

VARIABILIDADE GENÉTICA DE OSTRAS COLETADAS NO ESTUÁRIO DO RIO SUBAÉ, SÃO FRANCISCO DO CONDE - BA

Ana Cleusa Santana Daltro, Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida, Sabrina Baroni, Ricardo Franco Cunha Moreira, Soraia Barreto Aguiar Fonteles, Norma Suely Evangelista Barreto

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CCAAB, 44380-000, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.
anacsdaltro@yahoo.com.br; darciluciac@yahoo.com.br

O presente estudo objetivou avaliar a variabilidade genética das espécies de ostras extraídas do rio Subaé, município de São Francisco do Conde – BA. Um total de 119 indivíduos do gênero *Crassostrea* (Sacco, 1897), foram coletados em quatro amostragens ao longo do estudo. Oito *primers* de ISSR diferentes foram utilizados para testes preliminares: (GGAC)₄, (GGAT)₄, (AAGC)₄, (TAGG)₄, (GACA)₄, (AACC)₄, (GGGT)₄ e (CACT)₄. Destes, quatro foram informativos para as análises: (GGAT)₄, (GGAC)₄, (GACA)₄ e (AACC)₄. Foram utilizados dados da matriz de dissimilaridade genética e método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Todos os *primers* se mostraram polimórficos, com exceção do *primer* (GACA)₄, que se apresentou monomórfico. Foi observada a presença de 34 bandas, das quais 75% foram consideradas polimórficas, com uma média de 8,5 bandas por *primer*. A partir do ponto de corte com base na média (0,69) das distâncias da matriz de agrupamento dos dados quantitativos, foram formados cinco grupos, dentre os quais, os grupos III e IV apresentaram maior semelhança (0,7) e os grupos I, II e V, maior distância genética (0,6). Os *primers* utilizados neste estudo não apresentaram bons resultados para a identificação de espécies do gênero *Crassostrea*, porém, identificaram uma alta variabilidade genética nos indivíduos.

Palavras-chave: diversidade genética, *Crassostrea*, caracterização, maricultura

Genetic variability of oysters collected from the Subaé River estuary, São Francisco do Conde - BA. This study aimed at evaluating the genetic variability of the species of oysters taken from the Subaé River, municipality of São Francisco do Conde - BA, Brazil. A total of 119 specimens of the genus *Crassostrea* (Sacco, 1897), were collected in four samples throughout the study. Eight different ISSR primers were used for preliminary tests: (GGAC)₄, (GGAT)₄, (AAGC)₄, (TAGG)₄, (GACA)₄, (AACC)₄, (GGGT)₄ e (CACT)₄. Of these, four were informative for analysis: (GGAT)₄, (GGAC)₄, (GACA)₄ e (AACC)₄. We used data from genetic dissimilarity matrix through which indexes were obtained by UPGMA method. For the analysis we used data from the matrix of genetic dissimilarity and the UPGMA method. All primers showed polymorphic, with the exception of the primer (GACA)₄, which showed monomorphic. It was observed the presence of 34 bands, of which 75% were considered polymorphic, with an average of 8.5 bands per primer. From the cutoff point based on the average at a cutoff based on the average (0,69) of the distance matrix of data grouping quantitative five groups were formed, among them, the groups III and IV have higher similarity (0.7) and the groups I, II and V, the greater the genetic distance (0.6). The primers used in this study did not show good results for identification of species of the genus *Crassostrea*, however, identified a high genetic variability among individuals.

Key words: genetic diversity, *Crassostrea*, characterization, mariculture

Introdução

O Brasil possui o maior manguezal contínuo do mundo, estimado em 1,38 milhões de hectares ao longo de 6.800 km de costa, onde se encontram distribuídas as ostras do mangue, nome popular dado às espécies nativas do gênero *Crassostrea*, no entanto, sua distribuição e o número de espécies ainda não foram elucidados (Varela et al., 2007). A *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e a *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) foram inicialmente identificadas nos manguezais do Atlântico na América do Sul. Estudos propõem que estas duas espécies sejam sinônimas, e que ainda, todos os morfotipos brasileiros *Crassostrea* são sinônimas de *Crassostrea rhizophorae* (Melo et al., 2010).

Esses moluscos bivalves podem ser encontrados aderidos a substratos duros, como as raízes de mangues e rochas na zona entremarés, caracterizando-se por uma plasticidade fenotípica extensa, de forma que durante o seu crescimento, suas conchas refletem o regime das marés e/ou a natureza do substrato. Sendo assim, apenas a utilização da morfologia apresenta-se insuficiente para a taxonomia e identificação dos indivíduos (Varela et al., 2007; Buitrago et al., 2009).

A correta identificação das espécies de ostra do gênero *Crassostrea* e suas distribuições são de suma importância para o cultivo e colheita nas populações nativas. A *Crassostrea rhizophorae* destaca-se, pois é cultivada em várias regiões do litoral brasileiro. O cultivo de ostras (ostreicultura) é um sistema de aquicultura ecológico simples, economicamente rentável, gerador de emprego, que pode promover a preservação e manutenção dos recursos naturais favorecendo a fixação das comunidades tradicionais costeiras em seus locais de origem (Varela et al., 2007; Legat et al., 2008).

Acredita-se que a sobrevivência de populações de *Crassostrea* pode estar sendo ameaçada pelas insuficientes informações quanto à distribuição das larvas e sua abundância, assim como da estrutura genética destes indivíduos e seu fluxo gênico. A preservação das espécies depende do comportamento do fluxo gênico intra e interpopulacional e da estrutura genética populacional, fatores que refletem a heterogeneidade, riqueza genética e saúde das populações sobre as regiões geográficas (Romero e Cetina, 2011).

Segundo Mاتيoli e Passos-Bueno (2012), o desenvolvimento da técnica molecular de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, Polymerase Chain Reaction) aumentou muito a eficiência de detecção de polimorfismos no nível do DNA ou RNA, traduzida em redução de tempo de execução dos experimentos, de seu custo e da sua complexidade.

Atualmente existem muitas metodologias para a descrição da variabilidade genética e análises moleculares. Dentre estas análises, uma das técnicas utilizadas é ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), que consiste na amplificação do DNA por PCR em presença de um oligonucleotídeo complementar para um microsatélite designado. Cada faixa corresponde a uma sequência de DNA delimitada por dois microsatélites invertidos. As sequências-alvo dos ISSRs são abundantes ao longo do genoma de eucariontes e evoluem rapidamente, bem como têm provado serem úteis dentro de populações de estudos genéticos, destacando-se em detecção clonal, diversidade e revelação de indivíduos proximamente relacionados (Souza et al., 2005).

A utilização de marcadores moleculares, aliada ao manejo reprodutivo adequado, pode contribuir para a redução da endogamia em programas de melhoramento genético (Moreira et al., 2007), ações de suma importância, a partir do momento em que a variabilidade genética é a responsável pela capacidade de adaptação de espécies marinhas a mudanças que ocorrem em seu habitat (Hilsdorf et al., 2002).

Com isso, objetivou-se avaliar a variabilidade genética das espécies de ostras extraídas do município de São Francisco do Conde - BA, no intuito de conhecer e identificar as populações locais, de forma a obter um melhor embasamento científico para propor o uso consciente dos recursos pesqueiros e uma maricultura de forma sustentável.

Material e Métodos

Coleta das amostras

Um total de 119 exemplares de ostras do gênero *Crassostrea* foram coletados de raízes de árvores do mangue em quatro amostragens durante o período estudado, em bancos naturais georreferenciados (Tabela 1). Estes dados de georreferenciamento foram utilizados na elaboração de um mapa (Figura 1) e na obtenção das distâncias entre os pontos de coleta

(Tabela 2). Após as coletas, o material foi encaminhado para o laboratório de Ictiogenética no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura (NEPA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Para cada indivíduo foi retirada uma porção de

aproximadamente 1 cm² do músculo adutor. Esse material foi devidamente colocado em microtubos, identificado, rotulado, estocado em álcool etílico absoluto, na proporção de 1:3 e armazenado em temperatura de 6°C.

Tabela 1. Georreferenciamento dos pontos de coleta dos espécimes amostrados no estuário do rio Subaé, São Francisco do Conde - Bahia, durante o período de outubro de 2010 a janeiro de 2012

Pontos de coleta das ostras	Coordenadas Geográficas
Ponto 01	S 12° 34' 09.0" / W 38° 41' 32.3"
Ponto 02	S 12° 35' 56.72" / W 038 42' 01.76"
Ponto 03	S 12° 36' 12.6" / W 038° 42' 01.5"
Ponto 04	S 12° 36' 07.7" / W 038° 42' 01.6"

Tabela 2. Distância entre os pontos de coleta de ostras no estuário do rio Subaé no município de São Francisco do Conde - Bahia

Relação entre os pontos de coleta	Distância
Ponto 01 ao ponto 02	3.428 m
Ponto 02 ao ponto 04	337 m
Ponto 04 ao ponto 03	151 m

Extração e quantificação de DNA

Todo o material amostrado foi dividido em duas porções: a primeira destinada à formação de um banco de tecidos e a segunda destinada às extrações do DNA genômico.

O DNA total dos exemplares foi extraído de acordo com o protocolo fenol:clorofórmio descrito por Sambrook, Sambrook et al. (1989). O DNA foi estocado em tapão TE e posteriormente estocadas em freezer a -20°C. A concentração e a qualidade do DNA isolado foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,4%, corado com brometo de etídio (1,5 µL). Para a corrida eletroforética foi utilizado 70 V e 500 mA, por 45 minutos. A foto-documentação do gel foi efetuada através do transluminador UV L.PIX Loccus Biotecnologia – Molecular Imaging acoplado a um computador contendo o Software com o mesmo nome, obtendo-se desta forma a concentração em ng/

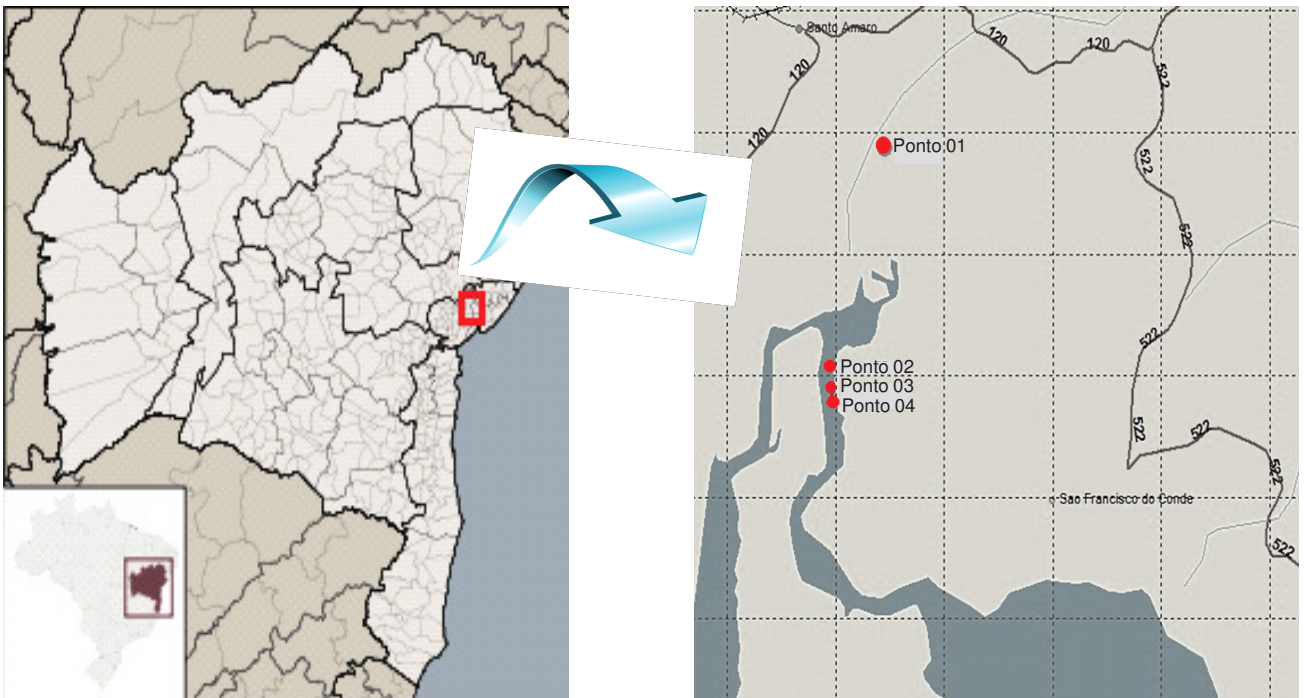


Figura 1. Mapa do município de São Francisco do Conde - Bahia, com os pontos de coleta das ostras.

il a partir da quantificação visual, utilizando-se um programa Excel com dados fixos.

Para a amplificação do DNA, foram utilizadas as amostras (Tabela 3) em que o DNA se encontrava mais íntegro e de qualidade.

Tabela 3. Indivíduos amostrados por ponto de coleta no estuário do rio Subaé, no município de São Francisco do Conde - Bahia

Pontos de coleta	Indivíduos amostrados
Ponto 01	15
Ponto 02	23
Ponto 03	35
Ponto 04	46

Caracterização molecular das ostras

O DNA total foi submetido às amplificações pela reação em cadeia de polimerase (PCR), empregando-se primers tetranucleotídicos de sequência repetitiva simples (ISSR - Inter Simple Sequence Repeats), o qual foi selecionado a partir de testes preliminares com um total de oito primers diferentes, a saber: (GGAC)₄, (GGAT)₄, (AAGC)₄, (TAGG)₄, (GACA)₄, (AACC)₄, (GGGT)₄ e (CACT)₄. Dos primers testados, quatro foram informativos para as análises: (GGAT)₄, (GGAC)₄, (GACA)₄ e (AACC)₄. O DNA molde (20 ng) foi amplificado, em um volume final de 30 μ L contendo 20 ng de DNA genômico, 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,3 μ M do iniciador e 1,0 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). A amplificação foi realizada em termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler. Os programas utilizados para cada primer foram ilustrados nas Tabelas 4, 5 e 6. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 2,0%, em tampão TBE 1x, corados com 3 μ L de brometo de etídio. A eletroforese ocorreu com voltagem de 50 V e 400 mA, por duas horas e 30 minutos. A visualização dos padrões foi realizada sob luz ultravioleta e os géis fotografados em sistema de fotodocumentação de gel.

Análise estatística dos dados

Foi efetuada a avaliação das bandas de ISSR reprodutíveis como ausente (0) ou presente (1) para cada um dos indivíduos analisados. O loco foi considerado polimórfico quando o alelo foi visualizado

em uma frequência não superior a 0,99. As diferenças de acordo com a qualidade na intensidade das bandas não foram consideradas. Para a caracterização molecular dos espécimes trabalhados, foi calculada a distância de Jaccard. Os agrupamentos hierárquicos das análises a partir das matrizes de distância genética foram obtidos pelos métodos de UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (Sneath e Sokal, 1973) e gerados pelo programa de computador Genes. Os dendrogramas foram obtidos pelo programa Statistica (Statsoft, 2005)

Tabela 4. Programa de amplificação do DNA para o primer (GGAT)₄

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1
Amplificação	—	—	—
Desnaturação	94°C	40 segundos	30
Anelamento	62°C	40 segundos	
Extensão	72°C	1 minuto	
Extensão final	72°C	4 minutos	1
Resfriamento	8°C	Indeterminado	—

Tabela 5. Programa de amplificação do DNA para os primers (GGAC)₄ e (AACC)₄

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1
Amplificação	--	--	--
Desnaturação	94°C	40 segundos	30
Anelamento	60°C	40 segundos	
Extensão	72°C	1 minuto	
Extensão final	72°C	4 minutos	1
Resfriamento	8°C	Indeterminado	--

Tabela 6. Programa de amplificação do DNA para o primer (GACA)₄

Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 minutos	1
Amplificação	—	—	—
Desnaturação	94°C	40 segundos	30
Anelamento	48°C	40 segundos	
Extensão	72°C	1 minuto	
Extensão final	72°C	4 minutos	1
Resfriamento	8°C	Indeterminado	—

Resultados

Todos os primers se mostraram polimórficos apresentando de 8 a 11 bandas, com exceção do primer (GACA)₄ que apresentou monomorfismo com apenas uma banda, podendo estar relacionado á alguma característica específica.

A maioria (34,45%) dos exemplares amostrados nos pontos 1, 2, 3 e 4 (grupo III e IV) apresentou uma maior similaridade genética, com exceção de quatro exemplares, três do ponto 1 e um do ponto 2, que apresentaram uma maior distância genética.

No primer (GGAT)₄ (Figuras 2 e 3), três indivíduos (3, 4 e 19) não apresentaram padrões de alelos específicos para o marcador, no entanto, os indivíduos amostrados apresentaram elevado polimorfismo. Com relação ao primer (GGAC)₄ (Figuras 4 e 5), os indivíduos de números 01, 02, 03, 18, 25, 26, 33, 35 e 38 não apresentaram padrões de bandejamento, entretanto, também foi visualizado expressivo polimorfismo, assim como no primer (AACC)₄ (Figuras 6 e 7). Nos primers (GGAC)₄ e (AACC)₄ foram observados os indivíduos com maior número de alelos (11). O primer (GACA)₄ (Figuras 8 e 9) se mostrou monomórfico, exceto para os indivíduos de números 02, 04, 15 e 28.

Os loci polimórficos presentes em três dos quatro marcadores do estudo, foram destacados pelos resultados da análise estatística, efetuado por meio da matriz de distância genética, que por sua vez foi gerada pelo programa Genes e o dendrograma (Figura 10) no programa Statistica.

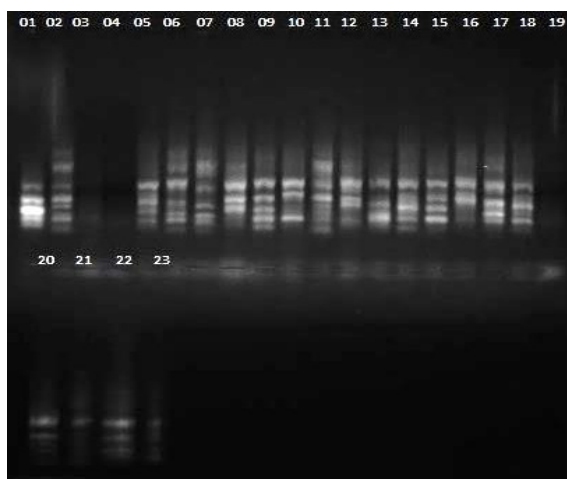


Figura 2. Produto da amplificação de DNA utilizando o primer (GGAT)₄ nos indivíduos amostrados nos pontos de coleta 1 e 2.

