

DIFERENCIAÇÃO DAS OSTRAS DO GÊNERO *Crassostrea* DA REGIÃO ESTUARINA-LAGUNAR DE CANANÉIA, SP, ATRAVÉS DE PCR-RFLP DO GENE 16S DO DNA MITOCONDRIAL

Daniella Albuquerque de Sousa¹; Márcia Santos Nunes Galvão²; Alexandre Wagner Silva Hilsdorf³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: gospel_nani@hotmail.com¹

Estudante do Curso de Doutorado da UMC; e-mail: margalvao@pesca.sp.gov.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagner@umc.br³

Área do Conhecimento: Biologia Molecular

Palavras-chave: Ostra; Importância econômica; Diferenciação molecular; PCR-RFLP; DNA mitocondrial

INTRODUÇÃO

As ostras são moluscos bivalves e pertencem à família Ostreidae (RIOS, 1994). Segundo este autor, as ostras *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) e *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819), encontradas no litoral brasileiro, são sinônimas, ou seja, correspondem a uma única espécie. No entanto, trabalhos recentes em biologia molecular evidenciam a existência de duas ou mais espécies do gênero *Crassostrea* no litoral brasileiro, inclusive no estuário de Cananéia, local deste estudo (IGNÁCIO 2000). A morfologia das ostras pode ser fortemente influenciada pelas condições ambientais. A identificação, com base nas características das conchas como a cor, forma, estrutura e inserção do músculo adutor, é extremamente propensa a erro, gerando controvérsias para a identificação correta das espécies. Devido a sua importância sócio-econômica, como fonte de alimento e renda para as comunidades pesqueiras que vivem de sua extração e/ou cultivo, a caracterização genética das ostras é um fator indispensável. No litoral paulista, o complexo estuarino de Cananéia é considerado o maior produtor desses moluscos em bancos naturais. As ostras dessa região abastecem a maior parte do mercado do Estado de São Paulo e, parcialmente, o do Rio de Janeiro (PEREIRA *et al.*, 2000). Uma vez que é difícil diagnosticar as espécies somente pelas características morfológicas, os métodos moleculares são fundamentais para estabelecer as diferenças. Estudos envolvendo o DNA mitocondrial com enzimas de restrição para análise da variabilidade genética interespecífica têm sido amplamente utilizados. A técnica de RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) pode ser sucintamente descrita pela digestão do DNA com enzimas de restrição, separação dos fragmentos gerados de acordo com seu peso molecular em um gel de eletroforese e, finalmente, a visualização e a interpretação dos fragmentos. Dessa forma, o DNA de cada indivíduo analisado apresentará seu próprio padrão de fragmentos específicos (ARIAS e INFANTE-MALACHIAS, 2004).

OBJETIVOS

Revelar diferenças entre as ostras do gênero *Crassostrea* da região estuarina-lagunar de Cananéia por meio do método PCR-RFLP do gene 16S do DNA mitocondrial.

METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e

Aqüicultura (Lagoaa) do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB), Universidade de Mogi das Cruzes. Analisaram-se 180 amostras do músculo adutor de ostras adultas coletadas pela equipe do Instituto de Pesca, de 2007 a 2008, em três localidades do estuário de Cananéia. De cada local, coletaram-se ostras da zona de entre-marés fixadas em raízes de mangue (n = 120), dentre as quais se incluem aquelas conhecidas pelos extratores como “parangas” (devido ao crescimento reduzido), e ostras da zona infralitoral fixadas em substratos rochosos (n = 60). As amostras foram fixadas em etanol 95% e armazenadas a -20°C, em congelador. A extração de DNA foi efetuada com kit de extração genômico Illustra™ (GE Healthcare) e pelo método fenol:clorofórmio com o uso de tampão STE (0,1M NaCl, 0,05M tris-HCl e 0,01M EDTA, pH 8,0). A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0%. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop ND 1000 Spectrophotometer) acoplado a um computador contendo o Software NanoDrop V.3.1.0, obtendo-se a concentração em ng/μL. As amplificações pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas para um volume final de 20 μL, contendo de 10 a 50 ng/μL de DNA, 0,25 U de Taq polimerase, 1x solução tampão (KCl), 2,5 mM de dNTPs, 10 pM de *primers* (16S.AR e 16S.BR) e 1,5 mM de MgCl₂. A reação de amplificação foi conduzida em termociclador com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 min, seguido de 32 ciclos (94°C por 30s, 56°C por 40s, 72°C por 1 min) e extensão final de 72°C por 1 min. Para verificar se houve amplificação do fragmento 16S, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE 1x e voltagem de 80 V. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador Alpha Innotech Corporation. Digeriu-se o produto de PCR segundo a metodologia descrita por PIE *et al* (2006), com modificações, utilizando a endonuclease *Hae*III. A digestão foi conduzida para um volume final de 10,0 μL, contendo 0,5 μL da enzima *Hae*III, 1,0 μL da solução tampão 1x e 4,0 μL do produto de PCR. As soluções foram incubadas por 1 hora a 37°C em termobloco. Os fragmentos resultantes foram analisados através da eletroforese em gel de agarose 2,5%, em tampão TAE 1x e voltagem de 65 V. As espécies foram identificadas pelos padrões de bandas gerados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 180 amostras analisadas, todas amplificaram o gene 16S e apresentaram um padrão de bandas que, após a digestão enzimática, permitiu a diferenciação das ostras. Segundo PIE *et al.* (2006), embora os fragmentos menores não possam ser detectados em gel de agarose, o maior fragmento de cada espécie (235 pb em *C. brasiliiana* e 261 pb em *C. rhizophorae*) é suficiente para uma identificação consistente. A Figura 1 mostra os fragmentos resultantes da digestão enzimática por meio da qual se pode diferenciar as espécies. As bandas com fragmentos menores representam indivíduos da espécie *C. brasiliiana*, enquanto as bandas com fragmentos maiores representam indivíduos da espécie *C. rhizophorae*. Verificou-se que das 180 amostras, 104 pertencem à espécie *C. brasiliiana* e 76 à *C. rhizophorae*. Todas as ostras coletadas em substratos rochosos e que ficam permanentemente submersas apresentaram um padrão de bandas correspondente à espécie *C. brasiliiana* (100% das ostras da zona infralitoral). Aquelas extraídas de raízes de mangue e que estão sujeitas a ação das marés (zona entre-marés) mostraram padrões de banda de *C. brasiliiana* (36,7%) e *C. rhizophorae* (63,3%). Verificou-se que as ostras conhecidas popularmente pelos caixaras como “paranga”, devido ao seu crescimento lento e tamanho reduzido, são predominantemente da espécie *C. rhizophorae*.

