

Documentos

ISSN 0104-866X
Maio, 2009

192

Caracterização genética de ostras nativas do gênero *Crassostrea* no Brasil: base para o estabelecimento de um programa nacional de melhoramento



ISSN 0104-866X

Maio, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 192

Caracterização genética de ostras nativas do gênero *Crassostrea* no Brasil: base para o estabelecimento de um programa nacional de melhoramento

*Angela Puchnick Legat
Jeudys Araújo de Oliveira
Cristiano Valentim da Silva Lazoski
Antônio Mateo Sole-Cava
Cláudio Manoel Rodrigues de Melo
Alfredo Olivera Galvéz*

Embrapa Meio-Norte
Teresina, PI
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio-Norte

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires
Caixa Postal 01
CEP 64006-220 Teresina, PI
Fone: (86) 3089-9100
Fax: (86) 3089-9130
Home page: www.cpamn.embrapa.br
E-mail: sac@cpamn.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Flávio Favaro Blanco*,
Secretária executiva: *Luísa Maria Resende Gonçalves*
Membros: *Paulo Sarmanho da Costa Lima, Fábio Mendonça Diniz, Cristina Arzabe, Eugênio Celso Emérito Araújo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevêdo, Carlos Antônio Ferreira de Sousa, José Almeida Pereira e Maria Teresa do Rêgo Lopes*

Supervisão editorial: *Lígia Maria Rolim Bandeira*
Revisão de texto: *Lígia Maria Rolim Bandeira*
Normalização bibliográfica: *Orlane da Silva Maia*
Editoração eletrônica: *Erlândio Santos de Resende*
Jorimá Marques Ferreira
Fotos: *Jeudys Araújo de Oliveira*

1ª edição

1ª impressão (2009): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Meio-Norte**

Caracterização genética de ostras nativas do gênero *Crassostrea* no Brasil : base para o estabelecimento de um programa nacional de melhoramento / Angela Puchnick Legat ... [et al.]. - Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2009.
21 p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Meio-Norte, ISSN 0104-866X ; 192).

1. Ostricultura. 2. Marcador genético. 3. Seleção genética. 4. Linhagem. 5. Aclimação. 6. Salinidade. I. Legat, Angela Puchnick. II. Embrapa Meio-Norte. III. Série.

CDD 639.41 (21. ed.)

© Embrapa, 2009

Autores

Angela Puchnick Legat

Oceanóloga, M.Sc, pesquisadora da Embrapa Meio-Norte,
Teresina, PI
angelapl@cpamn.embrapa.br

Jeudys Araújo de Oliveira

Biólogo, pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI
jeudys@cpamn.embrapa.br

Cristiano Valentim da Silva Lazoski

Biólogo, Dr., Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ
lazoski@centroin.com.br

Antônio Mateo Sole-Cava

Ecólogo, Ph.D., Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, RJ
sole@centroin.com.br

Cláudio Manoel Rodrigues de Melo

Zootecnista, Dr., Universidade Federal de Santa Catarina,
Florianópolis, SC
cmmelo@cca.ufsc.br

Alfredo Olivera Galvéz

Biólogo, Dr., Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE
alfredo_oliv@yahoo.com

Apresentação

A ostreicultura ou criação de ostras tem-se mostrado uma alternativa rentável em muitos estados brasileiros, porém, pesquisas e ações fazem-se necessárias para otimizar e viabilizar a produção em maior escala. Embora a atividade seja importante para muitas comunidades litorâneas, a caracterização genética das espécies de ostras nativas cultivadas constitui um problema fundamental que tem impedido a sua consolidação. A existência de uma segunda espécie (*Crassostrea brasiliiana*), com crescimento bastante superior à ostra comum (*C. rhizophorae*), pode incrementar a produtividade dos cultivos e solidificar a atividade, produzindo novos empregos e promovendo o desenvolvimento das regiões de cultivo.

O elevado potencial da ostreicultura como atividade socioeconômica para as regiões Norte e Nordeste do Brasil, a ocorrência da espécie *C. brasiliiana* em abundância na região do Delta do Parnaíba, Meio-Norte do Brasil, e a pré-disposição das comunidades em cultivar ostras nativas levaram a Embrapa Meio-Norte, por meio do seu Núcleo de Pesquisa em Aquicultura e Pesca, a compor uma Rede Nacional de Pesquisa em Ostras com o objetivo de realizar a caracterização genética de ostras nativas do gênero *Crassostrea*, utilizando marcadores de DNA, e estabelecer um programa de melhoramento genético por meio da seleção de linhagens adaptadas a diferentes condições ambientais, principalmente em termos de temperatura e salinidade.

Dentro dessa rede de pesquisa, uma sub-rede formada pela Embrapa Meio-Norte, Universidade Federal do Rio de Janeiro e Universidade Federal Rural de Pernambuco é responsável pela caracterização de todos os reprodutores

destinados à produção das famílias que posteriormente serão selecionadas e testadas a campo para desempenho de crescimento e sobrevivência.

Neste documento, descrevem-se os procedimentos operacionais padronizados, necessários para a coleta e diferenciação genética de espécies de ostras nativas do gênero *Crassostrea* utilizando marcadores moleculares de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP).

Hoston Tomás Santos do Nascimento
Chefe-Geral da Embrapa Meio-Norte

Sumário

Caracterização genética de ostras nativas do gênero <i>Crassostrea</i> no Brasil: base para o estabelecimento de um programa nacional de melhoramento	9
Introdução	9
Coleta e preparação das amostras de ostras	13
Caracterização genética das espécies de ostras	15
Extração de DNA	15
Procedimento	16
Reações de amplificação de DNA por meio da PCR	17
Reações de digestão de fragmentos de DNA por enzimas de restrição	18
Análise dos fragmentos de restrição	18
Referências	19

Caracterização genética de ostras nativas do gênero *Crassostrea* no Brasil: base para o estabelecimento de um programa nacional de melhoramento

Angela Puchnick Legat
Jeudys Araújo de Oliveira
Cristiano Valentim da Silva Lazoski
Antônio Mateo Sole-Cava
Cláudio Manoel Rodrigues de Melo
Alfredo Olivera Galvéz

Introdução

O cultivo de ostras ou ostreicultura tem crescido rapidamente no Brasil e no mundo. A produção nacional de ostras cresceu de 55 toneladas em 1995 para 2 591 toneladas em 2002 (FAO, 2004), concentrando-se principalmente nas regiões Sudeste e Sul. Atualmente, a produção de ostras é de 3.700 toneladas (SUPLICY, 2008). Para que ocorra esta despolarização da malacocultura das regiões Sul-Sudeste para o Norte-Nordeste, é imprescindível a exploração de ostras dos bancos naturais, como as espécies *Crassostrea brasiliiana* e *C. rhizophorae* (Fig. 1), cuja produção ainda é incipiente no país pela preferência em se cultivar a espécie exótica *C. gigas*, introduzida na região-pólo na década de 70. A criação de ostras é considerada um sistema de aquicultura ecológica simples, economicamente rentável, gerador de empregos, que promove a preservação e a manutenção dos recursos naturais marinhos e possibilita a fixação de comunidades tradicionais costeiras em seus locais de origem, contribuindo para o desenvolvimento local sustentável. Por isso, tem um grande potencial como atividade socioeconômica para as regiões Norte e Nordeste do Brasil.



Fig. 1. Espécies nativas de ostras cultivadas no Brasil: *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae*, respectivamente.

Embora a ostreicultura seja importante para muitas comunidades litorâneas, a caracterização genética das espécies de ostras cultivadas constitui um problema fundamental que tem impedido a consolidação da atividade no Brasil. Segundo Rios (1994), *C. brasiliiana* e *C. rhizophorae* são sinónimas, constituindo, portanto, a mesma espécie. Porém, trabalhos mais recentes demonstram a existência de duas ou mais espécies de ostra do gênero *Crassostrea* nos estuários brasileiros (IGNACIO et al., 2000; LAPEGUE et al., 2002; LAZOSKI, 2004; VARELA et al., 2007). Ignacio et al. (2000) analisaram populações do Paraná e do Rio de Janeiro e demonstraram a diferenciação genética de dois grupos, *C. rhizophorae* e *C. brasiliiana*, além de comprovar as observações de que *C. rhizophorae* ocorre em geral na região entre marés e alcança um tamanho bastante inferior a *C. brasiliiana*, que normalmente ocorre no infralitoral e em fundos lodosos. O estudo de Lazoski (2004) confirmou a presença de *C. brasiliiana* no Nordeste brasileiro e indica uma alta estruturação populacional das espécies de ostra entre as regiões Norte e Sudeste. Esse resultado abre novas possibilidades na área de aquicultura uma vez que as diferenças ecológicas e fisiológicas entre as espécies ainda não estão bem estabelecidas.

A grande variação genética e a taxa de crescimento de diversas populações da ostra do mangue no litoral brasileiro merecem estudos aprofundados, uma vez que podem ser cruciais para o sucesso dos cultivos. A existência de uma segunda espécie (*C. brasiliana*), com crescimento bastante superior à ostra comum (*C. rhizophorae*), pode incrementar a produtividade dos cultivos e solidificar a atividade, produzindo novos empregos e promovendo o desenvolvimento das regiões de cultivo, além de permitir a exportação da tecnologia desenvolvida para outras regiões do país.

Diversas técnicas moleculares têm sido amplamente aplicadas em estudos de genética pesqueira e cultivo de organismos marinhos em diferentes países (CARVALHO; PITCHER, 1995; FERGUSON; DANZMANN, 1998; THORPE; SOLÉ-CAVA; WATTS, 2000). A vantagem do uso de marcadores moleculares é que os dados obtidos são mais precisos e menos influenciados pelo ambiente que os dados morfológicos tradicionalmente utilizados.

De uma maneira geral, em genética pesqueira são usados marcadores polimórficos para a comparação das frequências gênicas de diferentes populações amostradas ao longo da área a ser explorada (OVENDEN, 1990). Uma das vantagens do conhecimento gerado sobre a genética dessas populações é sua aplicação em sistemas de produção aquícolas (FERGUSON, 1995). Isto é feito, por exemplo, a partir da identificação e caracterização das matrizes que serão usadas como reprodutoras no melhoramento genético e do monitoramento dos níveis de variabilidade genética das populações cultivadas ao longo das gerações (HEDGECOCK; SLY, 1990; VRIJENHOEK; FORD; HASKINS, 1990).

Um outro uso fundamental de marcadores moleculares em aquicultura é na resolução de problemas taxonômicos das espécies cultivadas (THORPE; SOLÉ-CAVA; WATTS, 2000) que, muitas vezes, são de difícil separação (como é o caso de ostras do gênero *Crassostrea*) e, também, para a identificação de ovos e larvas (WARD; GREWE, 1995).

A dificuldade e a demora em diferenciar os estoques misturados podem levar a um erro na identificação das matrizes e, conseqüentemente, uma diminuição da produção (FERGUSON, 1995).

Dentro desse contexto, o projeto “Caracterização genética e melhoramento de ostras nativas do gênero *Crassostrea*”, aprovado na chamada pública MCT/FINEP/CTHIDRO/CT-AGRO/SEAP-PR Aquicultura 12/2005, formou uma Rede Nacional de Pesquisa em Ostras com o objetivo de realizar a caracterização genética de ostras nativas do gênero *Crassostrea*, utilizando marcadores de DNA para obter perfis nos níveis específico e intraespecífico que possam ser utilizados na diferenciação de espécies, na identificação de estágios iniciais de desenvolvimento (larvas e recrutas em sementeiras) e na detecção de variabilidade nas populações associadas às características de cultivo. Além disso, o projeto propõe a implantação de um programa de melhoramento genético por meio da seleção de linhagens adaptadas a diferentes condições ambientais, principalmente em termos de temperatura e salinidade.

A Rede Nacional de Pesquisa em Ostras é coordenada pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e conta com a participação das seguintes instituições de norte ao sul do Brasil: Universidade Federal do Pará (UFPA), Embrapa Meio-Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Universidade Federal da Bahia (UFBA), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Instituto de Pesca de São Paulo, Universidade Federal do Paraná (UFPR) e Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI / Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca – CEDAP).

Uma sub-rede formada por Embrapa Meio-Norte, UFRPE e UFRJ é responsável pela caracterização de todos os reprodutores destinados à produção das famílias que posteriormente serão selecionadas e testadas a campo para desempenho de crescimento e sobrevivência. Dessa forma, a caracterização genética das diferentes espécies e populações de ostra nativa do gênero *Crassostrea* permitirá estimar parâmetros genéticos que direcionarão as estratégias de exploração da variabilidade para maximizar os ganhos de seleção no programa de melhoramento. A produção de famílias e ariculturas será realizada pela UFSC em parceria com a UFRPE e os testes a campo serão conduzidos por todas as instituições da rede, exceto pela UFRJ.

Neste documento, descrevem-se os procedimentos operacionais padronizados, necessários para a coleta e caracterização genética de espécies de ostras nativas do gênero *Crassostrea* utilizando marcadores moleculares de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP).

As coletas de amostras de ostras na costa brasileira são realizadas segundo o protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Maricultura Sustentável da UFRPE. Para cada ostra coletada, as conchas são limpas, fotografadas e enviadas para a análise morfológica, no Laboratório de Moluscos Marinhos da UFSC. Amostras de músculos adutor são acondicionadas em tubos de 2,0 mL contendo etanol absoluto e enviadas para análise genética, no Laboratório de Biotecnologia Aquática da Embrapa Meio-Norte que posteriormente envia amostras de DNA extraídas para os laboratórios da UFRJ e UFRPE. A diferenciação das espécies por meio da análise de DNA é realizada segundo os procedimentos de Lazoski (2004) e do Laboratório de Biodiversidade Molecular da UFRJ.

Coleta e preparação das amostras de ostras

Amostras de indivíduos adultos são coletadas de ambientes naturais com diferentes gradientes de salinidade e substratos. As variáveis consideradas para a escolha dos indivíduos a serem coletados são: substrato de fixação (ostras fixadas em raízes de mangue, em rochas e de vida livre em fundo de lama ou lodo); maré (ostras que habitem a zona de variação de maré e aquelas que ficam constantemente submersas); faixa de comprimento (indivíduos de diferentes comprimentos) e salinidade (áreas com diferentes gradientes de salinidade).

As coletas são realizadas em mais de um ponto numa mesma região, de forma que duas amostras nunca estejam num mesmo substrato comum, por exemplo, numa mesma raiz ou pedra. Após a coleta do animal, registra-se a origem quanto às características do local de coleta e quanto às coordenadas geográficas por meio de um GPS.

A preparação das amostras para a análise genética dá-se em laboratório, por meio dos seguintes procedimentos: as conchas são lavadas,

enumeradas internamente com lápis e fotografadas individualmente. Uma pequena quantidade do músculo adutor é retirada e armazenada a -20 °C em criotubos de 1,5 ml contendo álcool absoluto (Fig. 2 e 3).



Fig. 2. Identificação individual e fotodocumentação das ostras coletadas.



Fig. 3. Preparação e armazenamento das amostras de ostras para a caracterização genética de espécies.

Caracterização genética das espécies de ostras

A caracterização genética das ostras é realizada por meio da análise de fragmentos da região 16S do genoma mitocondrial, que são amplificados por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posteriormente digeridos com a enzima de restrição *Hae III*, resultando em marcadores moleculares de Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP), seguindo os procedimentos de Pie et al. (2006).

A técnica de RFLP usa enzimas de restrição, que cortam o DNA apenas onde existam sítios específicos de nucleotídeos. A enzima *Hae III*, por exemplo, só corta o DNA no sítio correspondente à sequência GG/CC.

O DNA mitocondrial animal é uma molécula circular, de 15-20 kilobases (Kb) de tamanho que possui por volta de 37 genes que codificam para 22 RNAs transportadores, dois RNAs ribossomais e 13 RNAs mensageiros relacionadas a processos de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa (AVISE, 1994) (Fig. 4). Os genes são firmemente compactados na fita dupla de mtDNA e seu arranjo é muito estável (WILSON et al., 1985). A transmissão materna do mtDNA, sem ligação paterna, indica que as trocas mutacionais são mais simples e mais facilmente modeladas do que dentro do DNA nuclear, onde há influência de recombinação gênica (AVISE et al., 1987). Por isso, as observações da diversidade gênica de mtDNA fornecem uma das melhores informações para estudos de caracterização genética.

Extração de DNA

O QIAampr DNA Mini Kit, da Quiagen, é utilizado para a obtenção do DNA das amostras de ostras recebidas no laboratório. O DNA obtido por meio desse protocolo é utilizado para aplicação de inúmeras técnicas moleculares, dentre elas a PCR-RFLP.

Procedimentos

De cada amostra de tecido de ostra que é enviado ao laboratório, corta-se um pequeno pedaço (aproximadamente do tamanho de um grão de arroz) e seca-se em lenços de papel ou em uma placa de Petri para retirar o excesso do etanol. Coloca-se cada pedaço em tubos de 1,5 mL contendo 180 μ l da solução ATL (fornecida no kit) e macera-os com a ajuda de pistilos. Adiciona-se 20 μ l de proteinase K (fornecida no kit), homogeneizando levemente no vortex, e incuba-se a 56 °C por 3 horas, até a dissolução de toda a amostra. Ocasionalmente, durante a incubação, agita-se a amostra 2-3 vezes a cada hora. Feito isso, adicionam-se 4 μ l de RNase A (20 mg/mL), homogeneizando levemente no vortex por 15 segundos e incubando-os por 2 minutos em temperatura ambiente.

Posteriormente, adicionam-se 200 μ L da solução AL (fornecida no kit), homogeneizando novamente no vortex por 15 s e incubando-os a 70 °C por 10 min. Logo após, adicionam-se 200 μ l de etanol (96 % - 100 %) em cada amostra, homogeneizando no vortex por 15 s. A formação de um precipitado branco poderá ocorrer em virtude da adição do etanol.

Cuidadosamente, transfere-se todo o conteúdo do tubo (incluindo quaisquer precipitados existentes), em um volume final de 600 μ L, para a coluna QIAamp Spin Column (QSP) (fornecida no kit), centrifugando-se a 13.000 rpm por 1 min. Descarta-se o tubo coletor (contendo o líquido filtrado) e se transfere à coluna QSP para um novo tubo coletor (tubo de 2,0 mL fornecido no kit). Cuidadosamente, adicionam-se 500 μ L da solução AW1 (fornecida no kit) na coluna QSP, centrifugando-se a 13.000 rpm por 1 min. Descarta-se o tubo coletor (contendo o líquido filtrado) e se transfere a coluna QSP para um novo tubo coletor (tubo de 2,0 mL fornecido no kit). Cuidadosamente, adicionam-se 500 μ l da solução AW2 (fornecida no kit) na coluna QSP, centrifugando-se a 13.000 rpm por 3 min. Descarta-se o tubo coletor (contendo o líquido filtrado) e se transfere a coluna QSP para um novo tubo de 1,5 μ l (não fornecido no kit). Cuidadosamente, adicionam-se 100 μ l da solução AE (fornecida no kit) na coluna QSP. Incuba-se a temperatura ambiente por 1 min ou mais e centrifuga-se a 13.000 rpm por 1 min. Repete-se esse passo e

descarta-se a coluna QSP. O DNA obtido já se encontra ressuspenso nos 200 μ L contidos no tubo final de 1,5 mL. As amostras são armazenadas a -20 °C.

Reações de amplificação de DNA por meio da PCR

Amplifica-se por PCR um fragmento de aproximadamente 530 bp da região do gene 16S do mtDNA utilizando os primers A (5'-CCTGTTTATCAAAAACAT-3') e B (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'). A reação de PCR ocorre em uma solução de 20,0 μ l por amostra, contendo 1X tampão PCR Buffer 10X, 0,2 mM de dNTP, 1 mM de $MgCl_2$, 0,13 μ l de cada primer, 1 U de *Taq* DNA polimerase e 1,0 μ l do DNA obtido. Posteriormente as amostras são levadas ao termociclador programado com um ciclo 11 inicial de 94 °C, por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 51 °C por 30 s e 72 °C por 40 s; e um ciclo final de 72 °C por 5 min.

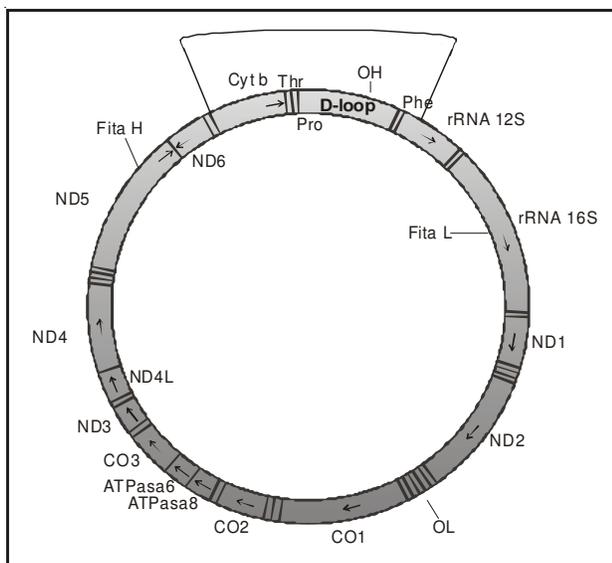


Fig. 4. Esquema da molécula circular de DNA mitocondrial animal. Fonte: Puchnick (2001).

Reações de digestão de fragmentos de DNA por enzimas de restrição

A reação de RFLP ocorre em uma solução de 15 μ L por amostra, contendo 3,0 μ L do produto da PCR e 1 U da enzima Hae III em 1X do tampão, conforme especificações do fabricante. As amostras são incubadas em estufa a 37 °C por 5 horas ou de um dia para o outro.

Análise dos fragmentos de restrição

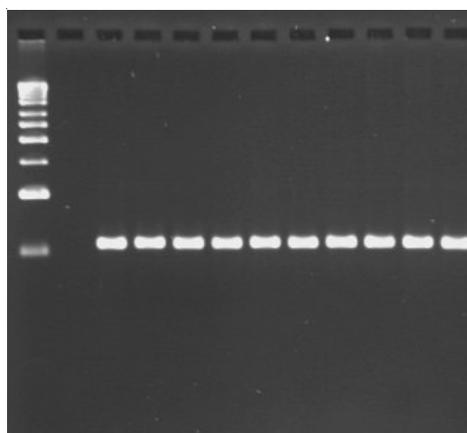
A visualização dos fragmentos de PCR e RFLP é feita por meio de eletroforese em gel de agarose, corado com Brometo de etídio sob luz UV.

■ Para as amostras de PCR

Prepara-se um gel de agarose a 1,5 % com TBE 0,5X e aplicam-se 3,0 μ L de cada amostra e 1,0 μ L de tampão de corrida. Usa-se 5,0 μ L do marcador 1 kb como referencial (Fig. 5).

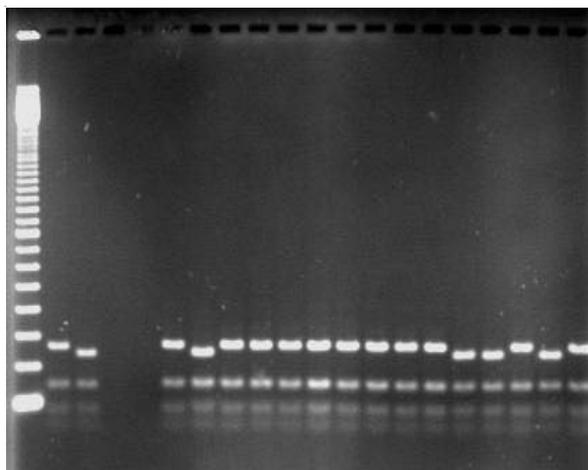
■ Para as amostras de RFLP

Prepara-se um gel de agarose a 2,0 % com TBE 0,5X, misturam-se 3,0 μ L de tampão de corrida em cada amostra e aplicam-se 10,0 μ L da mistura, usando-se 5,0 μ L do marcador 100 bp como referencial (Fig. 6).



Coluna 1: Marcador 1 Kb *ladder*.
Colunas 3-12: região 16S do
mtDNA de ostras (530 bp)

Fig. 5. Gel de agarose a 1,5 % com amplificações por PCR da região do gene 16S do mtDNA de ostras.



Coluna 1: Marcador 100 bp ladder.
Colunas 2, 6, 8-15, 18 e 20:
Crassostrea rizophorae (261 bp).
Colunas 3, 7, 16, 17 e 19:
Crassostrea brasiliana (235 bp).

Fig. 6. Gel de agarose a 2,0 % com os marcadores RFLP de ostras.

Referências

- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994. 511 p.
- AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEI, J. E.; REEB, C. A.; SANDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematic. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.
- CARVALHO, G. R.; PITCHER, T. J. (Ed.). **Molecular genetics in fisheries**. London: Chapman and Hall, 1995. 141 p.
- FAO. Fisheries and Aquaculture Department. National Aquaculture Sector Overview. Brazil. [online]. Rome. Updated 5 August 2004. [Cited 17 August 2009]. Disponível em: http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_brazil/en Acesso em: 23 out. 2008.
- FERGUSON, M. The role of molecular genetic markers in the management of cultured fishes. In: CARVALHO, G. R.; PITCHER, T. J. (Ed.). **Molecular genetics in fisheries**. London: Chapman and Hall, 1995. p. 81-101.

- FERGUSON, M. M.; DANZMANN, R. G. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 55, n. 7, p. 1553-1563, 1998.
- HEDGECOCK, D.; SLY, F. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 88, n. 1, p. 21-38, 1990.
- IGNACIO, B. L.; ABSHER, T. M.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A. M. Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. **Marine Biology**, Berlin, v. 136, n. 6, p. 987-991, July 2000.
- LAPÈGUE, S.; BOUTET, I.; LEITÃO, A.; HEURTEBISE, S.; GARCIA, P.; THIRIOT-QUIÉVREUX, C.; BOUDRY, P. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 202, p. 232-242, June 2002.
- LAZOSKI, C. **Sistemática molecular e genética populacional de ostras brasileiras (*Crassostrea* spp.)**. 2004. 150 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- OVENDEN, J. R. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. **Australian Journal of Marine and Freshwater Research**, Melbourne, v. 41, n. 6, p. 835-853, 1990.
- PIE, M. R.; RIBEIRO, R. O.; BOEGER, W. A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R. M.; ANGELO, L. A simple PCR-RFLP method for the discrimination of native and introduced oyster species (*Crassostrea brasiliiana*, *C. rhizophorae* and *C. gigas*; Bivalvia: Ostreidae) cultured in Southern Brazil. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 37, p. 1598-1600, 2006.
- PUCHNICK, A. **Estudo genético-populacional da corvina (*Micropogonias furnieri*) na costa do Brasil, através da análise do DNA mitocondrial**. 2001. 91 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.
- RIOS, E. C. **Seashells of Brazil**. 2. ed. Rio Grande, RS: Fundação Universidade de Rio Grande, Museu Oceanográfico, 1994. 492 p.
- SUPLICY, F. M. Legal aspects and governmental actions for the development of mollusc farming in Brazil. In: LOVATELLI, A.; FARÍAS, A.; URIARTE, I. (Ed.). **Estado actual del**

cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Roma: FAO, 2008. p. 205-208. (FAO Actas de Pesca y Acuicultura, n. 12). Taller Técnico Regional de la FAO, 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile.

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

VARELA, E. S.; ROBERT, B. C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I.; MARQUES-SILVA, N. S.; TAGLIARO, C.H. Molecular phylogeny of mangrove oysters (*Crassostrea*) from Brazil. **Journal of Molluscan Studies**, Oxford, v. 73, n. 3, p. 229-234, 2007.

VRIJENHOEK, R. C.; FORD, S. E.; HASKIN, H. H. Maintenance of heterozygosity during selective breeding of oysters for resistance to MSX disease. **The Journal of Heredity**, Washington, DC, v. 81, n. 6, p. 418-423, 1990.

WARD, R. D.; GREWE, P. M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: CARVALHO, G. R.; PITCHER, T. J. (Ed.). **Molecular genetics in fisheries**. London: Chapman and Hall, 1995. p. 29-54.

WILSON, A. C.; CANN, R. L.; CARR, S. M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U. B.; HELM-BYCHOSKI, K. M.; HIGUCHI, R. G.; PALUMBI, S. R.; PRAGER, E. M.; SAGE, R. D.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biological Journal of the Linnean Society**, Malden, v. 26, n. 4, p. 375-400, 1985.