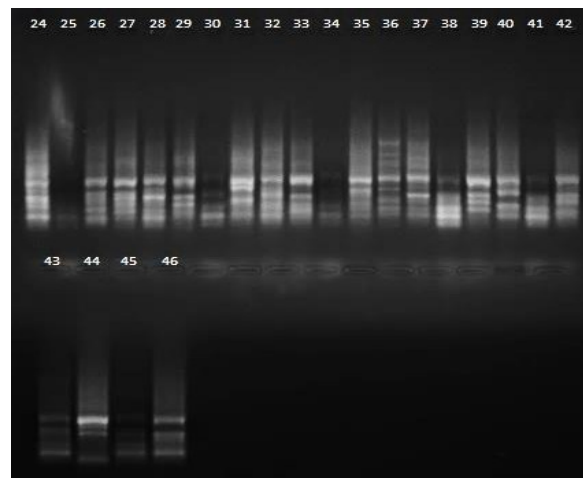


Figura 3. Produto da amplificação de DNA utilizando o primer (GGAT)₄ nos indivíduos amostrados nos pontos de coleta 3 e 4.

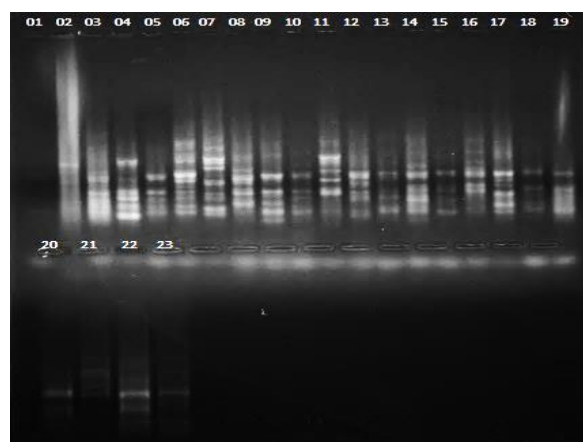


Figura 4. Produto da amplificação de DNA utilizando o primer (GGAC)₄ nos indivíduos amostrados nos pontos de coleta 1 e 2.

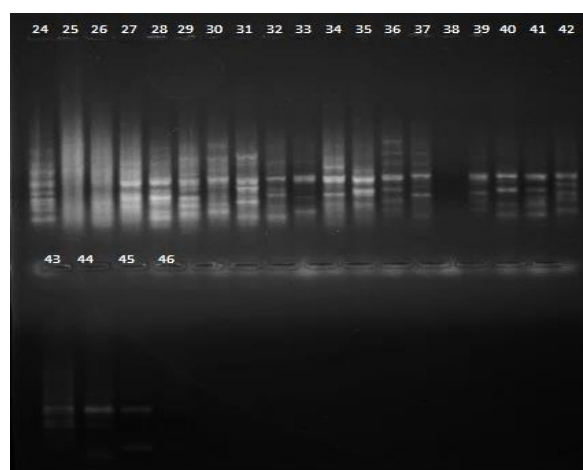


Figura 5. Produto da amplificação de DNA utilizando o primer (GGAC)₄ nos indivíduos amostrados nos pontos de coleta 3 e 4.

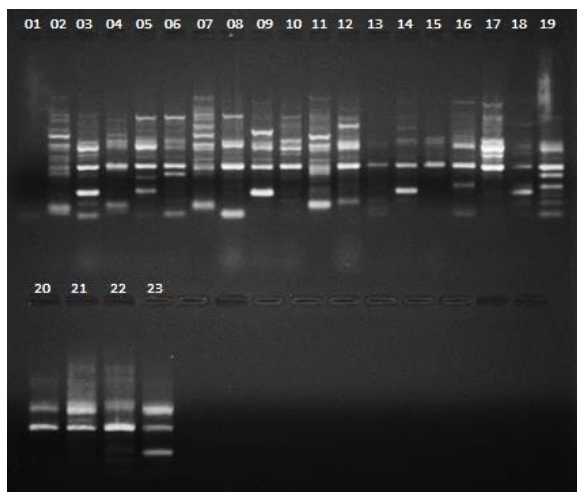


Figura 6. Produto da amplificação de DNA utilizando o primer $(AACC)_4$ nos indivíduos amostrados nos pontos de coleta 1 e 2.