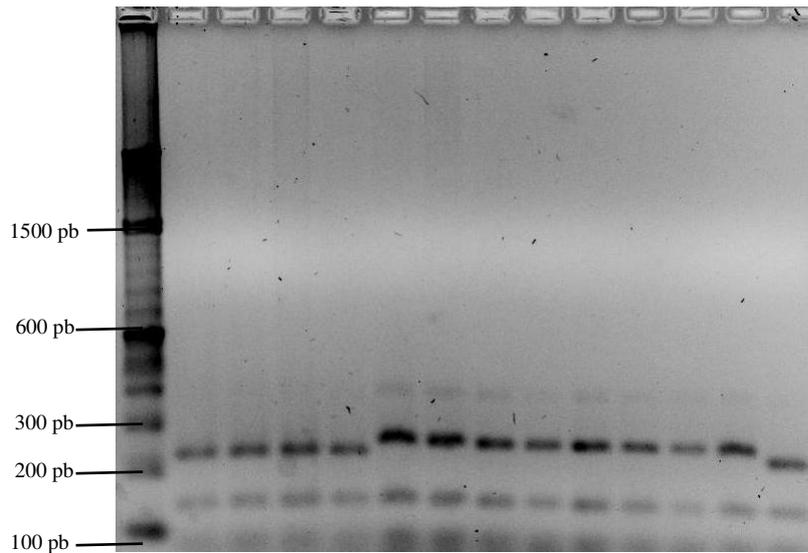


Figura 1. Gel de agarose (2,5%) do produto de digestão de amostras de ostras coletadas em raízes de mangue

CONCLUSÕES

A técnica PCR-RFLP foi eficiente para a diferenciação das espécies. A ostra *C. brasiliiana* ocorre tanto em substratos rochosos como em raízes de mangue, nas zonas infralitoral e entre-marés. *C. rhizophorae* foi observada somente em raízes de mangue, na zona entre-marés. As ostras conhecidas popularmente como “parangas” são predominantemente da espécie *C. rhizophorae*. A clara identificação das espécies de ostra da região estuarina-lagunar de Cananéia tem importantes implicações para o desenvolvimento da ostreicultura na região e para o manejo sustentável desse recurso pesqueiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARIAS, M. C. e INFANTE-MALACHIAS, M. E. 2004 *RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismo do DNA*. IN: *Biologia Molecular e Evolução* Ed. MATIOLI, S. R., Holos Editora, p. 143 – 152.
- IGNACIO, B. L.; ABSHER, T. M.; LAZOSKI, C.; SOLÉ-CAVA, A.M. 2000 Genetic evidence of the presence of two species of *Crassostrea* (Bivalvia: Ostreidae) on the coast of Brazil. *Mar. Biol.*, 136: 987-991.
- PEREIRA, O.M.; MACHADO, I.C.; HENRIQUES, M.B.; GALVÃO, M.S.N.; BASTOS, A.A. 2000 Avaliação do estoque da ostra *Crassostrea brasiliiana* (Lamarck, 1819) no manguezal da região estuarina-lagunar de Cananéia (25°S; 48°W). *B. Inst. Pesca*, 26(1): 49 – 62.
- PIE, M.R.; RIBEIRO, R.O.; BOEGER, W.A.; OSTRENSKY, A.; FALLEIROS, R.M.; ANGELO, L.. 2006 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. *Aquac. Res.*, 37: 1598 – 1600.
- RIOS, E. C. 1994 *Seashells of Brazil*. Rio Grande, RS. Ed. FURG, 245p.

AGRADECIMENTOS

À FAEP pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro.