
chongkong	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GAG-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
csimakea	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GA-----	-----	-----	-
ccortezien	CTTCAGGGCG	TAGACGCTTT	GACTA-----	-----	-----	-
cangulata	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GAG-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTT-----	-
crivularis	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GAG-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
cnippona	-----	-----	-----	-----	-----	-
cbelcheri	-----	-----	-----	-----	-----	-
cariakensis	CTTCAAGGCG	TAGAGGCTTT	GAA-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
cvirginica	CTTTANCGCT	TATAAACCTT	-----	-----	-----	-
saccostrea	CTTTAAGGCG	TAGAGGCTTT	AAA-AGTGGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
ostrea_edu	CTCTAAGGCG	TAGAAGCTTT	GGA-AGTGGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
ostrea_con	CTTTAAGGCG	TAGAAGCTTT	AAA-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
teskeyostr	CTTTAAGGCG	TAGAAGCTTT	AAA-AGTGGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
ostrea_lur	CTTTAAGGCG	TAGAAGCTTT	AAA-AGTAGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-
saccostrea	CTCTAAGGCG	TAGAGGCTTT	AGA-AGTGGG	TCTGTTCGAC	CTTTAATACC	-