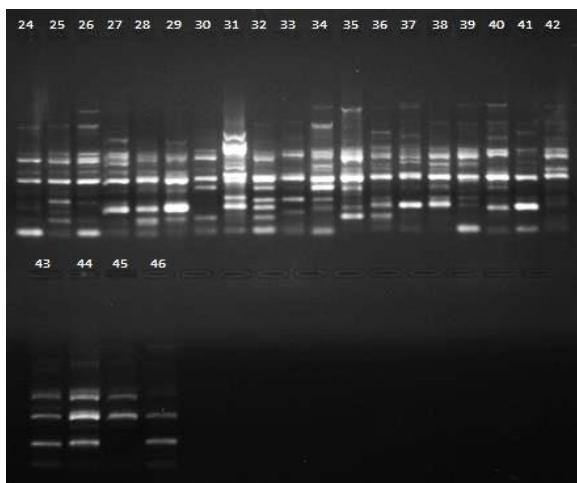


Figura 7. Produto da amplificação de DNA utilizando o primer $(AACC)_4$ nos indivíduos amostrados nos pontos de coleta 3 e 4.

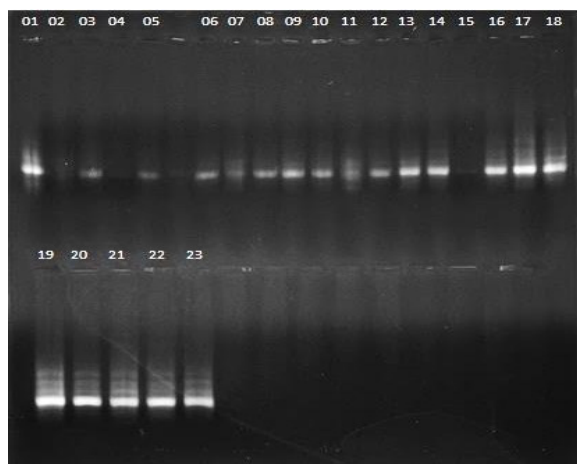


Figura 8. Produto da amplificação de DNA utilizando o primer $(GACA)_4$ nos indivíduos amostrados nos pontos de coleta 1 e 2.

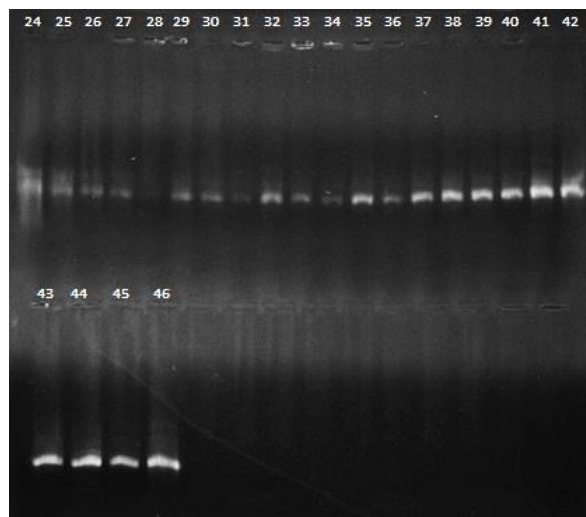


Figura 9. Produto da amplificação de DNA utilizando o primer $(GACA)_4$ nos indivíduos amostrados nos pontos de coleta 3 e 4.

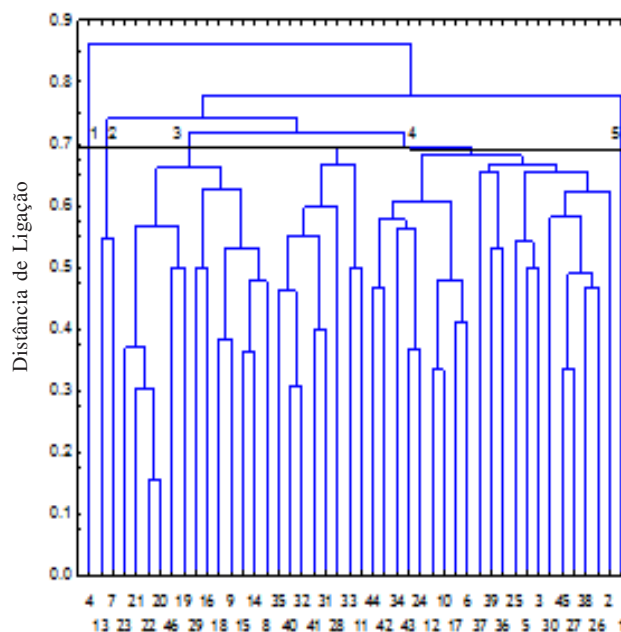


Figura 10. Dendrograma construído com base nas medidas de dissimilaridades genéticas de dados moleculares de 46 indivíduos de *Crassostrea* sp. obtido pelo método UPGMA com base na distância generalizada de Jaccard.

Com a utilização dos quatro primers de ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) selecionados, foi observada a presença de um total de 34 bandas, das quais 75% foram consideradas polimórficas, com uma média de 8,5 bandas por primer. O número de alelos gerados por primer variou entre um e 11, sendo para aqueles primers polimórficos, esse número variou de 8 a 11.

Através da matriz de dissimilaridade foram obtidos os índices pelo método de agrupamento UPGMA, em que foi realizada uma comparação dentre os fenótipos e retirada uma média ponderada com base no coeficiente de Jaccard. O coeficiente de dissimilaridade dos 46 indivíduos variou de 0,33 a 1,0. A distância genética mais alta (0,33) foi observada nos indivíduos 27 e 45, enquanto a distância genética mais baixa (1,0) foi representada nos indivíduos 1 e 4.

A partir do ponto de corte (Mingoti, 2005) com base na média (0,69) das distâncias da matriz (Figura 10) de agrupamento dos dados quantitativos, foram formados cinco grupos, apresentados na tabela 7, onde os grupos III e IV apresentam maior semelhança (0,7) e os grupos I, II e V, maior distância genética (0,6).

O grupo III é composto por 13 indivíduos coletados no ponto dois, enquanto que o grupo IV apresentou um maior número de indivíduos que os grupos um, dois e cinco (Tabela 7).

Tabela 7. Relação dos grupos de indivíduos coletados no estuário do rio Subaé, no município de São Francisco do Conde, definidos pela matriz de agrupamento dos dados quantitativos

Grupos				
I	II	III	IV	V
4	7,13	8, 9, 14, 15, 16, 18,19, 20, 21, 22, 23, 29,46	2, 3, 5, 6, 10, 11, 12, 17, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45	1

Discussão

Com os primers utilizados neste estudo não foi possível encontrar padrões espécie-específico para a correta identificação dos exemplares do gênero *Crassostrea* amostrados no estuário do rio Subaé, porém, identificaram uma alta variabilidade genética.

Todos os primers utilizados neste estudo se mostraram polimórficos e resultado semelhante foi encontrado na China por Li, Yu e Yu. (2006), onde foram estudadas cinco populações de ostra do Pacífico (*Crassostrea gigas*) de cultivos, utilizando sete loci microssatélites e todos foram altamente polimórficos, com o grau de variabilidade diferente em cada locus.

Li e Kijima (2002) isolaram nove microssatélites em ostras *Crassostrea gigas* no Japão, porém quatro

se mostraram altamente polimórficos, sendo que o grau de variabilidade foi diferente em cada locus.

No estudo com ostras de nove locais da costa brasileira utilizando a amplificação do DNA mitocondrial (16S rRNA), polimorfismos foram detectados em 155 locais e 112 destes eram informativos para parcimônia (Varela et al., 2007).

Com o primer (GACA)⁴ foi possível visualizar um padrão de bandejamento que pode significar uma característica específica. Entretanto, essa baixa variabilidade genética se torna prejudicial, pois, aumenta a possibilidade de originar distorções morfológicas nos indivíduos ou enfermidades que podem ocasionar a mortalidade da população inteira.

Semelhante resultado com relação ao monomorfismo, teve a pesquisa de Melo et al. (2010), ao utilizarem o sistema de diagnóstico ITS-2 e 16S no estudo de ostras *Crassostrea* spp., encontrando três padrões genéticos distintos que correspondiam às três espécies *Crassostrea rhizophorae*, *C. brasiliiana* e *C. gigas*, com variação intraespecífica baixa em todas as espécies, sendo que as *C. rhizophorae* e as *C. brasiliiana* foram monomórficas.

O ponto de coleta um foi o mais afastado entre todos os pontos, possuindo uma distância de 3.428 m até o ponto dois (Tabela 2). Do ponto dois ao ponto quatro a distância é de 337 m e do ponto três ao ponto quatro, 151 m. Isso se deve provavelmente pelo fato de as ostras se reproduzirem com a liberação de óvulos e espermatozoides na água pelas fêmeas e pelos machos respectivamente. Os óvulos quando fecundados eclodem dando início a fase larval, pelágica, movimentando-se através das correntes, que possibilitam o deslocamento dos indivíduos do ponto um até os pontos dois, três e quatro.

A fase larval pode ser resultado da adaptação à dispersão e seleção de habitat, enquanto a fase adulta representa especialização em crescimento e reprodução. Esta metamorfose é de suma importância na mudança e adequação no nicho ecológico (Taris et al., 2006).

Os grupos I, II e V foram compostos basicamente, por indivíduos coletados no ponto um, local com um nível elevado de poluição, caracterizado pela presença de descarga de esgoto doméstico e industrial no estuário, com acentuada presença de lixo. Esses fatores podem desencadear modificações no habitat natural das ostras, que a partir de um mecanismo

adaptativo de sobrevivência pode tornar-se geneticamente variáveis, desencadeando assim, uma maior distância genética.

A variação genética e a taxa de crescimento de diversas populações da ostra do mangue no litoral brasileiro merecem estudos aprofundados, sendo de relevância a possibilidade de existência de uma segunda espécie (*C. brasiliiana*), com crescimento bastante superior à ostra comum (*C. rhizophorae*), isso permite incrementar a produtividade em cultivos e solidificar a atividade, gerando novas oportunidades de empregos (Legat et al., 2009).

Contudo, a realização de novos estudos com as espécies do gênero *Crassostrea* presentes no estuário do rio Subaé, efetuando maior amostragem (tanto em número de genótipos, como em locais) e com mais primers ISSR a fim de genotipar melhor os indivíduos e/ou populações, é de suma importância para a aquisição de informações que auxiliarão programas de monitoramento das populações, permitindo a preservação do potencial genético dos exemplares dos bancos estudados, bem como, permitir a estabilidade da população ribeirinha que utiliza esse recurso como principal fonte de subsistência.

Conclusão

Os primers utilizados na técnica ISSR para estudo dos indivíduos não foram informativos para a identificação e caracterização de espécies do gênero *Crassostrea*, porém, os resultados informaram uma elevada variabilidade genética nas populações amostradas em São Francisco do Conde, Bahia.

Agradecimentos

Os autores expressam agradecimentos ao CNPq pela bolsa de Mestrado da primeira autora e a CAPES pela concessão de bolsa Pós Doutorado à segunda autora.

Literatura Citada

- BUITRAGO, E. et al. 2009. Identificación de factores que afectan al crecimiento y la supervivencia de la ostra de mangle, *Crassostrea rhizophorae* (Goulding, 1828), bajo condiciones de cultivo suspendido en la laguna de La Restinga, Isla de Margarita, Venezuela. *Zootecnia Tropical* 27(1):79-90.
- HILSDORF, A. W. S. et al. 2002. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture* 214:81-91.
- LEGAT, J. F. A. et al. 2008. Programa de Cultivo de Moluscos Bivalves da Embrapa Meio-Norte. Teresina, PI, Embrapa Meio Norte. 20p.
- LEGAT, A. P. et al. 2009. Caracterização genética de ostras nativas do gênero *Crassostrea* no Brasil: base para o estabelecimento de um programa nacional de melhoramento. Teresina, PI, Documentos Embrapa Meio-Norte, 192. 21 p.
- Li, Q.; KIJIMA, A. 2002. Identification of novel microsatellite loci in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) by magnetic bead hybridization selection. *Tohoku Journal of Agricultural Research* 53 (1-2):53.
- Li, Q.; YU, H.; YU, R. 2006. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture* 259:95-102.
- MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. 2012. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: Matioli, S. R.; Fernandes, F.M.C. org. *Biologia molecular e evolução*. 2 ed. Ribeirão Preto, Holos, Editora. pp.181-190.
- MELO, C. M. R. et al. 2010. *Crassostrea gigas* in natural oyster banks in southern Brazil. *Biological Invasions* 12: 441-449.
- MINGOTI, S. A. 2005. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. Belo Horizonte, MG, Editora UFMG. 295p.
- MOREIRA, A. A. et al. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(4):521-526.
- ROMERO, F. R.; CETINA, J. T. 2011. Discontinuidad geográfica y variabilidad genética en *Crassostrea rhizophorae* guilding del sureste de México. México, Universidad y Ciencia, Villahermosa, 27(1):71-83.
- SAMBROOK, J. H.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. 2ª ed., cold spring harbor.
- SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. 1973. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco, W. H. Freeman. 573p.
- STATSOFT, INC. 2005. *Statistica (data analysis software system)*. Version 7.1. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 12/12/2014.
- SOUZA, V. Q. de. et al. 2005. Dissimilaridade genética em mutantes de aveia tolerantes e sensíveis a ácidos orgânicos. *Bragantia (Brasil)* 64(4):569-575.
- TARIS, N. et al. 2006. Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333:147-158.
- VARELA, E. S. et al. 2007. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. *Journal of Molluscan Studies* 73:229-234.